
Université de Montréal

**Étude des événements moléculaires impliqués dans
l'activation de la synthèse endothéliale du monoxyde
d'azote (eNOS) par le facteur de croissance de
l'endothélium vasculaire (VEGF)**

Par

Mariela Garcia Blanes

Département de Biologie Moléculaire
Faculté des études supérieures

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maître ès Science (M.Sc.)
en Biologie Moléculaire

Avril, 2007

© Mariela Garcia Blanes, 2007



QH
506
U54
2007
V.009

AVIS

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

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

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

NOTICE

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

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

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

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :
**Étude des événements moléculaires impliqués dans l'activation de
la synthèse endothéliale du monoxyde d'azote (eNOS) par le
facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF)**

Présenté par :
Mariela Garcia Blanes

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Docteur Jean-François Côté

président- rapporteur

Docteur Jean-Philippe Gratton

directeur de recherche

Docteur Martin G. Sirois

membre du jury

Mémoire accepté le 02 mars 2007

Résumé

L'induction de la synthèse de monoxyde d'azote (NO) par le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) par les cellules endothéliales est médiée via l'activation du récepteur de type 2 du VEGF (VEGFR-2). Nous avons tenté de déterminer quels étaient les résidus tyrosines du VEGFR-2 dont la phosphorylation est essentielle à l'activation de la synthèse endothéliale du monoxyde d'azote (eNOS) et la production de NO endothéliale, stimulées par le VEGF. Les résidus tyrosines 801, 1175 et 1214 ont été mutés en phénylalanine puis leur capacité à stimuler la production de NO a été analysée. Tant dans des cellules COS-7 cotransfectées avec les récepteurs mutants et l'enzyme eNOS que dans des cellules endothéliales d'aorte bovine (BAEC), nous avons démontré que le mutant Y801F-VEGFR-2, contrairement au récepteur sauvage et aux mutants Y1175F-VEGFR-2 et Y1214F-, est incapable de stimuler la synthèse de NO et l'activation d'eNOS. Cependant, le mutant Y801F maintient la capacité d'activer la phospholipase C- γ alors que le Y1175F-VEGFR-2 en est incapable. Il est intéressant de noter que le Y801F-VEGFR-2, contrairement au récepteur sauvage, n'est plus en mesure de pleinement recruter ou activer la sous-unité régulatrice de phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), la p85, suite à son activation. Ceci a pour conséquence d'inhiber complètement l'activation d'Akt et la phosphorylation de la sérine 1179 d'eNOS, stimulées par le VEGF. De plus, l'utilisation d'une forme constitutivement active d'Akt ou phospho-mimétique d'eNOS (S1179D-eNOS) permettent de rétablir la stimulation de la production de NO par le Y801F-VEGFR-2 à un niveau similaire à celui du récepteur de type sauvage. Finalement, nous avons généré un anticorps qui reconnaît spécifiquement la forme phosphorylée de la tyrosine 801. Ceci nous a permis de démontrer que ce résidu est phosphorylé suite à une stimulation des cellules endothéliales par le VEGF. Nous concluons que l'autophosphorylation du résidu tyrosine 801 du VEGFR-2 est essentielle à la

synthèse de NO stimulée par le VEGF dans les cellules endothéliales et ceci principalement via l'activation du signallement PI3K /Akt vers eNOS.

Mots-clés : VEGF, VEGFR-2, tyrosine phosphorylation, synthèse endothéliale du monoxyde d'azote, cellules endothéliales.

Abstract

Vascular endothelial growth factor (VEGF)-stimulated nitric oxide (NO) release from endothelial cells is mediated through the activation of the VEGF receptor-2 (VEGFR-2). Herein, we have attempted to determine which autophosphorylated tyrosine residue on the VEGFR-2 is essential for VEGF-mediated eNOS activation and NO production from endothelial cells. Tyrosine residues 801, 1175 and 1214 of the VEGFR-2 were mutated to phenylalanine and the mutated receptors were analyzed for their ability to stimulate NO production. We show, both in COS-7 cell cotransfected with the VEGFR-2 mutants and eNOS and in bovine aortic endothelial cells (BAEC), that the Y801F-VEGFR-2 mutant is unable to stimulate NO synthesis and eNOS activation in contrast to the wild type, Y1175F and Y1214F-VEGFR-2. However, the Y801F mutant retains the capacity to activate phospholipase C- γ in contrast to the Y1175F-VEGFR-2. Interestingly, the Y801F-VEGFR-2, in contrast to the wild type receptor, does not fully activate phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) nor recruit the p85 subunit upon receptor activation. This results in inhibition of both VEGF-stimulated Akt activation and eNOS phosphorylation on serine 1179 in endothelial cells. In addition, constitutive activation of Akt or a phosphomimetic mutant of eNOS (S1179D) fully rescue the inability of the Y801F-VEGFR-2 to induce NO release. Finally, we generated an antibody that specifically recognizes the phosphorylated form of tyrosine 801 of the VEGFR-2 and demonstrate that this residue is actively phosphorylated in response to VEGF stimulation of endothelial cells. We thus conclude that autophosphorylation of tyrosine residue 801 of the VEGFR-2 is essential for VEGF-stimulated NO production from endothelial cells and this is primarily accomplished via the activation of PI3K and Akt signaling to eNOS.

Key words: VEGF, VEGFR-2, tyrosine phosphorylation, endothelial nitric oxide synthase, nitric oxide, endothelial cells.

Table des matières

RÉSUMÉ.....	III
ABSTRACT.....	V
TABLE DES MATIÈRES.....	VI
LISTE DES TABLEAUX.....	IX
LISTE DES FIGURES.....	X
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	XI
REMERCIEMENTS.....	XV

1. INTRODUCTION.....	1
1.1 L'ANGIOGÈNESE.....	2
1.1.1 Formation du plexus vasculaire : rôle de l'angiogenèse.....	2
1.1.2 L'angiogenèse physiologique.....	3
1.1.3 L'angiogenèse pathologique.....	4
1.1.4 Régulation de l'angiogenèse.....	5
1.2 LE VEGF.....	9
1.2.1 La famille du VEGF.....	9
1.2.2 Régulation et sites d'expression du VEGF.....	11
1.2.3 Rôles du VEGF.....	12
1.2.3.1 Effets du VEGF sur les cellules endothéliales et hématopoïétiques.....	12
1.2.3.2 Implications physiologiques du VEGF.....	13
1.2.3.3 Implications pathologiques du VEGF.....	14
1.3 LES RÉCEPTEURS DU VEGF.....	16
1.3.1 Les NRP-1 et -2.....	16
1.3.2 Le VEGFR-1.....	18
1.3.3 Le VEGFR-3.....	19
1.3.4 Le VEGFR-2.....	19
1.3.5 La signalisation intracellulaire induite par le VEGFR-2.....	20
1.3.5.1 Induction de la prolifération des cellules endothéliales.....	20
1.3.5.2 Induction de la survie des cellules endothéliales.....	22
1.3.5.3 Induction de la migration des cellules endothéliales.....	23
1.4 LE MONOXYDE D'AZOTE.....	26
1.4.1 Principal rôle du NO : induction de la vasodilatation.....	26
1.4.2 Autres implications physiologiques du NO.....	28
1.5 LA SYNTHÈSE ENDOTHÉLIALE DU MONOXYDE D'AZOTE.....	30
1.5.1 La structure d'eNOS.....	30
1.5.2 La génération de NO par eNOS.....	32
1.5.3 La régulation d'eNOS.....	33
1.5.3.1 Régulation d'eNOS au niveau transcriptionnel.....	34
1.5.3.2 Régulation d'eNOS co- et post-traductionnelles.....	35

1.5.3.3 Régulation d'eNOS par les interactions protéine-protéine	36
1.5.3.4 Régulation d'eNOS par la phosphorylation.....	40
1.6 LE NO DANS LA RÉPONSE CELLULAIRE AU VEGF : SON RÔLE DANS L'ANGIOGÈNESE.....	45
1.6.1 Le NO dans la prolifération des cellules endothéliales induite par le VEGF.....	45
1.6.2 Le NO dans la survie des cellules endothéliales induite par le VEGF	46
1.6.3 Le NO dans la migration des cellules endothéliales induite par le VEGF.....	47
1.6.4 Le NO dans la perméabilité vasculaire induite par le VEGF.....	48
1.7 LE VEGFR-2 ET ENOS	50
1.7.1 La voie de la PLC- γ	50
1.7.2 La voie de la PI3K	52
1.8 LES RÉSIDUS TYROSINES DU VEGFR-2	53
1.8.1 Résidu Y801	55
1.8.2 Résidu Y951	55
1.8.3 Résidus Y996 et Y1008	56
1.8.4 Résidus Y1054 et Y1059.....	56
1.8.5 Résidu Y1175	57
1.8.6 Résidu Y1214	58
1.9 PROBLÉMATIQUE ET HYPOTHÈSE	60
1.10 APPROCHE EXPÉRIMENTALE.....	62
2. ARTICLE	64
2.1 ABSTRACT	67
2.2 INTRODUCTION.....	68
2.3 EXPERIMENTAL PROCEDURES	71
2.4 RESULTS AND DISCUSSION	75
2.5 REFERENCES.....	87
2.6 FOOTNOTES	91
2.7 FIGURE LEGENDS	92
2.8 FIGURES	97
3. DISCUSSION, CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	105
3.1 DISCUSSION.....	106
3.1.1 Choix des mutants du VEGFR-2 pour la réalisation de l'étude.....	108
3.1.2 La phosphorylation de la tyrosine 801 dans l'activation d'eNOS et la production de NO induites par le VEGF.....	110

3.1.3 Rôle de l'enzyme PLC- γ , ainsi que de l'augmentation du calcium intracellulaire induit par celle-ci, dans la stimulation de la synthèse de NO par le VEGFR-2.....	113
3.1.4 Rôle de la voie de signalisation PI3K/Akt dans l'activation d'eNOS et l'induction de la synthèse de NO par le VEGF.....	116
3.2 PERSPECTIVES FUTURES	123
3.3 CONCLUSIONS.....	126
4. BIBLIOGRAPHIE.....	128
ANNEXE I : ARTICLE PUBLIÉ	162

Liste des tableaux

Introduction

Tableau 1.1: Principaux activateurs et inhibiteurs de l'angiogenèse	6
---	---

Liste des figures

Introduction

Figure 1.1:	Structure des différents membres de la famille VEGF	10
Figure 1.2:	Représentation schématique des différents récepteurs liés par le VEGF	17
Figure 1.3:	Signalisation intracellulaire induite par le VEGFR-2	21
Figure 1.4:	Induction de la relaxation du muscle lisse vasculaire par le NO	27
Figure 1.5:	Structure d'eNOS	31
Figure 1.6:	Génération du NO	32
Figure 1.7:	Interactions protéine-protéine impliquées dans la régulation d'eNOS ...	37
Figure 1.8:	Régulation d'eNOS par la phosphorylation	42
Figure 1.9:	Rôle du NO dans les effets cellulaires endothéliaux du VEGF	46
Figure 1.10:	Voies de signalisation entre le VEGFR-2 et eNOS	51
Figure 1.11:	Mécanisme général d'activation des récepteurs à activité tyrosine kinase	54
Figure 1.12:	Représentation structurale des différentes versions du VEGFR-2 utilisées lors de cette étude	62

Article

Figure 2.1:	Expression and activation of wild type and mutants VEGFR-2 receptors	97
Figure 2.2:	Stimulation of NO release by the VEGFR-2 mutants	98
Figure 2.3:	Implication of tyrosine 801 of the VEGFR-2 in VEGF-stimulated NO production from endothelial cells	99
Figure 2.4:	The Y801F-VEGFR-2 mutant does not increase the association between eNOS and Hsp90	100
Figure 2.5:	Activation of PLC- γ requires tyrosine 1175 of the VEGFR-2 but not tyrosine 801	101
Figure 2.6:	Tyrosine 801 of the VEGFR-2 is essential for PI3K, Akt and eNOS phosphorylation	102
Figure 2.7:	Constitutive phosphorylation of eNOS by Akt restores NO release stimulated by Y801F-VEGFR-2	103
Figure 2.8:	Tyrosine residue 801 of the VEGFR-2 is phosphorylated following VEGF stimulation	104

Conclusion

Figure 3.1:	Principal mécanisme de regulation d'eNOS par le VEGFR-2	127
-------------	---	-----

Liste des abréviations

A	<i>Alanine</i>
ACTH	<i>Hormone adrénocorticotrophe</i>
AMD	<i>Dégénérescence maculaire dépendante de l'age</i>
Akt/PKB	<i>Protéine kinase B/ Akt</i>
AMPK	<i>Kinase dépendante de l'AMP</i>
Ang	<i>Angiopoïétine</i>
AP-1	<i>Protéine activatrice-1</i>
Arg	<i>Arginine</i>
AT ₁	<i>Récepteur à l'angiotensine</i>
B ₂	<i>Récepteur à la bradykinine</i>
BAEC	<i>Cellules endothéliales d'aorte bovine</i>
BAI	<i>Boucle d'auto-inhibition</i>
BAPTA	<i>1,2-bis(o-aminophenoxy)ethane tetraacetate</i>
BH ₄	<i>Tétrahydrobioptérine</i>
BMMNC	<i>Cellules mononucléaires de la moelle osseuse</i>
CAI	<i>Carboxyamidotriazole</i>
CaM	<i>Calmoduline</i>
CaMKII	<i>Kinase dépendante de la calmoduline</i>
cAMP	<i>Adénosine monophosphate cyclique</i>
CARD	<i>Domaines de recrutement de caspases</i>
Cav-1	<i>Cavéoline-1</i>
CE	<i>Cellule endothéliale</i>
cGMP	<i>Guanosine monophosphate cyclique</i>
CMLV	<i>Cellule du muscle lisse vasculaire</i>
COS-7	<i>Fibroblastes transformés de rein de singe vert d'Afrique</i>
Cox	<i>Cyclo-oxygénase</i>
D	<i>Aspartate</i>
DAG	<i>Diacylglycerol</i>
DLC	<i>Domaine de liaison à la calmoduline</i>
DLCav	<i>Domaine de liaison à la calvéoline</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
Dyn	<i>Dynamine</i>
EDRF	<i>Facteur relaxant dérivé de l'endothélium</i>
EGDR	<i>Récepteur chimérique composé du domaine extracellulaire du récepteur EGF et des domaines transmembranaire et intracellulaire du VEGFR-2</i>
EGF	<i>Facteur de croissance de l'épiderme</i>
EGTA	<i>Ethylene glycol-bis(beta-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid/ acide acétique</i>

eNOS	<i>Synthase endothéliale du monoxyde d'azote</i>
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
ET _B	<i>Récepteur à l'endothéline</i>
FAD	<i>Flavine adénine dinucléotide</i>
FAK	<i>Protéine kinase des contacts focaux</i>
FBS	<i>Sérum fœtal bovin</i>
FGF	<i>Facteur de croissance des fibroblastes</i>
FGFR	<i>Récepteur du FGF</i>
Flk-1	<i>Kinase du foie fœtal</i>
FMN	<i>Flavine mononucléotide</i>
HA	<i>Hemagglutinin</i>
HGF	<i>Facteur de croissance des hépatocytes</i>
HIF	<i>Hypoxia-inducible factor</i>
HRE	<i>Hypoxia-responsive element</i>
HSC	<i>Cellule souche hématopoïétique</i>
Hsp27	<i>Heat shock protein 27</i>
Hsp90	<i>Heat shock protein 90</i>
HSPGs	<i>Protéoglycannes à sulfate d'héparane</i>
HUVEC	<i>Cellule endothéliale de la veine ombilicale humaine</i>
IAPs	<i>Protéines inhibitrices d'apoptose</i>
ID4	<i>Domaine intracellulaire 4 du récepteur à la bradykinine</i>
IGF	<i>Insulin-like growth factor</i>
IL	<i>Interleukine</i>
INF	<i>Interféron</i>
iNOS	<i>Synthase inductible du monoxyde d'azote</i>
IP	<i>Immunoprécipitation</i>
IP ₃	<i>Inositol-triphosphate</i>
K	<i>Lysine</i>
KDR	<i>Récepteur contenant un domaine kinase</i>
KGf	<i>Facteur de croissance des kératinocytes</i>
KI	<i>Knock-in</i>
KO	<i>Knock-out</i>
LDL	<i>Lipoprotéine de basse densité</i>
L-NAME	<i>Nitro-L-Arginine-Methyl-Ester</i>
LPS	<i>Lipopolysaccharide</i>
lyso-PC	<i>Lysophosphatidylcholine</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MAPKAPK	<i>Protéine kinase activée par MAPK</i>
MCP	<i>Protéine chimioattractante des monocytes</i>
MMP	<i>Metalloprotéinase de matrice</i>
myr-AKT	<i>Akt myristoylé</i>
NADPH	<i>Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate</i>
NANC	<i>Non-adrénergiques, non-cholinergiques</i>

NI	<i>Non-immune</i>
NIDD	<i>nNOS-interacting DHHC domain-containing protein with dendritic mRNA</i>
nNOS	<i>Synthase neuronale du monoxyde d'azote</i>
NO	<i>Monoxyde d'azote</i>
NO ₂ ⁻	<i>Nitrite</i>
NOS	<i>Synthase du monoxyde d'azote</i>
NOSIP	<i>Nitric oxide synthase interactig protein</i>
NOSTRIN	<i>Nitric oxide synthase trafficker</i>
NRP	<i>Récepteur de la neuropiline</i>
PAF	<i>Facteur d'activation plaquettaire</i>
PAI	<i>Activateur du plaminogène</i>
PDGF	<i>Facteur de croissance dériv des plaquettes</i>
PDK1	<i>Phosphoinositol-dependent kinase-1</i>
PECAM	<i>Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule</i>
PH	<i>Domaines d'homologie pleckstrin</i>
PI3K	<i>Phosphatidylinositol 3-kinase</i>
PIGF	<i>Facteur de croissance placentaire</i>
PIP ₂	<i>Phosphatidylinositol-4,5-biphosphate</i>
PIP ₃	<i>Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate</i>
PKA	<i>Protéine kinase A</i>
PKC	<i>Protéine kinase C</i>
PKG	<i>Protéine kinase G</i>
PLC- γ	<i>Phospholipase C-γ</i>
PP-1	<i>Protéine phosphatase-1</i>
pVHL	<i>Protéine supprimeur de tumeur von Hippel-Lindau</i>
R	<i>Arginine</i>
RA	<i>Arthrite rhumatoïde</i>
RCPG	<i>Récepteur couplé aux protéines G</i>
RE	<i>Réticulum endoplasmique</i>
RTK	<i>Récepteur à activité tyrosine kinase</i>
S	<i>Sérine</i>
sGC	<i>Guanylate cyclase soluble</i>
SH2	<i>Domaines d'homologie à Src 2</i>
T	<i>Thréonine</i>
TGF	<i>Facteur de croissance transformant</i>
TIMP	<i>Inhibiteurs tissulaires des MMP</i>
TNF	<i>Facteur de nécrose tumoral</i>
TSAd	<i>Adaptateur spécifique aux cellules-T</i>
TSH	<i>Hormone thyroïdienne</i>
TSP	<i>Thrombospodine</i>
VE-cad	<i>Cadhérine de l'endothélium vasculaire</i>
VEGF	<i>Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire</i>

VEGFR-1	<i>Récepteur de type 1 du VEGF</i>
VEGFR-2	<i>Récepteur de type 2 du VEGF</i>
VEGFR-3	<i>Récepteur de type 3 du VEGF</i>
VPF	<i>Facteur de perméabilité vasculaire</i>
VRAP	<i>Protéine associée au récepteur au VEGF</i>
wb	<i>Immunobuvardage/ western blot</i>
WCL	<i>whole cell lysate</i>
WT	<i>Wild type</i>
Y	<i>Tyrosine</i>

Remerciements

J'aimerais tout d'abord remercier mon directeur de Maîtrise, le Dr Jean-Philippe Gratton, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire ainsi que pour l'encadrement et le soutien qu'il m'a donné tout au long de mon projet de recherche. J'aimerais aussi le remercier pour ces précieux conseils et sa grande compréhension.

Je remercie le Dr Jean-François Côté, le Dr Martin G. Sirois et le Dr Jean-Philippe Gratton pour l'évaluation de mon mémoire de Maîtrise.

Un grand merci également à tous les membres du laboratoire qui m'ont accompagné au cours de ces deux dernières années; prodiguant aide, support et conseils judicieux. Plus spécifiquement, j'aimerais remercier Chantal et Martine pour avoir accepté de relire ce mémoire, vos suggestions ont été grandement utiles!! Aussi, un grand merci à Malika et Yohann pour leur implication dans la mise au point et l'élaboration des expériences supplémentaires.

J'aimerais fortement remercier mes parents, Lina et Raul, ainsi que mon frère, Fernando, pour leur présence, leur compréhension et encouragements continus. Merci pour avoir toujours fait l'impossible afin de m'aider tout au long de mes études.

Finalement, un remerciement infini à mon copain Federico pour sa compréhension, son soutien, et sa patience. Pour avoir toujours cru en moi, pour m'avoir encouragée et pour avoir toujours été à mes côtés.

1. Introduction

1.1 L'angiogenèse

L'angiogenèse est l'un des trois mécanismes impliqués dans la création du réseau vasculaire indispensable à l'acheminement de l'oxygène vers les organes en développement de l'embryon, une tâche partagée avec la vasculogenèse et l'artériogenèse. Elle se définit comme étant le développement de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de ceux préexistants alors que ces deux partenaires, la vasculogenèse et l'artériogenèse, réfèrent plutôt à la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de précurseurs endothéliaux et au remodelage de ces vaisseaux en artères, respectivement (Fam *et al.*, 2003). Plus en détails, l'angiogenèse est un processus dynamique et échelonné sur plusieurs étapes parmi lesquelles on retrouve la dégradation de la matrice extracellulaire, la prolifération et la migration des cellules endothéliales, la formation d'un tube, la création d'une nouvelle membrane basale et finalement la maturation de l'endothélium (Risau, 1997;Dvorak, 2005). Ce processus est induit par plusieurs stimuli physiologiques dont les principaux sont l'hypoxie, l'inflammation et les forces de cisaillement de l'afflux sanguin (Fam *et al.*, 2003). De plus, loin d'être restreinte au développement embryonnaire, l'angiogenèse est observée chez l'adulte où elle peut participer tant à des conditions physiologiques normales qu'à certaines pathologies. C'est en effet son implication pathologique et le désir d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques qui a fortement stimulé la recherche scientifique à son sujet au cours de la dernière décennie.

1.1.1 Formation du plexus vasculaire : rôle de l'angiogenèse

La néovascularisation débute au niveau de la vasculogenèse, une étape caractérisée par la différenciation, à partir du mésoderme embryonnaire, d'un précurseur commun aux lignages endothéliaux et hématopoïétiques : l'hémangioblaste (Carmeliet, 2005). Ce précurseur formera des agrégats appelés

flots sanguins dont les cellules externes deviendront des angioblastes et celles internes formeront des cellules souches hématopoïétiques (Gilbert Scott F., 2000). Les angioblastes vont se diviser et différencier en cellules endothéliales puis celles-ci formeront des tubes et se connecteront pour former le plexus capillaire primaire.

Après cette phase initiale débute l'angiogenèse, un processus au cours duquel le réseau vasculaire primitif est remodelé afin de former les artères et les veines. Il existe deux types d'angiogenèse : l'angiogenèse germinative et invaginante (Risau, 1997). La première se démarque par un relâchement des contacts cellulaires endothéliaux au sein des capillaires nouvellement formés, la dégradation de la matrice extracellulaire, la prolifération des cellules endothéliales et leur germination afin de former de nouveaux vaisseaux. De son côté, l'angiogenèse invaginante réfère plutôt à la prolifération des cellules endothéliales au sein même d'un vaisseau existant donnant lieu ainsi à la division de ce vaisseau en deux. De cette façon, le plexus vasculaire émergent est remodelé afin de donner un réseau vasculaire organisé où de gros vaisseaux se ramifient dans des plus petits (Carmeliet, 2005).

Enfin, il s'ensuit une maturation du réseau vasculaire par un processus appelé artériogenèse et qui, comme l'indique bien son nom, résultera en la génération des artères. Lors de cette étape, des vaisseaux nouvellement formés sont recouverts par des péricytes et des cellules du muscle lisse, processus qui permettra d'en réguler la perfusion (Carmeliet, 2005).

1.1.2 L'angiogenèse physiologique

Avec seulement 0.01% des cellules endothéliales en état de prolifération à tout moment, l'endothélium adulte est un tissu plutôt quiescent (Hobson and Denekamp, 1984). Le principal apport physiologique de l'angiogenèse est donc, tel que mentionné plus tôt, sa participation à l'établissement du réseau vasculaire au cours du développement embryonnaire.

Toutefois, chez l'adulte les cellules endothéliales ne sont pas post-mitotiques. Ceci implique que sous certains stimuli physiologiques tels que l'hypoxie, l'angiogenèse peut être réactivée (Carmeliet, 2005). Par exemple, lors de la cicatrisation des plaies, la génération de nouveaux vaisseaux est nécessaire à la régénération du réseau vasculaire interrompu par la blessure, à l'acheminement de nutriments supplémentaires vers les tissus en cicatrisation et au nettoyage des débris. Un autre bon exemple d'angiogenèse physiologique est la formation de vaisseaux sanguins dans l'endomètre durant le cycle menstruel. En effet, les organes reproducteurs féminins font partie des quelques organes adultes montrant des cycles réguliers de croissance rapide. Pour cette raison, un apport sanguin suffisant est requis à sa bonne croissance et fonctionnement (Reynolds *et al.*, 2002). Finalement, l'exercice physique est un stimulateur angiogénique puissant qui induit la génération de nouveaux vaisseaux sanguins au sein du muscle actif résultant ainsi en un apport de nutriments et d'oxygène adéquats (Prior *et al.*, 2003).

1.1.3 L'angiogenèse pathologique

L'angiogenèse est un processus hautement régulé au cours duquel un léger déséquilibre peut se traduire en une hyper- ou hypo-vascularisation de certaines régions et ainsi causer ou aggraver un état pathologique. À ce jour, l'angiogenèse a été reliée à plus de 70 maladies (Carmeliet, 2005). Parmi celles-ci on retrouve les rétinopathies prolifératives, la dégénérescence maculaire dépendante de l'âge (AMD), le cancer, l'arthrite rhumatoïde (RA) et le psoriasis (Folkman, 1995). Toutefois, l'exemple le plus marquant est sans doute l'angiogenèse tumorale. Nous savons que les tumeurs solides ne peuvent dépasser 1-2 mm en absence de néovascularisation (Bae *et al.*, 2000). De plus, il a été démontré que la diffusion d'oxygène et nutriments, du sang vers la tumeur, constitue la principale étape limitante de la progression tumorale (Tannock, 1968). En effet, les cellules tumorales étant hautement prolifératives, elles se retrouvent très vite dans un

micro-environnement caractérisé par des bas niveaux d'oxygène et de glucose, lequel, s'il n'est pas corrigé, inhiberait leur progression (Acker and Plate, 2003). Cette hypoxie dans la zone tumorale cause un déséquilibre entre les facteurs pro- et anti-angiogéniques présents, favorisant ainsi l'angiogenèse. Ultiment, les vaisseaux sanguins nouvellement générés permettront à la tumeur de croître rapidement et d'acquérir des propriétés métastatiques.

Cependant, l'implication pathologique de l'angiogenèse ne se limite pas à la surcroissance des vaisseaux. Sous certaines conditions, le stimulus angiogénique est insuffisant, causant ainsi une dysfonction endothéliale qui peut mener à la formation d'une zone sous-vascularisée. C'est le cas, de l'ischémie myocardique et de la prééclampsie (Carmeliet, 2005). Contrairement aux conditions pathologiques découlant d'une hyper-vascularisation, lors d'une angiogenèse insuffisante il serait intéressant de promouvoir la revascularisation des tissus ischémiques afin d'améliorer leur perfusion et fonction.

1.1.4 Régulation de l'angiogenèse

Tel que mentionné précédemment, l'angiogenèse est finement régulée par une balance entre les facteurs anti- et pro-angiogéniques (Tableau 1.1). Dans le premier groupe on retrouve, entre autres, la thrombospondine, la vasoinhibine et des fragments de larges précurseurs protéiniques dont l'endostatine, la tumstatine et la vasostatine (DiPietro, 1997; O'Reilly *et al.*, 1997; Pike *et al.*, 1998; Watanabe *et al.*, 2004; Sund *et al.*, 2005). Par contre, les mécanismes précis utilisés par ces protéines afin d'inhiber l'angiogenèse ne sont pas encore clairement définis. À l'opposé, les agents pro-angiogéniques ont été largement étudiés et documentés. Ce groupe est formé par plusieurs cytokines et petites protéines incluant les facteurs de croissance des fibroblastes (FGF-1 et -2), des hépatocytes (HGF), dérivés des plaquettes (PDGF) et transformants (TGF- α et - β) ainsi que l'angiopoïétine-1 (Ang-1), l'interleukine-8 (IL-8), la leptine, les prostaglandines, certains lipides et le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF)

Tableau 1.1: Principaux activateurs et inhibiteurs de l'angiogenèse

Activateurs	Fonctions
Membres de la famille VEGF	Stimulent l'angiogenèse, la vasculogenèse, la perméabilité vasculaire et l'adhésion des leucocytes; VEGF-C : stimule la lymphangiogenèse; PlGF : rôle dans l'angiogenèse pathologique
Récepteurs du VEGF	VEGFR-2; récepteur induisant un signalment angiogénique; VEGFR-3 : récepteur induisant un signalment lymphangiogénique
Angiopoïétine-1 et récepteur Tie2	Ang1 : stabilise les vaisseaux en resserrant l'interaction endothéliale-muscle lisse; inhibe la perméabilité
PDGF-BB et ses récepteurs	Recrute les cellules du muscle lisse et péricytes
TGF- β 1, endogline et les récepteurs du TGF- β	Stabilise les vaisseaux en stimulant la production de matrice extracellulaire
FGF, HGF, MCP-1	Stimulent l'angiogenèse (FGF, HGF) et l'artériogenèse (FGF, MCP-1)
Intégrines $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$	Induit la migration des cellules endothéliales; Peut servir comme récepteur pour les métalloprotéinases de matrice
VE-cadhérine, PECAM (CD31)	Molécules de la jonction endothéliale; essentielles à la survie des cellules endothéliales; des anticorps peuvent bloquer l'angiogenèse tumorale
Éphrines	Régule la spécification artérielle/veineuse
Activateur du plasminogène, métalloprotéinases de matrice	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; mauvais pronostic de cancer lorsque la molécule est présente à un niveau élevé dans un extrait tumoral
Synthèse du monoxyde d'azote, cyclooxygénase	Le monoxyde d'azote et les prostaglandines stimulent l'angiogenèse et la vasodilatation; des inhibiteurs de Cox2 inhibent l'angiogenèse tumorale
Autres activateurs	Interleukine 8; leptine; AC133 (récepteur orphelin impliqué dans la différenciation des angioblastes); chimiokines (rôle pléiotropique dans l'angiogenèse); certains inhibiteurs de la différenciation cellulaire

Inhibiteurs	Fonctions
VEGFR-1, VEGFR-1 soluble et NRP-1 soluble	Réquisitionne le VEGF, VEGF-B et PlGF
Angiopoïétine-2	Antagoniste de Ang1 : induit la régression des vaisseaux en absence d'un signal angiogénique
Thrombospondine-1 (TSP-1)	Protéine de matrice extracellulaire; inhibe la migration, la croissance, l'adhésion et la survie des cellules endothéliales; la protéine similaire TSP-2 inhibe aussi l'angiogenèse
Meth-1, Meth-2	Inhibiteurs contenant des domaines montrant des similitudes avec les métalloprotéinases, les thrombospondines et les disintégrines
Angiostatine et « <i>Related plasminogen kringles</i> »	Fragments protéolytiques du plasminogène; inhibent la migration et la survie des cellules endothéliales
Endostatine	Fragment du collagène de type XVIII, inhibe la migration et la survie des cellules endothéliales
Vasostatine, calréticuline	La calréticuline et son fragment N-terminal, la vasostatine, inhibent la croissance des cellules endothéliales
Facteur Plaquettaire 4	Chimiokine CXC liant l'héparine; inhibe la liaison du bFGF et du VEGF
Inhibiteurs tissulaires des MMP (TIMP), inhibiteurs des MMP, PEX	Supprime l'angiogenèse pathologique; PEX : fragment protéolytique du MMP2, bloque la liaison du MMP2 à l'intégrine $\alpha_v\beta_3$
Interférons (INF) α , β , γ ; IP-10, IL-4, IL-12, IL-18	Cytokines et chimiokines, inhibent la migration endothéliale; INF α régule le bFGF de façon négative
Prothrombine kringle - 2; fragment anti-thrombine III	Fragments de la prothrombine, supprime la croissance des cellules endothéliales
Autres inhibiteurs	Tumstatine; prolactine (inhibe bFGF/VEGF); canstatine (fragment de la chaîne α_2 du collagène); maspine; troponine-1 (inhibe l'ATPase actomyosine); VEGI (membre de la famille TNF); restine (domaine NC10 du collagène XV); fragment de SPARC (inhibe la liaison et l'activité endothéliale du VEGF); fragment de l'ostéopontine (contient une séquence RGD)

(Folkman and D'Amore, 1996; Carmeliet and Collen, 1997; Sierra-Honigmann *et al.*, 1998; Tachibana *et al.*, 1998; Carmeliet, 2000; Yancopoulos *et al.*, 2000). Parmi ceux-ci, le plus puissant facteur induisant l'angiogenèse, qu'elle soit physiologique ou pathologique, c'est le VEGF (Dvorak, 2005; Ferrara and Kerbel, 2005). En effet, parmi les facteurs décrits plus haut, certains (TGF- α et - β , HGF, FGF-2) régulent positivement l'angiogenèse en partie en induisant l'expression du VEGF (Brown *et al.*, 1997). De même, la diminution ou la surexpression de cette cytokine durant le développement embryonnaire résulte en la formation d'un réseau vasculaire anormal (Drake and Little, 1995; Carmeliet *et al.*, 1996; Ferrara *et al.*, 1996). Finalement, le VEGF est impliqué dans la majorité des pathologies résultantes d'une angiogenèse dérégulée (sous- ou sur-induite). Par exemple, le VEGF est le principal facteur de croissance responsable de l'angiogenèse rétinienne pouvant causer des rétinopathies prolifératives (Kvanta, 2006). Enfin, l'une des principales thérapies anti-angiogéniques utilisées dans le traitement du cancer est basée sur l'inhibition de cette cytokine au moyen d'un anticorps monoclonal anti-VEGF (Avastin®) (Hurwitz *et al.*, 2004; Ferrara *et al.*, 2005; Ellis, 2005).

1.2 Le VEGF

1.2.1 La famille du VEGF

Lorsque l'on parle du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF), anciennement appelé facteur de perméabilité vasculaire (VPF), on se réfère habituellement à sa principale isoforme, le VEGF-A₁₆₅, une glycoprotéine sécrétée de 23 kDa qui forme des dimères (Zachary and Gliki, 2001; Ng *et al.*, 2006). Par contre, les VEGFs forment une grande famille de facteurs de croissance caractérisés par la présence de huit résidus cystéines conservés (Muller *et al.*, 1997) (Fig. 1.1). Permettant de transmettre un signal d'une cellule à une autre, le VEGF fait aussi partie de la famille des cytokines (le terme *cytokine* référant à une molécule participant à la communication intercellulaire alors que *facteur de croissance* indique plutôt une molécule induisant la prolifération et la différenciation cellulaire). Bien souvent, les membres de la famille VEGF ont des fonctions biologiques spécifiques et lient les différents récepteurs au VEGF (VEGFR-1, -2 et -3) avec des affinités distinctes (Matsumoto and Mugishima, 2006). Cinq de ces membres, les VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D et le facteur de croissance placentaire (PlGF), sont exprimés de façon endogène chez les mammifères. Au contraire, le VEGF-E est encodé par le virus à double lien d'ADN *orf* et le svVEGF est présent dans le venin de serpent (Zachary *et al.*, 2001; Junqueira de Azevedo *et al.*, 2001). En plus de ces différents VEGFs, le VEGF-A compte lui-même plusieurs isoformes ayant des activités biologiques distinctes. En effet, le gène humain du VEGF-A, localisé au chromosome 6p21.3 (Vincenti *et al.*, 1996), est organisé en huit exons séparés par sept introns permettant ainsi un épissage alternatif (Tischer *et al.*, 1991; Houck *et al.*, 1991). Ceci génère au moins 8 isoformes différentes : les VEGF-A₁₂₁, VEGF-A₁₄₅, VEGF-A₁₄₈, VEGF-A₁₆₂, VEGF-A₁₆₅, VEGF-A₁₈₃, VEGF-A₁₈₉ et VEGF-A₂₀₆, le chiffre référant au nombre d'acides aminés formant la protéine mature et sécrétée (Fig. 1.1)

(Bates and Harper, 2002; Lange *et al.*, 2003). Chacune de ces isoformes possède une spécificité distincte pour les récepteurs VEGFR-1 et -2 dont il sera discuté plus loin dans ce chapitre. Cependant, il est intéressant de noter que toutes ces isoformes ont le potentiel de lier les récepteurs VEGFR-1 et -2. En effet, les sites d'interaction avec ces récepteurs sont compris dans les exons 3 et 4, lesquels sont conservés chez les huit isoformes de VEGF-A (Robinson and Stringer, 2001). Ce sont donc les différentes combinaisons d'exons 6 à 8 qui déterminent les propriétés biochimiques distinctes associées à chaque isoforme. Un exemple de ceci est la

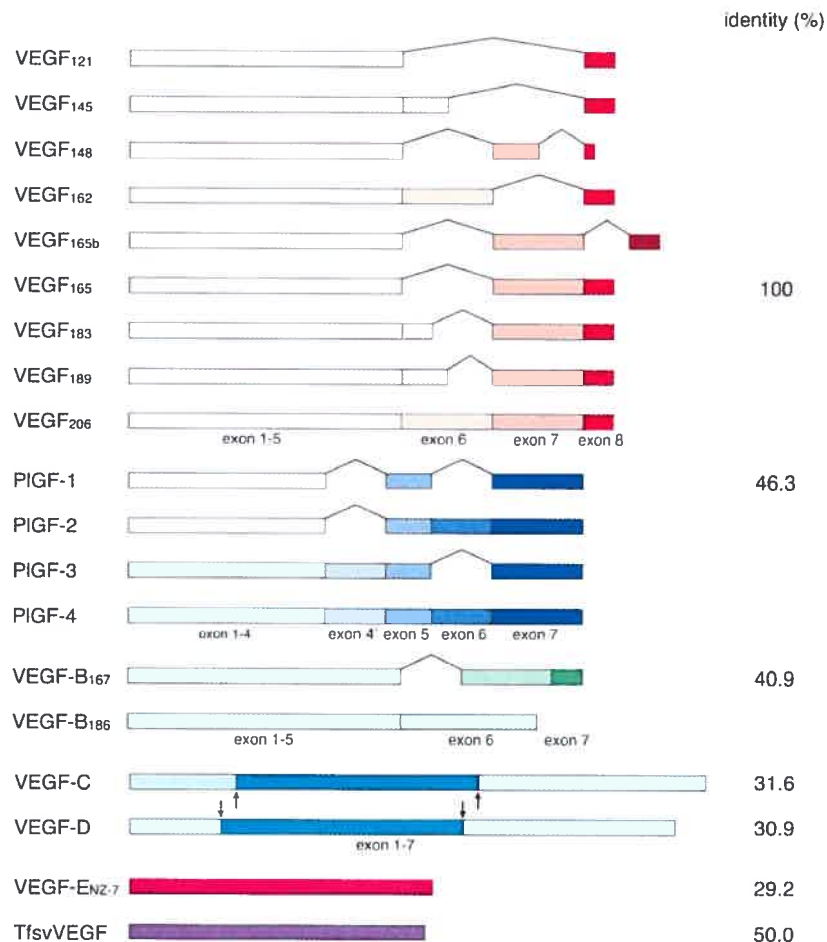


Figure 1.1 : Structure des différents membres de la famille VEGF - Nous pouvons observer les différences d'épissage parmi les différentes formes du VEGF ainsi que le pourcentage de similitude, au niveau de la séquence d'acides aminés, entre certains membres de la famille VEGF et le VEGF-A₁₆₅. Figure obtenue de (Takahashi and Shibuya, 2005).

capacité à lier les protéoglycanes héparan sulfate (HSPGs), une composante de la matrice extracellulaire, et par conséquent la capacité de diffusion des différents VEGF-A. En effet, le domaine de liaison aux HSPGs est encodé par les exons 6 et 7 du VEGF-A. Ceci implique que le VEGF-A₁₂₁ (composé des exons 1-5 et 8) ne peut lier les HSPGs tandis que le VEGF-A₁₆₅ (exons 1-5 et 7-8) interagit modérément avec ceux-ci et que le VEGF-A₁₈₉ (exons 1-5, 7-8 et une partie du 6) peut les lier fortement (Houck *et al.*, 1992; Park *et al.*, 1993; Robinson *et al.*, 2001). Cette interaction rend le VEGF-A₁₂₁ diffusible, le VEGF-A₁₆₅ partiellement diffusible et le VEGF-A₁₈₉ clairement associé à la matrice extracellulaire. Cette fraction de cytokine, liée à la membrane cellulaire, constitue un réservoir de facteur de croissance pouvant être relâché rapidement à la suite d'un clivage au niveau du C-terminal de la molécule par la plasmine ou l'urokinase (Plouet *et al.*, 1997). Un autre exemple tient compte des différents rôles joués par les isoformes du VEGF-A durant le développement vasculaire. Ainsi, les souris exprimant seulement l'isoforme VEGF-A₁₂₀ (le VEGF murin contenant un acide aminé de moins) meurent après la naissance à la suite d'une cardiopathie ischémique (Carmeliet *et al.*, 1999). Au contraire, les souris exprimant seulement l'isoforme VEGF-A₁₈₈ survivent mais ont une déficience dans le développement artériel rétinien alors que celles exprimant seulement l'isoforme VEGF-A₁₆₄ sont normales (Maes *et al.*, 2004). Ceci souligne le rôle essentiel joué par l'isoforme majeure du VEGF, le VEGF-A₁₆₅, dans l'établissement du réseau vasculaire.

1.2.2 Régulation et sites d'expression du VEGF

Le VEGF est une cytokine produite dans les cellules endothéliales mais aussi dans les macrophages, les cellules-T activées, et plusieurs autres types cellulaires (Freeman *et al.*, 1995; Ferrara and vis-Smyth, 1997; Melter *et al.*, 2000). Cette expression est régulée par l'hypoxie ainsi que par certains facteurs de croissance, hormones et oncogènes (Ferrara, 2004). Plus en détails, parmi ces régulateurs on retrouve les facteurs de croissance de l'épiderme (EGF) et des kératinocytes

(KGF), l'IGF-1 (*Insulin-like growth factor*), le TGF- α et - β , le FGF et le PDGF (Pertovaara *et al.*, 1994; Frank *et al.*, 1995; Warren *et al.*, 1996). Aussi, il a été démontré que les hormones thyroïdienne (TSH) et adrénocorticotrope (ACTH) induisent l'expression du VEGF dans plusieurs lignées cellulaires de carcinome thyroïdien et dans des cellules de glande surrénale foetale humaine en culture, respectivement (Soh *et al.*, 1996; Shifren *et al.*, 1998). Enfin, certaines mutations oncogéniques et amplifications de Ras résultent en une augmentation de l'expression du VEGF (Grugel *et al.*, 1995; Okada *et al.*, 1998). Par contre, tout comme pour l'angiogenèse, le principal stimulus menant à une augmentation de la quantité d'ARNm du VEGF est l'hypoxie. Ce processus requiert l'activateur transcriptionnel hétérodimérique HIF-1 (*hypoxia-inducible factor*) lequel est composé de deux sous-unités exprimées de façon constitutive, les HIF-1 α et β . Sous des conditions d'oxygénation normales, HIF-1 α est rapidement hydroxylée sur son résidu proline 564 par la prolyl-4-hydroxylase, une enzyme dont l'activité requiert de l'oxygène. Cette hydroxylation permet à la sous-unité α de HIF-1 d'interagir avec le facteur suppresseur de tumeur pVHL (*von Hippel-Lindau*), protéine faisant partie d'un complexe présentant une activité E3 ubiquitine ligase. La pVHL dirige donc l'ubiquitination du HIF-1 α , ce qui ultimement causera la dégradation de cette molécule par le protéasome. Par contre, sous des conditions hypoxiques, l'hydroxylation n'a pas lieu et par conséquent la dégradation est empêchée (Jaakkola *et al.*, 2001; Ivan *et al.*, 2001). Dans ce cas, l'hétérodimère HIF-1 peut se former, lier la séquence de 28 nucléotides responsable de la régulation de la transcription du VEGF par l'hypoxie (hypoxia-responsive element-HRE) et ainsi induire la synthèse de ce facteur de croissance (Liu *et al.*, 1995b).

1.2.3 Rôles du VEGF

1.2.3.1 Effets du VEGF sur les cellules endothéliales et hématopoïétiques

Les exemples démontrant l'implication du VEGF dans l'induction de la perméabilité vasculaire, de la prolifération, de la survie et de la migration des

cellules endothéliales ainsi que ses effets sur l'hématopoïèse ne manquent pas. Ainsi, il est intéressant de souligner que cette cytokine induit l'angiogenèse dans des essais tridimensionnels *in vitro* en stimulant des cellules endothéliales microvasculaires à envahir le collagène et former des structures de type capillaires (Pepper *et al.*, 1992; Pepper *et al.*, 1994). Son utilisation *in vitro* prévient l'apoptose induite par le sevrage alors que son inhibition *in vivo* donne lieu à des changements majeurs du réseau vasculaire néonatal résultant de l'apoptose des cellules endothéliales (Gerber *et al.*, 1999a; Ferrara, 2004). Son rôle dans la régulation de la perméabilité vasculaire est aussi clairement observable, le VEGF induisant des fenestrations endothéliales dans certains lits vasculaires (Roberts and Palade, 1995) ainsi que dans des cellules endothéliales de glandes surrénales en culture (Esser *et al.*, 1998). Il induit également la désorganisation de certaines protéines des jonctions endothéliales telles que la cadhérine de l'endothélium vasculaire (VE-cadhérine) et l'occludine (Kevil *et al.*, 1998). Finalement, le VEGF joue un rôle important dans le contrôle de la survie des cellules souches hématopoïétiques (HSC). En effet, l'ablation sélective du gène du VEGF dans des cellules mononucléaires de la moelle osseuse (BMMNC) et HSC se traduit par une incapacité de ces cellules déficientes à repeupler le sang et la moelle osseuse des hôtes létalement irradiés (Gerber *et al.*, 2002).

1.2.3.2 Implications physiologiques du VEGF

Le rôle du VEGF dans l'induction de l'angiogenèse l'amène à prendre part dans plusieurs processus physiologiques. Parmi ceux-ci on retrouve le développement embryonnaire et postnatal, la croissance squelettique, la cicatrisation des plaies et le cycle menstruel. En effet, tel que mentionné plus tôt, le VEGF est essentiel à la vasculogenèse et l'angiogenèse embryonnaire, l'inactivation d'une seule allèle du gène du VEGF se traduisant par une létalité embryonnaire aux jours 11-12 de gestation (Carmeliet *et al.*, 1996; Ferrara *et al.*, 1996). Ces embryons VEGF^{+/-} montrent plusieurs anomalies développementales, une vascularisation déficiente

de certains organes et une diminution du nombre de globules rouges dans les flots sanguins de la vésicule ombilicale. Ces conséquences étant encore plus accentuées par l'inactivation complète du gène (embryons VEGF^{-/-}). De plus, son inhibition durant la vie postnatale précoce et tardive, obtenue via l'inactivation inductible du gène par le système Cre-loxP, donne lieu à une augmentation de la mortalité, une croissance rachitique du corps et un développement compromis des organes (Gerber *et al.*, 1999a). Aussi, le blocage du VEGF au moyen d'anticorps monoclonaux chez la souris ou le primate en développement se traduit par la suppression de l'invasion du cartilage par les vaisseaux sanguins ainsi qu'une formation déficiente de l'os trabéculaire (Ryan *et al.*, 1999; Gerber *et al.*, 1999b). Pour finir, l'administration d'inhibiteurs du VEGF au cours du cycle menstruel supprime l'angiogenèse lutéale et retarde le développement folliculaire (Fraser *et al.*, 2000; Zimmermann *et al.*, 2001).

1.2.3.3 Implications pathologiques du VEGF

Le VEGF est impliqué dans plusieurs conditions pathologiques incluant la progression et l'invasion tumorale, l'œdème cérébral, l'inflammation ainsi que certains syndromes de néovascularisation intraoculaires et pathologies des organes reproductifs féminins. Par exemple, le diabète mellitus et l'occlusion de la veine centrale rétinienne sont associés à une ischémie rétinienne qui peut induire l'expression du VEGF. Cette surexpression de la cytokine peut mener à une néovascularisation intraoculaire souvent suivie d'hémorragie, du détachement de la rétine, de glaucomes néovasculaires et de cécité (Malecaze *et al.*, 1994; Aiello *et al.*, 1994; Garner, 1994). Ainsi, des études animales utilisant des inhibiteurs du VEGF ont démontré le rôle de cette cytokine dans la néovascularisation intraoculaire induite par l'ischémie (Aiello *et al.*, 1995; Adamis *et al.*, 1996). Du côté de l'œdème cérébral, des niveaux plus élevés de VEGF et de ses récepteurs ont été observés dans le cerveau de souris où une ischémie cérébrale focalisée a été induite (Kovacs *et al.*, 1996). Finalement, nous avons vu précédemment que le

VEGF est l'un des principaux régulateurs de l'angiogenèse puis que ce processus est grandement impliqué dans le développement tumoral. De plus, il est connu que l'ARNm du VEGF est augmenté dans plusieurs tumeurs humaines (Dvorak *et al.*, 1995; Ferrara *et al.*, 1997). Il n'est donc pas surprenant qu'un inhibiteur de cette cytokine, l'Avastin®, soit présentement utilisé, en combinaison avec la chimiothérapie, dans le traitement du cancer (Hurwitz *et al.*, 2004; Ferrara *et al.*, 2005; Ellis, 2005).

1.3 Les récepteurs du VEGF

Le VEGF est connu pour avoir la capacité de lier cinq récepteurs; les récepteurs au VEGF de type-1, -2 et -3 (VEGFR-1, -2 et -3) ainsi les récepteurs-1 et -2 de la neuropiline (NRP-1 et -2). Parmi ceux-ci, seulement les VEGFR-1, -2 et -3 sont bien connus pour leur implication dans l'induction de la signalisation intracellulaire suite à une stimulation au VEGF. Ces derniers appartiennent à la grande famille de récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK) et partagent une structure caractérisée par sept domaines extracellulaires de type immunoglobuline, une région transmembranaire hydrophobique ainsi qu'une séquence intracellulaire tyrosine kinase interrompue par un domaine insert kinase (Fig. 1.2) (Shibuya *et al.*, 1990; Terman *et al.*, 1991).

1.3.1 Les NRP-1 et -2

Le NRP-1 est une glycoprotéine de surface initialement identifiée en tant que récepteur pour la famille des collapsines/sémaphorines et pour son implication dans le guidage axonal alors que le NRP-2 fut découvert par son homologie de séquence avec le NRP-1 (Neufeld *et al.*, 2002). On sait maintenant que le NRP-1 peut aussi lier le VEGF-A₁₆₅, le VEGF-B, le PlGF-2 et certaines variantes du VEGF-E. Quant à lui, le NRP-2 interagit avec le VEGF-A₁₄₅, le VEGF-A₁₆₅, le PlGF-2 et le VEGF-C. Ces récepteurs ont toutefois des domaines intracellulaires courts qui ne leur permettent pas d'engager de réponse cellulaire suite à leur liaison au VEGF. À ce jour, il semblerait que les NRP-1 et -2 aient plutôt un rôle de co-récepteur où ils présenteraient le VEGF au récepteur de type-2 (VEGFR-2) de manière à augmenter l'efficacité de la signalisation par ce dernier. Dans le même ordre d'idées, il a été démontré que la co-expression du VEGFR-2 et du NRP-1 à la surface des cellules endothéliales augmente la liaison VEGF/VEGFR-2

(Soker *et al.*, 1998), l'autophosphorylation du récepteur, la synthèse du facteur d'activation plaquettaire (PAF) et la prolifération/migration des cellules endothéliales stimulées par le VEGF (Bernatchez *et al.*, 2002).

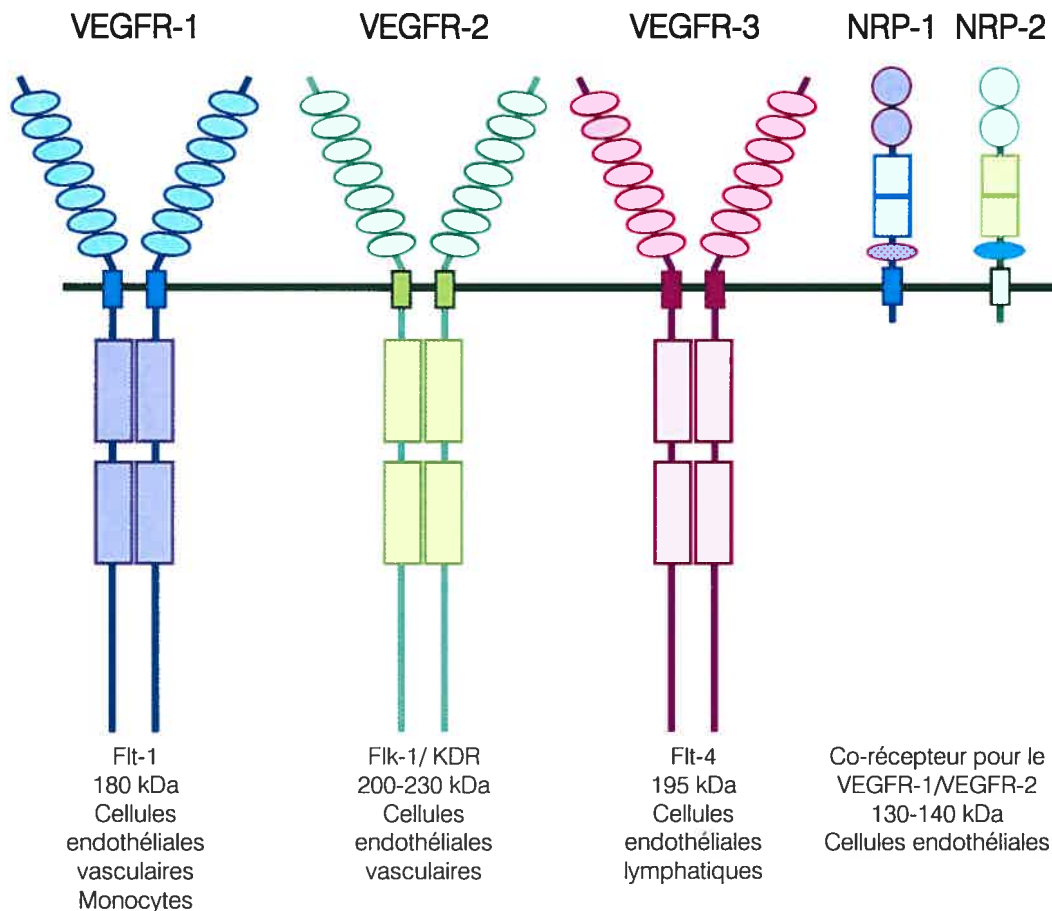


Figure 1.2 : Représentation schématique des différents récepteurs liés par le VEGF- VEGFR-1, -2 et -3, On peut observer la structure de ces trois récepteurs de type tyrosine kinase caractérisée par sept domaines de type immunoglobuline (ovales), un domaine transmembranaire (petit rectangle), un domaine tyrosine kinase interrompu par un insert (grands rectangles) et une queue carboxy-terminal. NRP-1 et -2, Ces récepteurs sont composés d'un court domaine intracellulaire, d'un domaine transmembranaire (petit rectangle), d'un domaine MAM (ovale), de deux domaines similaires aux domaines C1 et C2 des facteurs de coagulation VIII et V (carrés) et de deux domaines similaires aux régions non-catalytiques des composantes du complément C1r et C2r (cercles). Dans le bas de la figure ont retrouvé les synonymes des noms de chaque récepteur, leurs poids moléculaire et les types cellulaires où ils sont exprimés. Figure adaptée de (Takahashi *et al.*, 2005).

1.3.2 Le VEGFR-1

De son côté, le VEGFR-1 (aussi appelé Flt-1) est une protéine de 180 kDa possédant une forte affinité envers le VEGF-A, -B, PlGF et sVEGF. Il est exprimé tant dans des cellules endothéliales vasculaires que dans les macrophages, monocytes et les cellules souches hématopoïétiques (Sawano *et al.*, 2001; Hattori *et al.*, 2002). Suite à sa stimulation, il induit la migration de plusieurs types cellulaires dont : les cellules endothéliales (Kanno *et al.*, 2000), les monocytes et les macrophages (Sawano *et al.*, 2001) ainsi que les cellules souches hématopoïétiques (Hattori *et al.*, 2002). Par contre, même s'il lie le VEGF-A et qu'il est exprimé par les cellules endothéliales vasculaires, il ne participe que très faiblement à la réponse endothéliale induite par cette cytokine. Par exemple, la survie et la prolifération des cellules endothéliales n'est que très faiblement induite lorsque stimulées par des ligands spécifiques au VEGFR-1 (Takahashi *et al.*, 2005). En fait, même si le VEGFR-1 lie le VEGF-A avec une affinité au moins 10 fois plus grande que le VEGFR-2, il ne s'ensuit qu'une très faible autophosphorylation de ses résidus tyrosines en réponse à cette stimulation (deVries *et al.*, 1992; Waltenberger *et al.*, 1994). Ceci a amené certains chercheurs à proposer que le VEGFR-1, en séquestrant le VEGF et le rendant moins disponible pour le VEGFR-2, serait un régulateur négatif de l'activité de cette cytokine sur l'endothélium vasculaire (Park *et al.*, 1994). C'est à tout le moins le cas lors du développement embryonnaire. En effet, les souris déficientes pour le gène du VEGFR-1 meurent *in utero* entre les jours 8.5 et 9.5 (Fong *et al.*, 1995) et, contrairement à ce que l'on peut penser, cette létalité est causée par une prolifération excessive des angioblastes (Fong *et al.*, 1995; Fong *et al.*, 1999). Toutefois, une forme mutante du VEGFR-1, n'ayant plus de domaine tyrosine kinase mais pouvant toujours lier le VEGF, ne cause pas de létalité ou de défaut de développement vasculaire (Hiratsuka *et al.*, 1998). Aussi, une forme soluble du VEGFR-1 (sVEGFR-1), résultante d'un épissage alternatif, est connue pour inhiber l'activité du VEGF (Kendall and Thomas, 1993). Ceci est probablement dû à la

séquestration du VEGF-A par un hétérodimère sVEGFR-1/VEGFR-2 incapable d'induire la cascade de signalisation intracellulaire (Kendall *et al.*, 1996).

1.3.3 Le VEGFR-3

Le VEGFR-3 est une protéine de 195 kDa ayant une grande affinité pour le VEGF-C et -D (Takahashi *et al.*, 2005) mais ne liant pas le VEGF-A. Il est exprimé dans les cellules endothéliales lymphatiques (Claesson-Welsh, 2003) où il joue un rôle important au cours de la lymphangiogenèse. En effet, l'expression d'une forme soluble du VEGFR-3 inhibe la lymphangiogenèse foetale et induit la régression des vaisseaux lymphatiques déjà formés (Makinen *et al.*, 2001). De plus, la stimulation du VEGFR-3 par ses agonistes protège les cellules endothéliales lymphatiques de l'apoptose induite par le sevrage du sérum (Takahashi *et al.*, 2005).

1.3.4 Le VEGFR-2

Le récepteur de type 2 du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGFR-2), aussi appelé kinase du foie foetal (Flk-1) chez la souris et récepteur contenant un domaine kinase (KDR) chez l'humain, est un RTK de 200-230 kDa liant les VEGF-A, -C, -D, -E et sVEGF (Takahashi *et al.*, 2005). Il est exprimé dans les cellules endothéliales vasculaires et lymphatiques ainsi que dans plusieurs autres types cellulaires tels que les mégacaryocytes et les cellules souches hématopoïétiques (Kato *et al.*, 1995). Même si le VEGF a relativement moins d'affinité pour le VEGFR-2 que pour le VEGFR-1, il est maintenant amplement reconnu que le VEGFR-2 est le principal médiateur des effets mitogéniques, angiogéniques et perméabilisants de cette cytokine (Takahashi *et al.*, 2005). La principale évidence de ceci vient du rôle central joué par ce récepteur dans l'angiogenèse et l'hématopoïèse embryonnaire. En effet, tout comme les souris VEGFR-1^{-/-}, les souris déficientes pour le gène VEGFR-2 (VEGFR-2^{-/-}) meurent *in utero* entre les jours 8.5-9.5 de gestation. Par contre, dans le cas des souris

VEGFR-2 la létalité est causée par une vasculogénèse déficiente ainsi que par l'incapacité à former des îlots sanguins et des vaisseaux sanguins organisés (Shalaby *et al.*, 1995). De plus, des formes mutantes du VEGF, pouvant lier spécifiquement le VEGFR-2, agissent sur les cellules endothéliales en tant qu'agents mitogéniques, chimioattractants et perméabilisants pleinement actifs (Gille *et al.*, 2001). De même, le VEGF-E, un ligand spécifique naturel pour le VEGFR-2, montre des effets mitogéniques et perméabilisants (Ogawa *et al.*, 1998; Wise *et al.*, 1999). Finalement, l'activation du VEGFR-2, mais pas celle du VEGFR-1, est requise afin de transmettre les effets anti-apoptotiques du VEGF sur des cellules endothéliales en culture (Gerber *et al.*, 1998).

1.3.5 La signalisation intracellulaire induite par le VEGFR-2

La plupart de la signalisation cellulaire fonctionnelle du VEGF décrite à ce jour est médiée par le VEGFR-2. En effet, ce récepteur active une multitude de voies de signalisation menant à l'induction de la prolifération, de la survie et de la migration des cellules endothéliales par cette cytokine (Fig. 1.3).

1.3.5.1 Induction de la prolifération des cellules endothéliales

La principale voie de signalisation menant à la prolifération des cellules endothéliales est médiée via l'activation d'ERK-1 et -2 (*extracellular signal-regulated kinase*). Le VEGFR-2 favorise l'activation de ces protéines par deux mécanismes intracellulaires distincts; soit par la voie classique dépendante Ras ou au moyen d'une voie qui lui est unique et qui est basée sur l'activation de la phospholipase C- γ (PLC- γ) (Fig. 1.3). En effet, le VEGFR-2 peut directement activer la PLC- γ laquelle hydrolysera le phosphatidylinositol-4,5-biphosphate afin de produire du diacylglycerol (DAG) et l'inositol-triphosphate (IP₃). Ceci causera ultimement une augmentation du calcium intracellulaire et l'activation de la protéine kinase C (PKC). Finalement, cette kinase agira au niveau de Raf-1 lequel, une fois activé, phosphorylera et activera les kinases MEK-1 et 2. Celles-ci vont à

leur tour phosphoryler et activer les protéines kinases spécifiques aux sérines/thréonines : les ERK-1 et -2 (Doanes *et al.*, 1999; Takahashi *et al.*, 1999; Gliko *et al.*, 2001).

On a longtemps pensé que l'induction de la prolifération des cellules endothéliales par le VEGFR-2 était uniquement dépendante de la PLC- γ et

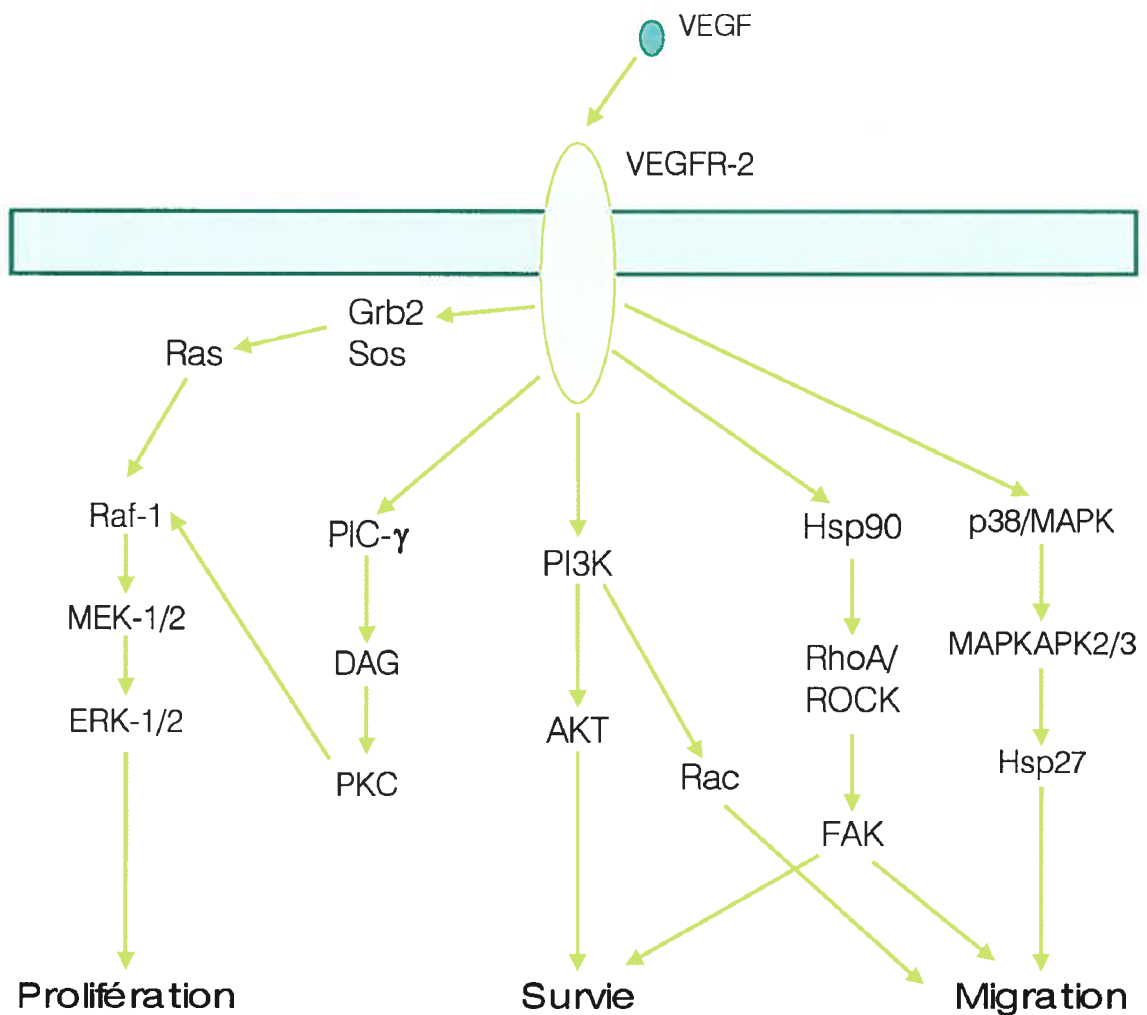


Figure 1.3 : Signalisation intracellulaire induite par le VEGFR-2 – La stimulation du VEGFR-2 par le VEGF induit les réponses cellulaires endothéliales caractéristiques à cette cytokine qui sont la prolifération, via l'activation des MAPKs ERK-1 et -2, la survie, suite à l'activation de la voie de la PI3K/Akt et la migration par l'activation de la MAPK p38, de FAK et de la PI3K. Note : le VEGF mentionné ci-haut réfère à la principale isoforme de la cytokine, le VEGF-A₁₆₅.

indépendante de Ras. On sait maintenant que la voie classique d'activation des ERKs par les RTKs est aussi impliquée lors de ce processus (Meadows *et al.*, 2001). Ainsi, il a été démontré que le VEGF induit l'activation de Ras et que cette étape est essentielle à l'induction de la prolifération des cellules endothéliales par cette cytokine (Meadows *et al.*, 2001). De plus, on sait que le VEGFR-2 contient une séquence consensus de liaison pour l'adaptateur Grb2 (Songyang *et al.*, 1993;Takahashi *et al.*, 2001), une protéine connue pour interagir avec le facteur d'échange nucléotidique Sos. Par conséquent, l'interaction avec le VEGFR-2 amènerait le complexe Grb2/Sos près de la membrane plasmique où il peut activer la petite GTP-ase Ras. Ras étant le principal activateur de Raf-1, la cascade Raf-MEK-1/2-ERK-1/2 serait alors enclenchée (Munoz-Chapuli *et al.*, 2004).

Par contre, que ce soit par l'une ou l'autre des ces voies, les kinases ERK-1 et 2 activées seront rélocalisées au noyau où elles activeront la transcription de facteurs impliqués dans la prolifération cellulaire tels que; Elk-1, c-Myc, c-Fos, Ets-1, SFR et plusieurs autres (Kanno *et al.*, 2000;Wu *et al.*, 2000a).

1.3.5.2 Induction de la survie des cellules endothéliales

L'une des étapes importantes du processus angiogénique est la dégradation de la matrice extracellulaire. Par conséquent, les cellules impliquées dans l'angiogenèse requièrent de forts signaux de survie/anti-apoptotiques afin d'éviter la mort cellulaire programmée induite par le manque d'adhésion (Frisch and Ruoslahti, 1997).

Le principal mécanisme par lequel le VEGF initie des signaux pro-survie est via l'activation de la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) et son plus important médiateur, la kinase anti-apoptotique Akt/protéine kinase B (PKB) (Gerber *et al.*, 1998;Thakker *et al.*, 1999). En effet, il a clairement été démontré que le wortmannin, un inhibiteur spécifique pour la PI3K, et le LY294002, une forme dominante négative d'Akt, bloquent la survie des cellules endothéliales même

lorsque stimulée par le VEGF (Gerber *et al.*, 1998). Plus en détails, la liaison du VEGFR-2 par le VEGF cause l'activation de l'enzyme PI3K de classe IA, laquelle phosphorylera du phosphatidylinositol-4,5-biphosphate (PIP₂) afin de produire du phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate (PIP₃). Le PIP₃ permettra une relocalisation membranaire d'Akt, amenant la kinase à proximité de ses protéines activatrices : PDK1 et PDK2 (*phosphoinositol-dependent kinase-1 et 2*). Ceci résultera en la phosphorylation d'Akt sur ses résidus thréonine 308 et sérine 473, donnant ainsi une enzyme pleinement active (Fresno Vara *et al.*, 2004; Song *et al.*, 2005). Une fois activée, Akt retournera au cytoplasme où elle agira sur deux classes de protéines : 1) elle inhibera l'activité de protéines pro-apoptotiques telles que Bad, Bax et la caspase 9; 2) elle augmentera le niveau de certaines protéines anti-apoptotiques dont A1 et Bcl-2 (Gerber *et al.*, 1998; Brunet *et al.*, 1999). De plus, Akt induira la transcription de molécules anti-apoptotiques telles que les protéines inhibitrices d'apoptose (IAPs) en promouvant la relocalisation nucléaire du facteur de transcription NFκB (Romashkova and Makarov, 1999).

Un deuxième mécanisme par lequel le VEGF induit la survie cellulaire implique l'activation de la protéine kinase de contacts focaux (FAK), une protéine reconnue pour son rôle dans le maintien des signaux de survie dans plusieurs types de cellules adhérentes dont les cellules endothéliales (Levkau *et al.*, 1998; Ilic *et al.*, 1998). En effet, le VEGF augmente la phosphorylation et le recrutement de FAK, ainsi que celui de la protéine paxilline, au sein de nouveaux foyers d'adhésion dans des cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine (HUVEC) (Abedi and Zachary, 1997). Ceci cause un ancrage de la cellule à la matrice extracellulaire et résulte en l'induction de signaux pro-survie.

1.3.5.3 Induction de la migration des cellules endothéliales

Le VEGFR-2, suite à une stimulation par le VEGF, induit la polymérisation de l'actine, la formation de lamellipodes/filopodes et la contraction des fibres de

myosine menant à la migration cellulaire au moyen de trois principales voies de signalisation.

Pour commencer, le VEGFR-2 induit la phosphorylation de la MAPK p38, laquelle active, à son tour, les protéines kinase activées par MAPK-2 et -3 (MAPKAPK2/3). Ces dernières phosphorylent un modulateur de la polymérisation des fibres F-actine, la protéine Hsp27 (Landry and Huot, 1999). Prouvant ceci, un inhibiteur de la kinase p38, le SB203580, inhibe la réorganisation de l'actine et la migration cellulaire induites par le VEGF (Rousseau *et al.*, 2000). De plus, tel que mentionné plus tôt, le VEGFR-2 induit la phosphorylation et l'activation de FAK, une protéine d'une grande importance dans la régulation de l'assemblage des foyers d'adhésion, de l'organisation du cytosquelette d'actine et de la migration cellulaire (Abedi and Zachary, 1995). Plus en détails, une fois le VEGFR-2 activé, il y a association entre les 130 derniers acides aminés de ce récepteur et la protéine Hsp90. Ceci résulte en l'activation de la petite GTPase RhoA et sa kinase sérine/thréonine associée ROCK puis ultimement en la phosphorylation de FAK sur son résidu tyrosine 407, un événement requis pour l'induction de la migration cellulaire (LeBoeuf *et al.*, 2004). Ainsi, l'inhibition de l'interaction VEGFR-2/Hsp90 par la geldanamycine ainsi que l'utilisation d'un inhibiteur spécifique de ROCK ou des formes dominantes négatives de RhoA et ROCK, résultent en une inhibition de la phosphorylation de FAK sur sa tyrosine 407 (LeBoeuf *et al.*, 2004). De même, l'utilisation d'une forme mutante du VEGFR-2 où les 130 derniers acides aminés du C-terminal ont été supprimés et qui, par conséquent, ne peut plus s'associer avec Hsp90, abolit la migration cellulaire induite par le VEGF (LeBoeuf *et al.*, 2004). Enfin, loin de se limiter à l'induction de signaux pro-survie, l'enzyme PI3K participe aussi lors de la stimulation de la migration des cellules endothéliales par le VEGFR-2. Ainsi, la PI3K est connue pour activer la petite GTPase Rac (Eriksson *et al.*, 2003; Takahashi *et al.*, 2005), une molécule proposée comme étant essentielle dans le développement de la motilité endothéliale induite par le VEGF (Soga *et al.*, 2001). De plus, le monoxyde d'azote (NO) produit suite à l'activation

de la synthèse endothéliale du monoxyde d'azote (eNOS) par la voie de signalisation PI3K/Akt joue un rôle important lors du remodelage du cytosquelette d'actine en fibres de stress induit par le VEGFR-2 (traité plus en détail à la section 1.6.3) (Morales-Ruiz *et al.*, 2000).

1.4 Le monoxyde d'azote

Nous avons vu, à la section précédente, que le VEGFR-2 active une multitude de voies de signalisation intracellulaires, lesquelles participent dans l'induction de la prolifération, de la survie et de la migration des cellules endothéliales par le VEGF. Toutefois, il est maintenant reconnu que le monoxyde d'azote (NO), une molécule de signalisation générée dans les cellules endothéliales par la synthèse endothéliale du monoxyde d'azote (eNOS), joue aussi un rôle central dans la médiation des effets biologiques du VEGF. Ainsi, des souris génétiquement déficientes en eNOS montrent une diminution dans la formation de nouveaux vaisseaux sanguins et dans la perméabilité vasculaire en réponse au VEGF (Fukumura *et al.*, 2001). Aussi, l'inhibition pharmacologique d'eNOS réduit significativement l'extravasation des macromolécules induite par le VEGF (Gratton *et al.*, 2003). La principale fonction de cette molécule chimique relativement simple est d'agir sur les cellules du muscle lisse vasculaire afin d'induire la vasodilatation. Par contre, elle intervient aussi à toutes les étapes de la réponse cellulaire au VEGF menant à l'angiogenèse et à l'induction de la perméabilité vasculaire. Par conséquent, elle est non seulement impliquée dans des conditions physiologiques normales mais aussi dans certaines pathologies, dont l'angiogenèse tumorale et certaines maladies cardiovasculaires, induites par cette cytokine.

1.4.1 Principal rôle du NO : induction de la vasodilatation

La première mention du NO dans la littérature date de 1980 et fut effectuée par Furchgott et Zawadzki. Ces derniers démontraient que la relaxation vasculaire dépendait de l'endothélium ou plus précisément d'un facteur qui plus tard fût appelé facteur relaxant dérivé de l'endothélium (EDRF) (Furchgott and Zawadzki, 1980). Ce n'est qu'en 1988 que Furchgott suggéra, basé sur des similitudes

pharmacologiques, que le EDRF était en fait du NO (Furchgott, 1988). Par contre, avant même d'avoir pu isoler l'EDRF et identifier sa structure chimique, il a été démontré que cette molécule stimulait la formation du second messager guanosine monophosphate cyclique (cGMP) (Rapoport and Murad, 1983). En effet, on sait maintenant qu'une fois généré dans les cellules endothéliales, le NO diffuse vers les cellules du muscle lisse vasculaire où il interagit avec le groupement hème de la guanylate cyclase soluble (sGC) (Fig. 1.4) (Vaandrager and de Jonge, 1996). Ceci active l'enzyme et induit la formation de cGMP à partir de GTP (Moncada *et al.*, 1991). Dans les cellules du muscle lisse, le cGMP ainsi formé activera la protéine kinase dépendante du cGMP, la PKG. Cette dernière phosphorylera plusieurs canaux et pompes ioniques impliqués dans la régulation

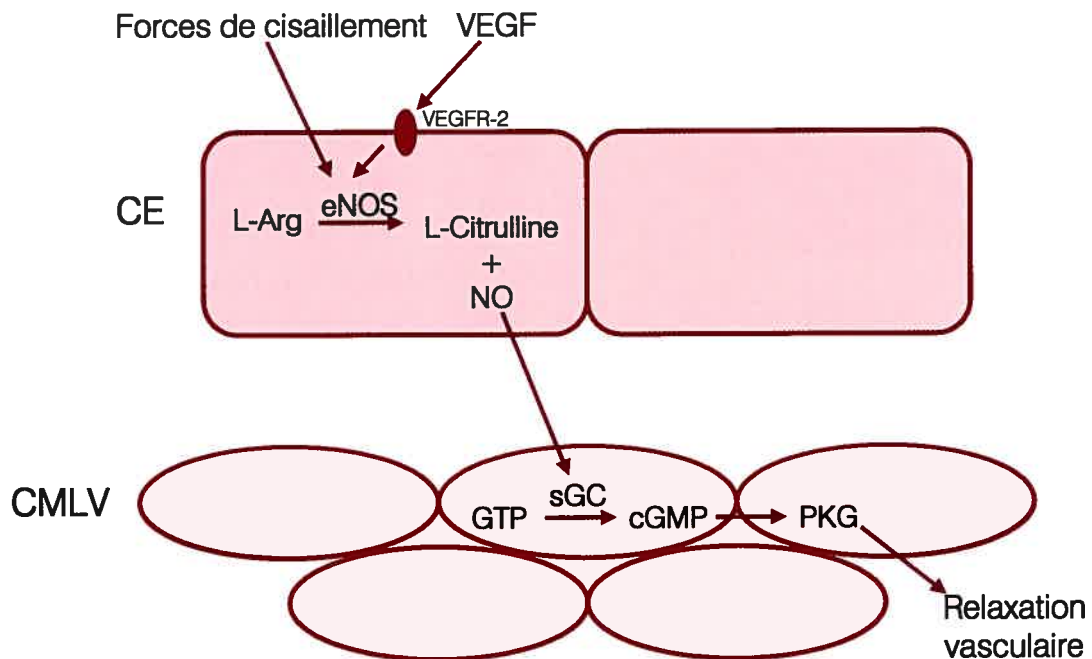


Figure 1.4 : Induction de la relaxation du muscle lisse vasculaire par le NO – Différents stimuli, tels que les forces de cisaillement de l'afflux sanguin et le VEGF, induisent la production de NO dans les cellules endothéliales (CE) via l'activation de l'enzyme eNOS. Le NO diffuse hors des CE, vers les cellules du muscle lisse vasculaire (CMLV), où il agit sur la guanylate cyclase soluble (sGC) afin d'induire la production de guanosine monophosphate cyclique (cGMP), un second messager important de la relaxation musculaire.

du calcium (Ca^{2+}) intracellulaire résultant ainsi en une réduction du Ca^{2+} cytosolique et par conséquent en une relaxation musculaire (Carvajal *et al.*, 2000).

1.4.2 Autres implications physiologiques du NO

Loin de se limiter à la vasodilatation, les actions du NO sur l'organisme sont multiples et comprennent, entre autres, la vasoprotection, la défense immunitaire et la neurotransmission. Trois enzymes se partagent la tâche afin de remplir ces actions physiologiques diversifiées, ce sont les trois membres de la famille des synthétases du monoxyde d'azote (NOS); soit l'isoforme endothéliale, neuronale et inductible de NOS (eNOS, nNOS et iNOS). Chacune de ces enzymes ayant été façonnée pour être localisée et répondre à des stimuli spécifiques afin que le NO remplisse une fonction physiologique précise.

Pour commencer, le NO synthétisé par eNOS agit sur les plaquettes, par un mécanisme dépendant du cGMP, où il remplit une fonction anti-athéroscléreuse/vasoprotectrice. En effet, il inhibe l'agrégation plaquettaire, induit la désagrégation des plaquettes déjà agrégées et inhibe leur adhésion aux fibres de collagène de la matrice cellulaire endothéliale (Radomski *et al.*, 1987a; Radomski *et al.*, 1987b; Radomski *et al.*, 1987c), empêchant ainsi une coagulation inappropriée qui pourrait interférer avec la circulation sanguine.

D'un autre côté, on sait maintenant que du NO dérivé des neurones, généré par nNOS, agit comme neurotransmetteur. Ce NO intervient au niveau de certaines voies non-adrénergiques/non-cholinergiques (NANC) du système nerveux autonome menant à la relaxation musculaire (Gillespie *et al.*, 1989; Li and Rand, 1989). Ainsi, le NO neuronal induit la relaxation intestinale durant le péristaltisme intestinal (Bredt, 1999), régule la circulation sanguine cérébrale (Iadecola *et al.*, 1993) et contrôle la circulation sanguine responsable de l'érection pénienne (Rajfer *et al.*, 1992; Burnett *et al.*, 1992). Aussi, le NO semble agir au niveau du système nerveux central où son signal est essentiel à la plasticité neuronale (Shibuki and Okada, 1991; Schuman and Madison, 1994), un processus

médié par l'augmentation de la relâche de certains neurotransmetteurs (Dickie *et al.*, 1992; Lonart *et al.*, 1992; Hirsch *et al.*, 1993; Bredt, 1999).

Finalement, plusieurs études montrent une corrélation entre la stimulation immunitaire et une synthèse élevée de NO par la synthèse inductible du monoxyde d'azote (iNOS), indiquant que cette molécule pourrait jouer un rôle dans certaines réactions immunitaires (Moncada *et al.*, 1991). Ainsi, les niveaux sanguins et excrétés de NO, dosés sous la forme de nitrite/nitrate, augmentent suite à l'injection de lipopolysaccharide (LPS) à des souris sensibles à cette molécule. De plus, les macrophages activés de ces souris montrent une augmentation, *in vitro*, de la production de NO (Stuehr and Marletta, 1985). Aussi, la synthèse de NO en grande quantité semble limiter la croissance de certaines bactéries, virus, champignons, parasites, levures et même des cellules tumorales. En effet, le NO se combine avec le centre fer-soufre de plusieurs enzymes régulant des fonctions vitales de ces pathogènes/cellules tumorales, telles que la synthèse d'ADN. Ceci inhibe ces enzymes, retardant ainsi la progression de l'infection/de la tumeur.

1.5 La synthèse endothéliale du monoxyde d'azote

Les trois membres de la famille des synthéases du monoxyde d'azote présentés à la section précédente, eNOS, nNOS et iNOS, partagent une grande homologie de séquence (51-57%), (Alderton *et al.*, 2001). Par contre, elles sont toutes encodées par des gènes différents, exprimées dans différents types cellulaires et montrent des différences dans la régulation de leur activité enzymatique et sensibilité envers des inhibiteurs. De plus, on a vu que le NO généré par chacune de ces isoformes a différentes fonctions biologiques. Ainsi, la principale isoforme agissant au niveau de l'endothélium, et dont on discutera en détail au cours de cette section, est la synthéase endothéliale du monoxyde d'azote.

1.5.1 La structure d'eNOS

L'enzyme eNOS est constituée de deux domaines, un domaine oxygénase situé en N-terminal (acides aminés 1-419) et un domaine réductase en C-terminal (acides aminés 492-1205), lesquels sont reliés par un site de liaison à la calmoduline (CaM) (Fig. 1.5). Chacun de ces domaines a des propriétés catalytiques propres, déterminées par la présence de différents sites de phosphorylation et des sites de liaison à différents cofacteurs et régulateurs. Le domaine réductase contient les séquences de liaison pour les flavoprotéines flavine mononucléotide (FMN) et flavine adénine dinucléotide (FAD) ainsi que pour la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) (Sessa *et al.*, 1992). Ce domaine compte aussi l'une des deux boucles d'auto-inhibition (BAI) de l'enzyme, la deuxième se trouvant à l'interface des sections oxygénase- réductase.

Quant à lui, le domaine oxygénase lie une molécule d'hème, le cofacteur tétrahydrobioptérine (BH₄) et le substrat L-arginine (L-Arg). Il contient aussi des

sites de myristoylation (au résidu glycine 2) et de palmitoylation (cystéines 15 et 26) qui participent dans la régulation d'eNOS en déterminant sa localisation intracellulaire (Liu and Sessa, 1994; Liu *et al.*, 1995a).

Finalement, l'activité catalytique d'eNOS requiert la formation d'un homodimère (Crane *et al.*, 1998). En effet, l'interface de dimérisation contient le site de liaison du BH_4 et joue un rôle lors de la structuration des poches de liaison du hème et du substrat (Alderton *et al.*, 2001). Pour les trois isoformes de NOS, la dimérisation se fait surtout via l'interaction de deux domaines oxygénases. Par contre, au niveau de nNOS et eNOS, des interactions entre les domaines réductase et réductase-oxygénase peuvent aussi participer à ce processus (Venema *et al.*, 1997). Il est maintenant reconnu que la liaison d'une molécule de zinc, laquelle interagit avec les résidus cystéines 96 et 101 et le BH_4 de chaque monomère, stabilise la formation du dimère (Raman *et al.*, 1998).

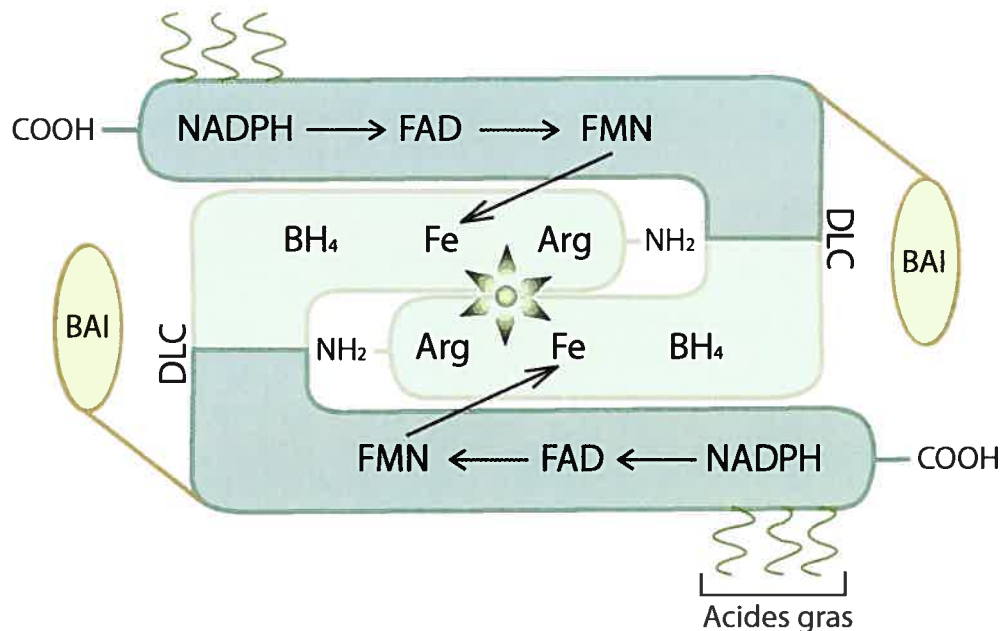


Figure 1.5 : Structure d'eNOS – On remarque les deux monomères formant l'enzyme active; chacun est composé d'un domaine réductase (C-terminal, vert foncé) et oxygénase (N-terminal, vert pâle) séparés par une boucle d'auto-inhibition (BAI). De plus, on peut observer les sites d'acylation, ainsi que de liaison pour les cofacteurs NADPH, FAD, FMN, BH_4 , pour le hème (Fe), le substrat (Arg) et la calmoduline (DLC, domaine de liaison à la calmoduline). Enfin, le zinc nécessaire à la stabilisation du dimère est représenté par une étoile entre les deux domaines oxygénases de l'enzyme. Les flèches représentent le chemin suivi par les électrons lors de la synthèse de NO.

1.5.2 La génération de NO par eNOS

Le NO est synthétisé par une réaction en deux étapes où eNOS converti du L-arginine en L-citrulline et NO via la formation de l'intermédiaire *N*^ω-hydroxy-L-

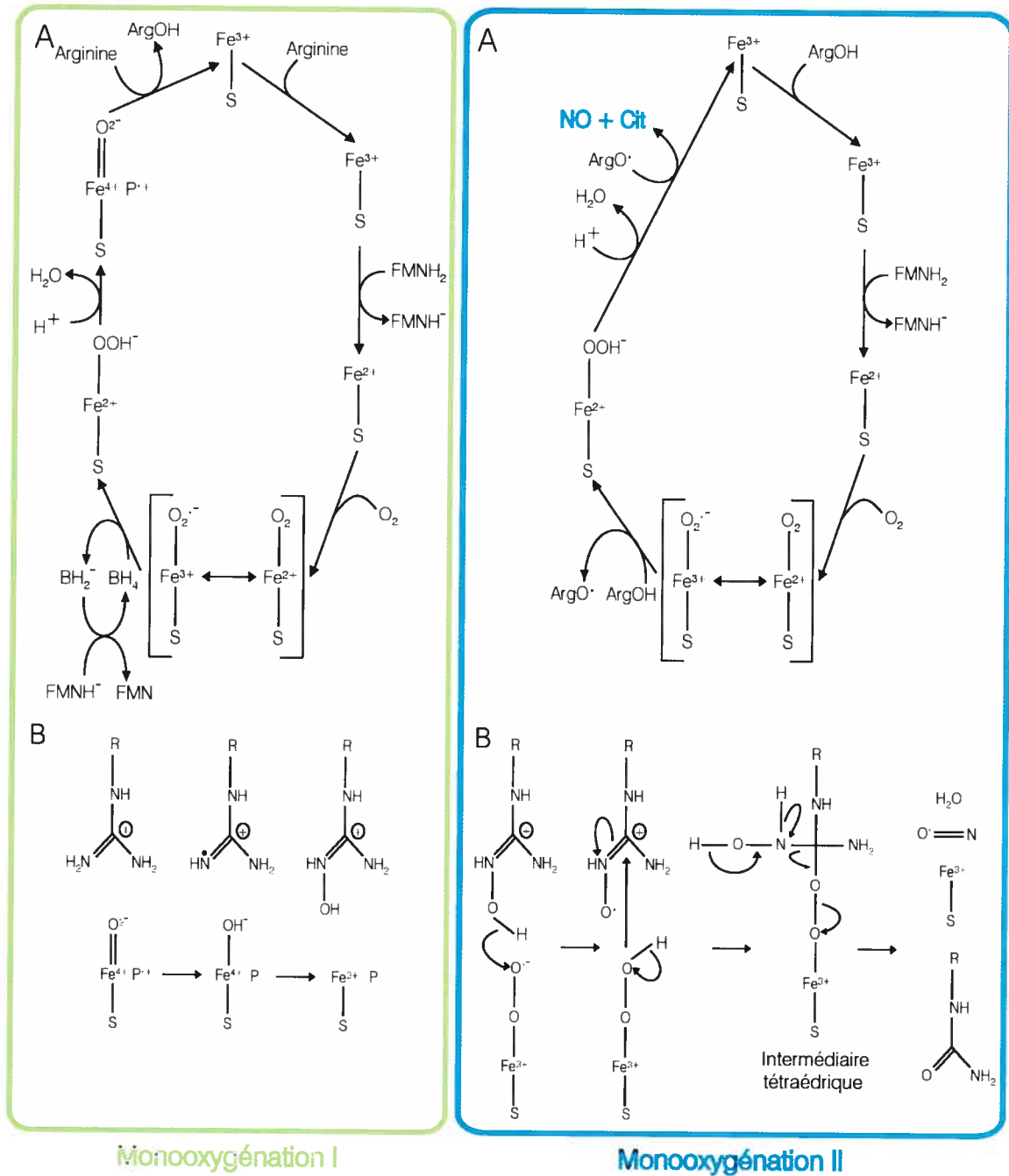


Figure 1.6 : Génération du NO – Mécanismes des réactions de monooxygénation I et II menant à la production de NO par eNOS. Pour chacune des deux réactions on peut voir le mécanisme général (haut) puis le transfert détaillé des électrons au niveau de l'hème (bas). Figure adaptée de (Alderton *et al.*, 2001).

arginine (Fig. 1.6) (Palmer *et al.*, 1988). La première partie de ce mécanisme, la réaction de monooxygénation I, commence par la liaison du NADPH à eNOS et le transfert subséquent de deux électrons, du cofacteur à l'enzyme. Les flavoprotéines FAD et FMN du domaine réductase acceptent les électrons donnés par la NADPH et en transfèrent un à l'hème présent au domaine oxygénase. Fait intéressant, ce flot d'électrons semble traverser d'une sous unité à l'autre, les flavoprotéines d'un monomère donnant des électrons à l'hème de l'autre (Siddhanta *et al.*, 1996). L'addition d'un électron réduit la molécule de fer de l'hème (de Fe^{3+} en Fe^{2+}), lequel peut maintenant lier l'oxygène (Abu-Soud *et al.*, 1997). Il y a formation d'un complexe stable $[Fe^{2+}=O_2^- \leftrightarrow Fe^{3+}=O_2^{\cdot-}]$ lequel est ensuite réduit par le cofacteur BH_4 puis protoné pour former du $Fe^{4+}=O_2^-$ (Hurshman *et al.*, 1999). Ce dernier pourra oxyder une molécule de L-arginine en ajoutant un groupement OH^- sur l'atome d'azote qui fournira le NO. À la suite de cette réaction on aura formé l'intermédiaire N^{ω} -hydroxy-L-arginine (L-Arg-OH) et on reformera l'enzyme ferrique.

À ce point commence la réaction de monooxygénation II, deuxième partie du mécanisme de génération de NO par eNOS. Les flavoprotéines utilisent le deuxième électron donné par le NADPH afin de réduire, encore une fois, le Fe^{3+} en Fe^{2+} . Ce dernier lie une molécule oxygène et réagit avec le L-arginine-OH par la réaction suivante: $[Fe^{3+}=O_2^{\cdot-} + L-Arg-OH \rightarrow Fe^{3+}=OOH^- + L-Arg-O]$. Par la suite, il y a une attaque nucléophile du peroxyde de fer sur le radical d'arginine afin de former un intermédiaire tétraédral où l'arginine est liée à l'enzyme. Enfin, suite à un réarrangement d'électrons cet intermédiaire tétraédral se décompose en NO, L-citrulline et régénère l'hème ferrique (Korth *et al.*, 1994).

1.5.3 La régulation d'eNOS

La régulation d'eNOS est complexe et s'effectue à plusieurs niveaux. Elle comprend entre autres la régulation de l'expression génique et de la localisation intracellulaire. Toutefois, le rôle prédominant dans ce processus se joue au niveau

de la modulation de l'activité enzymatique d'eNOS au moyen d'interactions protéine-protéine avec différents régulateurs et par la phosphorylation de l'enzyme.

1.5.3.1 Régulation d'eNOS au niveau transcriptionnel

Contrairement à la synthèse inductible du monoxyde d'azote (iNOS), laquelle est exprimée en réponse à différents stimuli, eNOS et nNOS sont des enzymes constitutives et donc toujours présentes dans les cellules responsables de leur expression. Par contre, sous certaines conditions, cette expression peut être légèrement modulée. Ainsi, des essais d'expression du gène de la β -galactosidase fusionnée au promoteur d'eNOS résultent en un signal fort dans les vaisseaux sanguins de taille moyenne à grande mais absent dans les artérioles, capillaires et veinules, indiquant que l'expression basale de l'enzyme dépend grandement du tissu (Teichert *et al.*, 2000). Aussi, plusieurs éléments de régulation transcriptionnels ont été identifiés pour le promoteur d'eNOS. Parmi ceux-ci on retrouve des éléments répondant aux forces de cisaillement de l'afflux sanguin (Sessa *et al.*, 1992), aux estrogènes, à l'adénosine monophosphate cyclique (cAMP) et aux stérols (Marsden *et al.*, 1993). De plus, on y retrouve des éléments de liaison pour la protéine Sp1 et la protéine activatrice-1 (AP-1), impliqués respectivement dans la régulation d'eNOS par le lysophosphatidylcholine (lyso-PC) et les drogues immunosuppressives (Cieslik *et al.*, 1999; Navarro-Antolin *et al.*, 2000). Plusieurs facteurs ont aussi été démontrés comme ayant un effet, soit positif ou négatif, sur l'expression d'eNOS. Ainsi les estrogènes, l'insuline, des basses concentrations de lipoprotéine de basse densité (LDL) oxydée/lyso-PC, l'hypoxie, l'exercice chronique et les facteurs de croissance EGF, TGF- β , FGF basique (bFGF) et le VEGF lui-même, augmentent l'expression d'eNOS (Inoue *et al.*, 1995; Hirata *et al.*, 1995; Zembowicz *et al.*, 1995; Arnet *et al.*, 1996; Kroll and Waltenberger, 1998; Tan *et al.*, 1999; Bouloumie *et al.*, 1999; Zheng *et al.*, 1999; Kuboki *et al.*, 2000). Au contraire, le facteur de nécrose tumoral (TNF- α) et

l'érythropoïétine diminuent l'expression de l'enzyme (Nishida *et al.*, 1992; Wang and Vaziri, 1999). Finalement, certains stimuli affectent la stabilité de l'ARN messenger d'eNOS. Parmi ceux-ci le TNF- α , les lipopolysaccharides et le LDL oxydé causent une augmentation de la dégradation de cet ARNm alors que le peroxyde d'hydrogène et le VEGF ont pour effet de le stabiliser (Liao *et al.*, 1995; Lu *et al.*, 1996; Alonso *et al.*, 1997; Bouloumie *et al.*, 1999; Drummond *et al.*, 2000).

1.5.3.2 Régulation d'eNOS co- et post-traductionnelles

Alors qu'iNOS est uniquement cytoplasmique et que nNOS est cytoplasmique et associée aux membranes (Hecker *et al.*, 1994), eNOS est presque essentiellement liée aux membranes intracellulaires, préférentiellement à la membrane plasmique et au Golgi. Contrairement à l'association membranaire de nNOS, résultante d'une interaction entre l'enzyme et la protéine membranaire NIDD (*nNOS-interacting DHHC domain-containing protein with dendritic mRNA*) (Saitoh *et al.*, 2004), celle d'eNOS est obtenue suite à des modifications co- et post-traductionnelles. En effet, elle implique la myristoylation co-traductionnelle irréversible de la glycine 2 et la palmitoylation post-traductionnelle réversible des cystéines 15 et 26 (Liu *et al.*, 1994; Liu *et al.*, 1995a). Le rôle de ces modifications semble être de diriger la protéine vers des sites de la membrane où sont concentrées une grande quantité de molécules de signalisation nécessaires au bon fonctionnement cellulaire, les cavéoles. De cette façon, eNOS est amenée à proximité de facteurs indispensables à sa régulation, résultant ainsi en une production optimale de NO. En effet, des formes mutantes d'eNOS pour ces sites de myristoylation/palmitoylation montrent une localisation cellulaire altérée accompagnée d'une diminution de la production de NO cellulaire (Liu *et al.*, 1994; Liu *et al.*, 1996; Shaul *et al.*, 1996; Garcia-Cardena *et al.*, 1996b). Par contre, ces mutants gardent une activité enzymatique *in vitro* inchangée, démontrant que c'est sa localisation intracellulaire, et non son acylation, qui influence l'activité catalytique d'eNOS.

1.5.3.3 Régulation d'eNOS par les interactions protéine-protéine

L'enzyme eNOS oscille constamment entre un état « moins actif », caractérisé par une activité enzymatique et une production de NO basales, et un état « plus actif » où la synthèse de NO est favorisée. Par contre, qu'elle soit dans l'un ou l'autre de ces états, eNOS est associée à différentes protéines qui modulent son activité catalytique, tant de façon positive que négative (Fig. 1.7).

Plusieurs régulateurs participent au maintien d'eNOS dans un état d'activité basale. Parmi ceux-ci, on retrouve certains récepteurs couplés aux protéines G (RCPG), plus spécifiquement le domaine intracellulaire 4 (ID4) du récepteur à la bradykinine (B_2) ainsi que les récepteurs à l'angiotensine (AT_1) et à l'endothéline (ET_B) (Ju *et al.*, 1998; Marrero *et al.*, 1999). En fait, même si les évidences *in vivo* manquent toujours, ces récepteurs s'associent à eNOS *in vitro* et ceci a un effet négatif sur l'activité catalytique de l'enzyme. Ainsi, l'association, *in vitro*, entre eNOS et des peptides synthétiques ID4 ou une protéine de fusion ID4-GST résulte en l'inhibition de l'enzyme en fonction de la dose, laquelle est probablement causée par une interférence dans le transfert d'électrons entre les flavoprotéines et l'hème (Golser *et al.*, 2000). D'un autre côté, la localisation intracellulaire d'eNOS participe encore une fois dans la modulation de son activité catalytique, cette fois-ci au moyen des protéines NOSIP et NOSTRIN (*nitric oxide synthase interacting protein* et *nitric oxide synthase trafficker*, respectivement). En effet, il a été observé que ces deux protéines interagissent avec eNOS et que leur surexpression cause une relocalisation de l'enzyme à partir de la membrane plasmique vers des compartiments intracellulaires. De plus, cette relocalisation est accompagnée d'une diminution importante, voir même une inhibition complète, de la synthèse de NO (Dedio *et al.*, 2001; Zimmermann *et al.*, 2002). Cette observation confirmant, encore une fois, que la localisation cavéolaire d'eNOS, près des modulateurs nécessaires à son bon fonctionnement, est d'une grande importance afin d'obtenir une synthèse optimale de NO.

Par contre, le principal régulateur négatif d'eNOS est justement l'une des principales composantes des cavéoles, la protéine cavéoline-1 (Cav-1). En effet, il a été démontré qu'eNOS interagit directement avec la cavéoline-1 (Feron *et al.*, 1996; Garcia-Cardena *et al.*, 1996a; Ju *et al.*, 1997), possiblement par une association entre les acides aminés 60-101 de Cav-1 (Ju *et al.*, 1997; Garcia-Cardena *et al.*, 1997) et les acides aminés 350-358 (FSAAPFSGW, domaine de

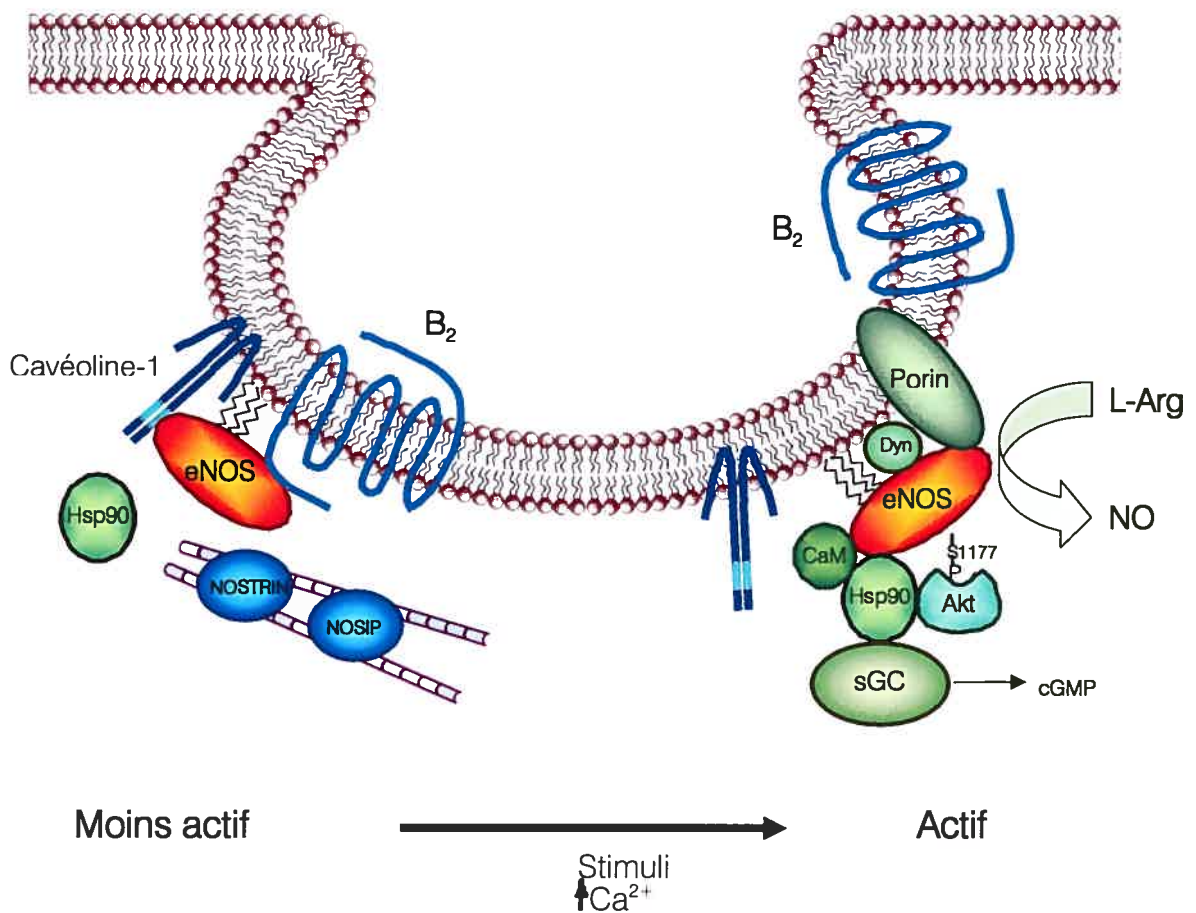


Figure 1.7 : Interactions protéine-protéine impliquées dans la régulation d'eNOS— Dans son état moins actif, eNOS est associée à ses régulateurs négatifs; la cavéoline-1, NOSIP (nitric oxide synthase interactig protein), NOSTRIN (nitric oxide synthase trafficker) et le quatrième domaine intracellulaire du récepteur à la bradykinine (B_2). Suite à la stimulation des cellules endothéliales, eNOS interagit avec ses régulateurs positifs; la calmoduline (CaM), Hsp90, porin et dynamine (Dyn). Hsp90 sert possiblement de protéine d'échafaudage afin de recruter des protéines supplémentaires à eNOS telles qu'Akt et la protéine effectrice guanylate cyclase soluble (sGC). Les protéines NOSTRIN et NOSIP interagissent avec des filaments d'actine. Figure obtenue de (Garcia Blanes and Gratton, 2006)

liaison à la Cav-1) du domaine oxygénase d'eNOS (Couet *et al.*, 1997). De plus, tant par des études de cotransfection que par des études où eNOS est incubée avec des peptides synthétiques représentant la séquence 60- 101 de Cav-1 ou une protéine de fusion GST-Cav-1, il a été démontré que cette interaction a un effet négatif sur l'activité catalytique de l'enzyme et sur la synthèse de NO (Garcia-Cardena *et al.*, 1997; Michel *et al.*, 1997a). Fait intéressant, il a été proposé que Cav-1 inhiberait l'activité d'eNOS en antagonisant les effets causés par la liaison du principal régulateur positif de l'enzyme, la calmoduline (CaM). En effet, le domaine de liaison de Cav-1 sur eNOS se trouvant entre l'hème et le site de liaison de la CaM, sa liaison pourrait interférer avec le transfert d'électrons, du domaine réductase vers l'hème, nécessaire à la réduction du fer (Garcia-Cardena *et al.*, 1997). Par contre, il est clair que l'inhibition de l'enzyme, causée par la surexpression de Cav-1 ou des peptides synthétiques de cette molécule, peut être renversée par l'addition de CaM, indiquant une régulation réciproque entre ces deux protéines (Garcia-Cardena *et al.*, 1997; Michel *et al.*, 1997b).

Ainsi, du côté des régulateurs positifs on retrouve la calmoduline (CaM), première protéine proposée comme étant un modulateur de l'activité d'eNOS (Bredt and Snyder, 1990). En fait, la dépendance au Ca^{2+} est la principale caractéristique permettant de distinguer les isoformes de NOS; eNOS et nNOS ayant été classifiées comme des enzymes dépendantes du Ca^{2+} /CaM alors qu'iNOS n'est pas assujettie à cette régulation. Cette différence est due à la présence d'une boucle d'auto-inhibition, sur eNOS et nNOS mais pas sur iNOS, laquelle est située à proximité du domaine de liaison à la calmoduline (Salerno *et al.*, 1997). Il a été proposé que l'association de la CaM à son domaine de liaison sur eNOS cause un déplacement de la boucle d'auto-inhibition et que ceci faciliterait le transfert d'électrons du domaine réductase vers l'hème du domaine oxygénase (Roman *et al.*, 2000). En effet, l'utilisation de formes mutantes d'eNOS où cette boucle inhibitrice a été supprimée a permis de démontrer qu'à de basses concentrations de Ca^{2+} , cet insert déstabilise la liaison de la CaM à eNOS. Puis,

cette absence de CaM, résultante d'une liaison moins efficace, inhibe le transfert d'électrons vers l'hème (Daff *et al.*, 1999; Nishida and Ortiz de Montellano, 1999). Finalement, même si des études utilisant des inhibiteurs de CaM ou des agents chélateurs de Ca^{2+} ont démontré l'importance critique de la CaM dans la synthèse de NO (Luckhoff *et al.*, 1988; Busse and Mulsch, 1990), rien n'a été prouvé quant au recrutement de cette molécule à eNOS en réponse à un stimuli donné. Il se pourrait donc que la CaM soit toujours liée à l'enzyme. Dans cet ordre d'idées, l'augmentation du Ca^{2+} intracellulaire induirait un changement conformationnel dans la CaM (résultant de la liaison de l'ion à la protéine) qui aurait comme effet d'augmenter l'affinité de l'association eNOS-CaM. Ceci causerait un déplacement de la boucle d'auto-inhibition d'eNOS et faciliterait le transfert d'électrons entre les différentes parties de l'enzyme.

Une deuxième protéine importante dans la modulation positive d'eNOS est la chaperonne Hsp90. Il a été démontré qu'eNOS est associé à Hsp90 dans des cellules non stimulées mais que cette association est augmentée suite au traitement de ces cellules à l'histamine, aux estrogènes, aux forces de cisaillement de l'afflux sanguin et au VEGF (Garcia-Cardena *et al.*, 1998; Russell *et al.*, 2000). De plus, cette association accrue est accompagnée d'une augmentation de la production de NO. Aussi, l'utilisation de la geldanamycine, un inhibiteur spécifique de Hsp90, atténue la production de cGMP induite par le VEGF ou l'histamine ainsi que la vasorelaxation des anneaux d'aorte de rat induit par l'acétylcholine (Garcia-Cardena *et al.*, 1998). Par contre, le mécanisme par lequel Hsp90 régule l'activité d'eNOS est encore quelque peu controversé. Certains ont proposé que cette chaperonne activerait directement eNOS, probablement en induisant un changement dans la conformation de l'enzyme, alors que d'autres proposent plutôt que Hsp90 agirait comme protéine d'échafaudage afin de faciliter l'association de protéines régulatrices additionnelles (Garcia-Cardena *et al.*, 1998; Gratton *et al.*, 2000; Fontana *et al.*, 2002; Venema *et al.*, 2003; Takahashi and Mendelsohn, 2003).

Dernièrement, deux nouvelles protéines se sont ajoutées à la liste des modulateurs positifs d'eNOS : la protéine dynamine-2 et Porin, un canal d'anions/cations dépendant du voltage. Toutes deux ont été démontrées comme interagissant avec eNOS. Dans le cas de dynamine-2, l'interaction se fait sur une région riche en prolines, et ceci se traduit par une augmentation de l'activité catalytique de l'enzyme (Cao *et al.*, 2001; Sun and Liao, 2002; Cao *et al.*, 2003).

1.5.3.4 Régulation d'eNOS par la phosphorylation

La phosphorylation d'eNOS, laquelle peut survenir sur des résidus sérines (S), thréonines (T) et tyrosines (Y), est l'un des mécanismes de régulation clé dans le contrôle de la production de NO par l'enzyme. Même si plusieurs sites de phosphorylation potentiels ont été identifiés à ce jour, eNOS semble surtout contrôlée par la phosphorylation de six résidus : les sérines 116, 617, 635, 1179, la thréonine 497 et la tyrosine 83 (résidus de l'isoforme bovine; correspondant aux résidus S114, S615, S633 S1177, T495 et Y81 du eNOS humain) (Fig. 1.8).

Sans aucun doute, le principal site de phosphorylation sur eNOS est la sérine 1179. Ce résidu, n'est pas phosphorylé dans les cellules endothéliales à l'état basal mais peut l'être rapidement en réponse à différents stimuli tels que; les forces de cisaillement de l'afflux sanguin (Dimmeler *et al.*, 1999), les estrogènes (Lantin-Hermoso *et al.*, 1997), l'insuline (Kim *et al.*, 2001), la bradykinine (Fleming *et al.*, 2001), la sphingosine 1-phosphate (Igarashi *et al.*, 2001), l'histamine, la thrombine (Thors *et al.*, 2004) et le VEGF (Fulton *et al.*, 1999). Plusieurs kinases semblent impliquées dans ce processus mais le choix de celle-ci dépend largement du stimulus appliqué. Ainsi, les estrogènes et le VEGF induisent la phosphorylation de la Ser1179 au moyen de la kinase Akt alors que l'histamine et la thrombine nécessitent l'activation de la kinase AMP (AMPK) (Thors *et al.*, 2004) et la bradykinine médie cette phosphorylation par la kinase dépendante de la CaM (CaMKII) (Fleming *et al.*, 2001). Des études utilisant des formes mutantes non-phosphorylables et phospho-mimétiques d'eNOS pour la Ser1179 (mutations

sérine → alanine (A) ou sérine → aspartate (D) respectivement) montrent que la phosphorylation de ce résidu résulte en une augmentation de l'activité enzymatique ainsi que de la production de NO basale et stimulée (Bauer *et al.*, 2003). La sérine 1179 se trouvant sur la boucle d'auto-inhibition du domaine réductase d'eNOS, il a été proposé que sa phosphorylation augmenterait la production de NO en induisant un changement de conformation dans cette boucle, facilitant ainsi le transfert d'électrons du domaine réductase vers le domaine oxygénase d'eNOS (Lane and Gross, 2002).

Deux sites de phosphorylation additionnels ont un effet positif sur l'activité d'eNOS, les sérines 617 et 635. Ces deux résidus, présents sur la boucle d'auto-inhibition d'eNOS située près du motif de liaison de la CaM, sont phosphorylés dans les cellules endothéliales en réponse à une stimulation à la bradykinine, à l'ATP, aux statines (Harris *et al.*, 2004) et au VEGF (Michell *et al.*, 2002). Les kinases responsables de cette phosphorylation sont Akt dans le cas de la Ser617 et la protéine kinase A (PKA) pour la Ser635 (Michell *et al.*, 2002). L'utilisation d'une forme phospho-mimétique d'eNOS (S→D) pour ces résidus montre une augmentation de l'activité enzymatique dans le cas du S635D et une augmentation de l'affinité pour la Ca²⁺/CaM accompagné d'une activité catalytique inchangée pour le S617D. De plus, il semble que la phosphorylation de la Ser617 soit rapide et transitoire alors que celle de la Ser635 est plus soutenue (Michell *et al.*, 2002; Bauer *et al.*, 2003). Il a donc été suggéré que lors de l'activation d'eNOS, la sérine 617 est phosphorylée en premier, prédisposant l'enzyme à une liaison avec la CaM, puis ensuite la Ser635 serait phosphorylée, augmentant l'activité maximale d'eNOS et causant une augmentation à long terme de la production de NO.

La sérine 116, située au domaine oxygénase d'eNOS, est toujours phosphorylée par la PKC dans les cellules endothéliales à l'état basal. Elle peut être déphosphorylée, par la protéine phosphatase calcineurine, sous l'effet de certains agonistes dont le VEGF (Kou *et al.*, 2002). Cette déphosphorylation est

associée à une augmentation de l'activité enzymatique ainsi qu'à une augmentation de la production de NO stimulée mais non basale (Bauer *et al.*, 2003).

Fait intéressant, il a récemment été démontré que la phosphorylation de certains résidus sérines d'eNOS est effectuée par un mécanisme coopératif (Bauer *et al.*, 2003). Ainsi, la phosphorylation de la sérine 1179 est augmentée dans les cellules exprimant des mutants d'eNOS où les résidus 116 et 617 sont non-phosphorylables (eNOS-S116A et eNOS-S617A). De même, la déphosphorylation de la sérine 116 est augmentée et la phosphorylation de la sérine 635 est diminuée dans les cellules exprimant le mutant eNOS-S617A.

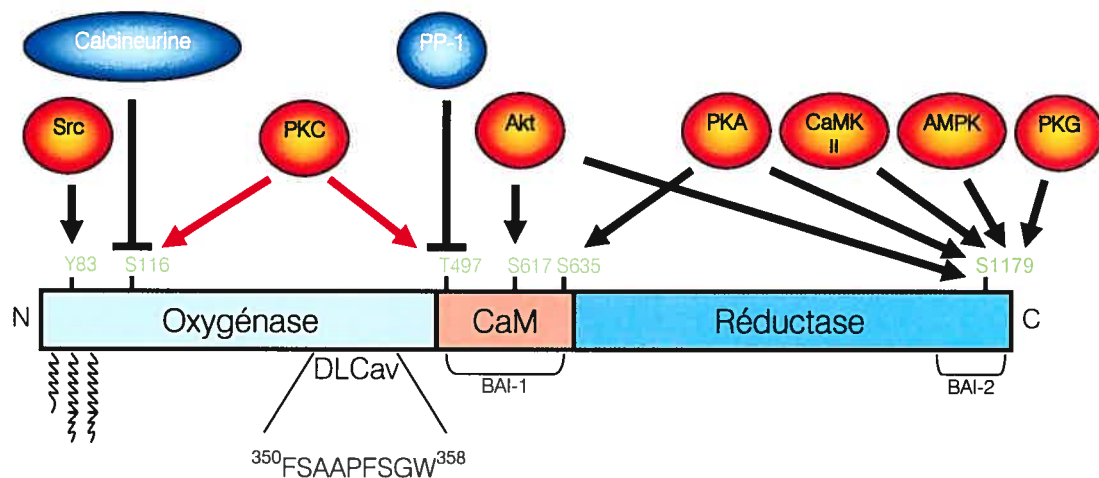


Figure 1.8 : Régulation d'eNOS par la phosphorylation– Représentation schématisée d'un monomère d'eNOS. On peut y voir le domaine oxygénase au N-Terminal (contenant les sites d'acylation, le domaine de liaison à la cavéoline (DLCav), la tyrosine 83 et la sérine 116) ainsi que le domaine réductase au C-Terminal (contenant les boucle d'auto-inhibition-1 et -2 (BAI-1 et -2), les sites de phosphorylation T497, S617, S635, S1179 et le domaine de liaison à la calmoduline (CaM)). Les cercles rouges représentent les kinases (PKC= protéine kinase C, PKA= protéine kinase A, CaMKII= kinase dépendante de la CaM II, AMPK= kinase dépendante de l'AMP, PKG= protéine kinase G) et les cercles bleus représentent les phosphatases (PP-1= protéine phosphatase-1). Les phosphorylations activatrices sont représentées par des flèches noires et celles inhibitrices par des flèches rouges. Figure obtenue de (Garcia Blanes *et al.*, 2006).

Du côté des résidus thréonines impliqués dans la modulation d'eNOS, on retrouve le principal site de régulation négative de l'enzyme par la phosphorylation; le résidu thréonine 497. Ce site est constitutivement phosphorylé dans les cellules endothéliales par l'enzyme PKC mais peut être déphosphorylé par la protéine phosphatase-1 en réponse à plusieurs agonistes induisant la mobilisation du calcium tels que la bradykinine et l'histamine (Fleming *et al.*, 2001). L'augmentation de l'activité enzymatique observée avec le mutant d'eNOS non-phosphorylable pour ce résidu (T497A-eNOS) confirme ce site comme étant un régulateur négatif de l'enzyme (Lin *et al.*, 2003). En effet, ce site se situe au sein du motif de liaison à la CaM. Par conséquent, lorsque phosphorylée, la Thr495 causerait une réduction de l'affinité de cette protéine régulatrice envers eNOS (Fleming *et al.*, 2001). Enfin, il a été proposé que ce site agirait comme commutateur intrinsèque déterminant la génération de NO versus un produit secondaire de la synthèse du monoxyde d'azote, le superoxyde (Lin *et al.*, 2003).

Finalement, plusieurs études montrent qu'eNOS est phosphorylée sur certains de ses résidus tyrosines. En effet, le traitement des cellules endothéliales avec un inhibiteur des enzymes phosphatases de tyrosines résulte en une augmentation de la phosphorylation d'eNOS sur ses résidus tyrosines (Garcia-Cardena *et al.*, 1996a). Aussi, la production de NO endothéliale peut être modulée par l'utilisation d'inhibiteurs de protéines kinases et phosphatases de tyrosines (Fleming *et al.*, 1996; Fleming *et al.*, 2001). De plus, il a récemment été démontré qu'eNOS est phosphorylée sur son résidu tyrosine 83 (séquence bovine) par la protéine kinase Src et que ceci résulte en une augmentation de la production de NO (Fulton *et al.*, 2005). Toutefois, cette phosphorylation ne semble pas induire l'activité de l'enzyme *in vitro*. Contrairement aux autres sites de phosphorylation d'eNOS, lesquels semblent avoir un effet direct sur les flux d'électrons au sein de l'enzyme, Fulton *et al.* ont proposé que la Y83 phosphorylée agirait plutôt comme site d'ancrage pour des protéines adaptatrices contenant des domaines SH2. Fait intéressant, ceci est en ligne avec ce qui fut proposé par Garcia-Cardena *et al.*,

comme quoi la phosphorylation des résidus tyrosines n'aurait pas d'effet direct sur l'activité de l'enzyme mais modulerait plutôt son interaction avec des protéines régulatrices telle que Cav-1 (Garcia-Cardena *et al.*, 1996a).

1.6 Le NO dans la réponse cellulaire au VEGF : son rôle dans l'angiogenèse

Mis à part les implications physiologiques du NO décrites à la section 1.4, cette molécule de signalisation agit aussi sur les cellules endothéliales elles-mêmes, où elle intervient à toutes les étapes de la réponse cellulaire endothéliale au VEGF (Fig. 1.9). Ceci faisant de lui un puissant facteur angiogénique et perméabilisant.

1.6.1 Le NO dans la prolifération des cellules endothéliales induite par le VEGF

Il a été mentionné plus tôt que l'induction de la prolifération des cellules endothéliales par le VEGF requiert l'activation de la PKC afin de déclencher la voie Raf-MEK 1/2-ERK 1/2. Par contre, la stimulation de cette voie n'implique pas toutes les isoformes de la PKC. En effet, une étude utilisant des inhibiteurs spécifiques pour chaque isoforme de la PKC a démontré que seulement les isoformes α et ζ de cette kinase sont cruciales pour l'envoi de signaux mitogéniques par le VEGF (Xia *et al.*, 1996; Wellner *et al.*, 1999). De plus, il est intéressant de noter qu'une autre étude suggère que la surexpression de l'isoforme PKC δ retarde la progression du cycle cellulaire des cellules endothéliales (Harrington *et al.*, 1997). Il semblerait donc que le VEGF induit la prolifération des cellules endothéliales en augmentant et en diminuant l'activité de certaines isoformes spécifiques de la PKC (α/ζ et δ respectivement). Fait intéressant, il semble que la diminution de l'activité de la PKC δ lors de l'induction de la prolifération cellulaire endothéliale par le VEGF est médiée par le NO (Shizukuda *et al.*, 1999). En effet, la diminution de l'activité de la PKC δ et de la prolifération cellulaire induites par le VEGF sont bloquées par le traitement de cellules HUVEC avec un inhibiteur de NOS (Shizukuda *et al.*, 1999).

Aussi, deux études ont suggéré que le NO serait impliqué dans l'activation de Raf (Hood and Granger, 1998; Parenti *et al.*, 1998), membre de la voie de

signalisation responsable de l'induction de la prolifération cellulaire endothéliale par le VEGF. Ceci est appuyé par le fait que l'utilisation d'inhibiteurs de la production de NO réduit grandement l'activation de Raf et les effets mitogéniques induits par le VEGF. Par contre, les mécanismes entourant cette activation restent encore à être définis.

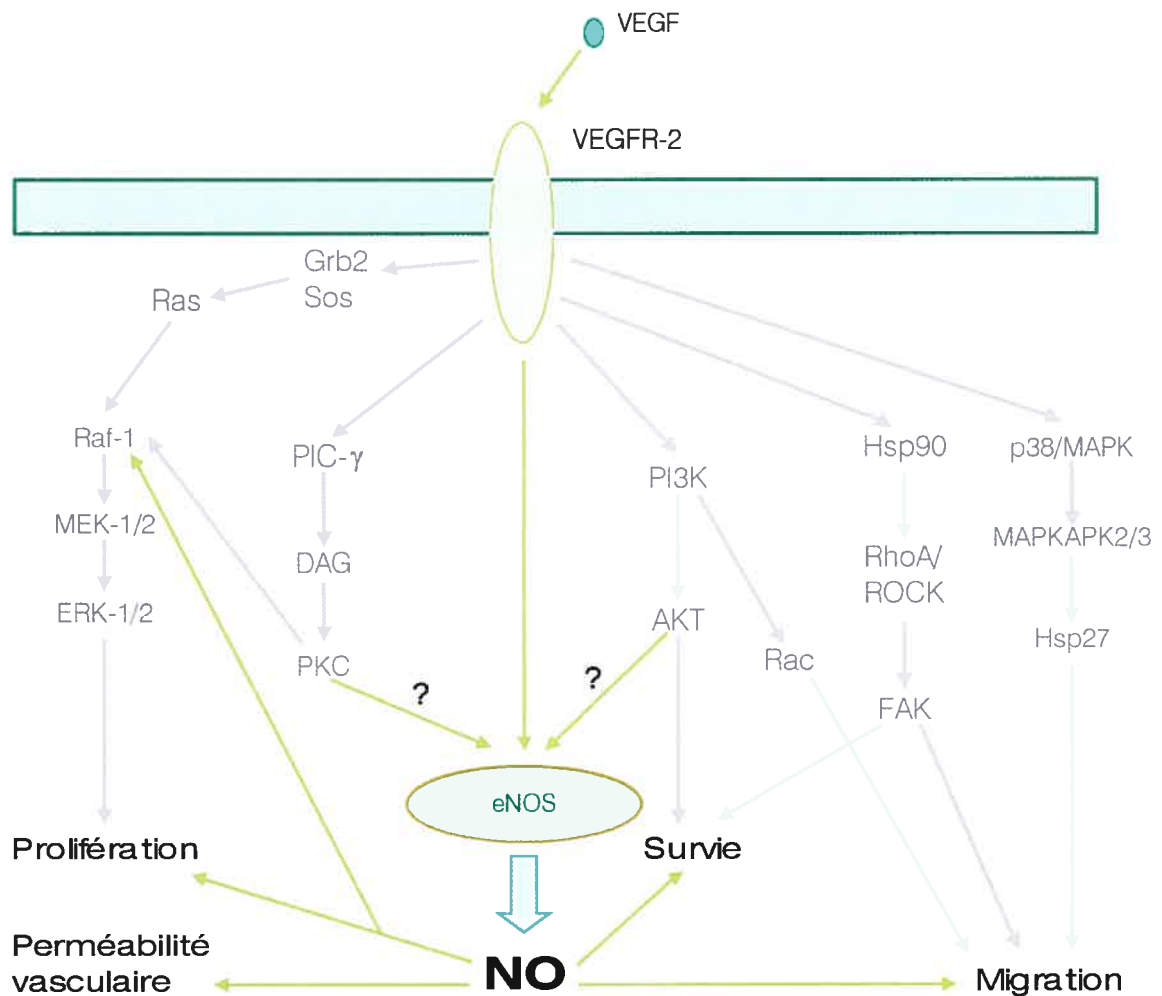


Figure 1.9 : Rôle du NO dans les effets cellulaires endothéliaux du VEGF – Le NO agit à toutes les étapes de la réponse cellulaire au VEGF, soit lors de l'induction de la prolifération, de la survie et de la migration des cellules endothéliales, ainsi que dans l'augmentation de la perméabilité vasculaire, par cette cytokine.

1.6.2 Le NO dans la survie des cellules endothéliales induite par le VEGF

Il a été proposé que le NO agirait comme facteur de survie en potentialisant les effets du VEGF (Morbidelli *et al.*, 1996;Parenti *et al.*, 1998). Aussi, l'inhibition d'eNOS se traduit par une augmentation de l'apoptose des cellules endothéliales (Lopez-Farre *et al.*, 1997). De plus, le NO semble réduire l'activation des caspases, premières effectrices du programme de mort cellulaire programmée (Shiojima and Walsh, 2002;Zech *et al.*, 2003). En fait, il a été démontré que des donneurs de NO ont la capacité d'inhiber l'assemblage d'Apaf-1 dans l'apoptosome. Ceci se traduit par une atténuation des interactions entre les domaines de recrutement de caspases (CARD) présents dans Apaf-1 et la pro-caspase 9. La caspase initiateur 9 n'étant pas activée, elle ne peut activer la caspase effectrice 3, son principal substrat, et par conséquent la cascade d'activation de caspases menant à la mort cellulaire ne peut être enclenchée. Finalement, il a été proposé que le NO inactiverait les caspases par la modification post-traductionnelle S-nitrosylation. Au cours de ce processus, lequel réfère à l'attachement covalent d'une molécule de NO au groupement thiol de la chaîne latérale d'un résidu cystéine (Hess *et al.*, 2005), le résidu cystéine du site actif de ces caspases est modifié, inhibant ainsi l'activité catalytique de ces enzymes. Ceci a été observé *in vitro* pour plusieurs membres de la famille des caspases (Li *et al.*, 1997;Zech *et al.*, 1999) et *in vivo* pour la caspase 3 (Rossig *et al.*, 1999).

1.6.3 Le NO dans la migration des cellules endothéliales induite par le VEGF

Les implications du NO dans la migration des cellules endothéliales induite par le VEGF sont multiples. Pour commencer, le NO est impliqué dans l'induction de la podokinèse (mouvements sans direction précise) chez les cellules endothéliales (Noiri *et al.*, 1998). Ces mouvements, sous l'action d'un facteur de guidage tel que le VEGF, se transforment en mouvements vectoriels (Noiri *et al.*, 1998) permettant ainsi la migration cellulaire directionnelle. De plus, la migration des cellules

HUVEC induite par le VEGF est diminuée suite à l'utilisation d'un inhibiteur d'eNOS (Goligorsky *et al.*, 1999). De plus, nous savons que la migration cellulaire requiert la formation de nouveaux foyers d'adhésion à l'avant de la cellule et le désassemblage de ces foyers à l'arrière. Dans le même ordre d'idées, il a été proposé que le NO induirait le désassemblage des foyers présents à l'arrière de la cellule en mouvement et inhiberait la formation de contacts forts entre la cellule et la matrice à l'avant de celle-ci afin de favoriser la migration (Goligorsky *et al.*, 1999). Finalement, il semble que la voie de signalisation PI3K/Akt, en stimulant la production de NO, jouerait un rôle important sur l'induction de la migration des cellules endothéliales par le VEGFR-2. Ainsi, il a été démontré que l'activation d'eNOS suite à la phosphorylation de son résidu sérine 1177, site de phosphorylation d'Akt sur eNOS, est nécessaire et suffisante pour stimuler la migration cellulaire endothéliale induite par le VEGF (Dimmeler *et al.*, 2000). En effet, l'utilisation d'une forme mutante d'eNOS dont la sérine 1177 est non-phosphorylable (S1177A) inhibe la migration des cellules endothéliales induite par le VEGF alors que l'expression d'une forme phospho-mimétique d'eNOS pour ce résidu (S1177D) induit la migration cellulaire endothéliale (Dimmeler *et al.*, 2000). Dans le même ordre d'idées, l'expression d'une forme non-activable d'Akt ou l'utilisation d'un inhibiteur de la production de NO bloquent la migration des cellules endothéliales microvasculaires induite par le VEGF. Au contraire, l'expression d'une forme constitutivement active d'Akt (myr-Akt) induit la migration de ces cellules même en absence de VEGF (Morales-Ruiz *et al.*, 2000).

1.6.4 Le NO dans la perméabilité vasculaire induite par le VEGF

Il est maintenant grandement accepté que le NO est un joueur clé dans la médiation des effets perméabilisant du VEGF. Ainsi, l'inhibition d'eNOS par le L-NAME (nitro-L-arginine-méthyl-ester) ou par la petite molécule cavtratin empêche l'induction de la perméabilité vasculaire par le VEGF (Murohara *et al.*, 1998; Gratton *et al.*, 2003). Aussi, le VEGF ne peut induire la perméabilité vasculaire chez des

souris déficientes pour le gène eNOS contrairement aux souris de type sauvage (Fukumura *et al.*, 2001). Par contre, le ou les mécanismes par lesquels le NO induit ce processus restent encore assez obscurs. Tout de même, il a été proposé que le NO agirait à la jonction intercellulaire en déstabilisant les interactions homophiliques entre les VE-cadhérines (Gonzalez *et al.*, 2003). Ces protéines d'adhésion sont présentes aux jonctions adhérentes et ont comme rôle de connecter les cellules endothéliales adjacentes au moyen de liaisons homophiliques entre leurs domaines extracellulaires alors que leurs domaines intracellulaires lient le cytosquelette d'actine via l'interaction avec des membres de la famille des caténines. Il était déjà connu que l'utilisation d'anticorps contre la VE-cadhérine chez la souris induit une augmentation de perméabilité vasculaire dans le cœur et les poumons de ces animaux (Corada *et al.*, 1999). Nous savons maintenant que le traitement des cellules endothéliales microvasculaires post-confluentes avec des donneurs de NO cause une diminution dans l'expression de VE-cadhérine ainsi que dans la quantité de complexes VE-cadhérines/caténines (β et γ -caténines) cytoplasmiques. De plus, cette diminution des VE-cadhérines corrèle avec une augmentation de la perméabilité vasculaire tant *in vitro* qu'*in vivo*. Finalement, le retrait de ces donneurs de NO cause une augmentation du nombre de complexes VE-cadhérines/caténines accompagnée par un rétablissement de la perméabilité vasculaire normale (Gonzalez *et al.*, 2003).

1.7 Le VEGFR-2 et eNOS

Parmi les mécanismes de régulation d'eNOS mentionnés précédemment, deux ont un rôle majeur dans l'induction de la production de NO par l'enzyme : 1) la liaison de la calmoduline à eNOS en réponse à l'augmentation du calcium cytosolique, 2) la phosphorylation de l'enzyme sur son résidu sérine 1177 par la kinase anti-apoptotique Akt. Les exemples montrant l'effet drastique de l'inhibition de l'un ou l'autre des ces mécanismes sur la production de NO sont multiples (voir sections 1.5.3.3 et 1.5.3.4). Pour sa part, le VEGF est aussi largement reconnu comme étant un stimulateur de la synthèse de NO. Il n'est donc pas surprenant que ces deux événements, soit l'augmentation du calcium intracellulaire et l'activation d'Akt, fassent partie de voies de signalisation activées par le VEGFR-2.

1.7.1 La voie de la PLC- γ

Habituellement, le calcium cytosolique est maintenu à une concentration relativement basse, les ions Ca^{2+} étant retenus dans des « entrepôts intracellulaires », dont le réticulum endoplasmique (RE), ou expulsés à l'extérieur de la cellule par des pompes de calcium. Par contre, cette concentration intracellulaire peut être rapidement augmentée, en réponse à certains stimuli, au moyen d'un mécanisme dépendant principalement de la voie de signalisation de la PLC- γ . En effet, on sait que la stimulation de certains RTK et RCPG par leurs ligands résulte en une activation de la PLC- γ , laquelle hydrolyse le PIP_2 en IP_3 et DAG. L' IP_3 diffuse au travers du cytosol et interagit avec des canaux calciques, sensibles à ce lipide et présents à la membrane du RE, causant ainsi la libération des ions Ca^{2+} . De plus, cette libération de calcium à partir des réserves intracellulaires induit l'influx d'ions calcium à partir du milieu extracellulaire, augmentant encore plus la quantité de Ca^{2+} intracellulaire libre (Lodish, 2000).

Ce calcium cytosolique libre joue un rôle très important dans la régulation de plusieurs fonctions cellulaires. Dans l'exemple qui nous intéresse, sa liaison à la protéine calmoduline induit un changement de conformation dans cette molécule qui lui permet d'activer certaines enzymes, dont eNOS. Fait intéressant, nous

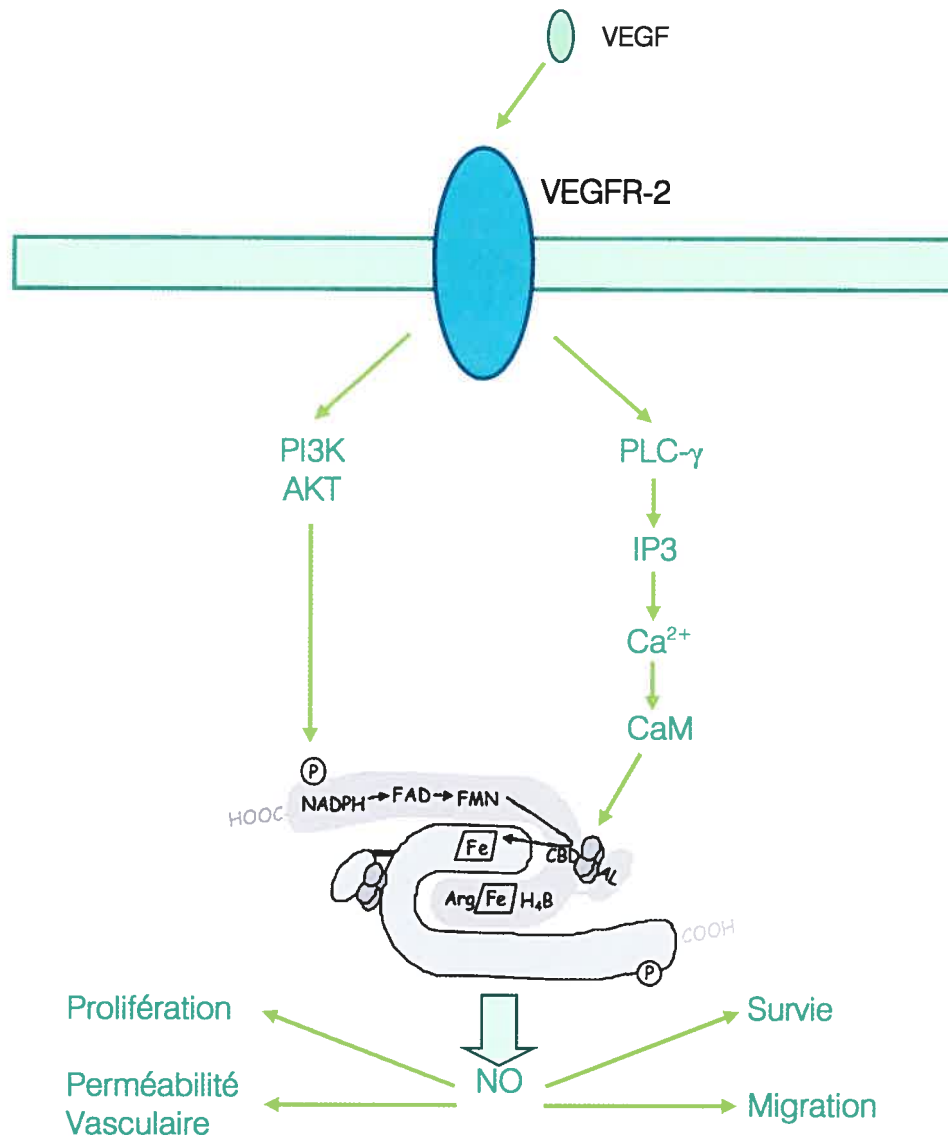


Figure 1.10 : Voies de signalisation entre le VEGFR-2 et eNOS- La phosphorylation du résidu sérine 1177 par Akt et l'augmentation du calcium intracellulaire menant à la liaison de la calmoduline à l'enzyme sont les principaux mécanismes régulant l'activité catalytique d'eNOS. Fait intéressant, ces deux événements font partie de voies de signalisation activées par le VEGFR-2 suite à une stimulation du récepteur par le VEGF.

avons vu plus tôt que l'activation de la PLC- γ est d'une grande importance dans l'induction de la prolifération des cellules endothéliales par le VEGFR-2 (voir section 1.3.5.1). De plus, il a été clairement démontré que la stimulation du VEGFR-2 par le VEGF résulte en une augmentation de la phosphorylation de la PLC- γ (Gille *et al.*, 2001). Aussi, le VEGF induit l'augmentation de la production d'IP₃ et de la concentration de Ca²⁺ intracellulaire (Faehling *et al.*, 2002). Finalement, l'utilisation de la carboxyamidotriazole (CAI), un inhibiteur de canaux calciques non-dépendants du voltage, prévient cette formation d'IP₃ et la synthèse de NO, stimulées par le VEGF (Faehling *et al.*, 2002). Ces évidences soulignent donc le rôle clair du VEGFR-2 dans la régulation d'eNOS par le calcium.

1.7.2 La voie de la PI3K

D'un autre côté, eNOS est phosphorylée sur son résidu sérine 1177 par la principale médiatrice de la PI3K; la kinase Akt. Les études montrant un lien entre ce mécanisme de régulation d'eNOS et le VEGFR-2 sont multiples. On a vu plus tôt que la voie de la PI3K/Akt est la principale voie de signalisation par laquelle le VEGFR-2 induit la survie des cellules endothéliales (voir section 1.3.4.2). De plus, la stimulation du VEGFR-2 par le VEGF résulte en la phosphorylation de la PI3K (Gille *et al.*, 2001). Aussi, l'utilisation d'inhibiteurs de la PI3K, le LY-294002 et le wortmannin, réduisent la phosphorylation et l'activation d'eNOS induites par le VEGF (Dimmeler *et al.*, 1999). Finalement, une étude récente montre que la perte de l'isoforme 1 d'Akt (Akt1) réduit l'accumulation de NO, induite par le VEGF, dans des cellules endothéliales de poumon de souris (Ackah *et al.*, 2005).

1.8 Les résidus tyrosines du VEGFR-2

Faisant partie de la famille des récepteurs à activité tyrosine kinase, le VEGFR-2 contient des résidus tyrosines (Y) dont la phosphorylation est essentielle au recrutement et à l'activation de protéines contenant des domaines d'homologie à Src 2 (SH2) et qui sont impliqués dans la transmission de signaux intracellulaires. Comme tout bon membre de sa famille, le VEGFR-2 est composé d'un domaine extracellulaire, contenant un motif de liaison au ligand, d'un domaine transmembranaire puis d'un domaine intracellulaire incluant une région avec activité tyrosine kinase. Suite à la liaison du récepteur par son ligand, un dimère dans le cas du VEGF, deux sous-unités du récepteur sont amenées à proximité. Ceci résulte en la phosphorylation de certains résidus tyrosines se trouvant dans une région appelée «boucle de phosphorylation», près du domaine catalytique du récepteur. Cette phosphorylation cause un changement de conformation qui facilite la liaison de l'ATP au récepteur, permettant au site catalytique de chaque monomère de phosphoryler des résidus tyrosines sur la portion cytosolique de l'autre monomère (Lodish, 2000). Ces dernières années, plusieurs groupes ont tenté d'identifier les sites d'autophosphorylation du VEGFR-2 ainsi que les protéines qui y sont recrutées afin de transmettre un signal cellulaire. Le VEGFR-2 contient 19 résidus tyrosines intracellulaires, et donc potentiellement phosphorylables, dont 8 sont situés dans une région catalytique et 11 dans une région non catalytique (Matsumoto *et al.*, 2005). À ce jour, seulement huit de ces tyrosines ont été démontrées comme pouvant être phosphorylées en réponse au VEGF; soit les résidus Y801, Y951, Y996, Y1008, Y1054, Y1059, Y1175 et Y1214 (résidus correspondant à la séquence humaine du VEGFR-2). La majorité de ces sites ont été identifiés tant par des méthodes directes (utilisation d'anticorps phospho-spécifiques ou des analyses de phosphoacides-aminés)

(Dougher-Vermazen *et al.*, 1994;Takahashi *et al.*, 2001;Matsumoto *et al.*, 2005) qu'indirectes (suite à l'identification d'une réponse cellulaire liée à la phosphorylation du résidu donné). Or, même si la détection indirecte est concluante pour les résidus Y801 et Y1008 (voir plus bas), les évidences directes manque toujours. Aussi, même si pour certains sites de phosphorylation il a été facile d'identifier les protéines/réponses cellulaires qui y sont reliées, pour d'autres sites, ceci a été plus difficile à reproduire et a donné lieu à quelque controverse.

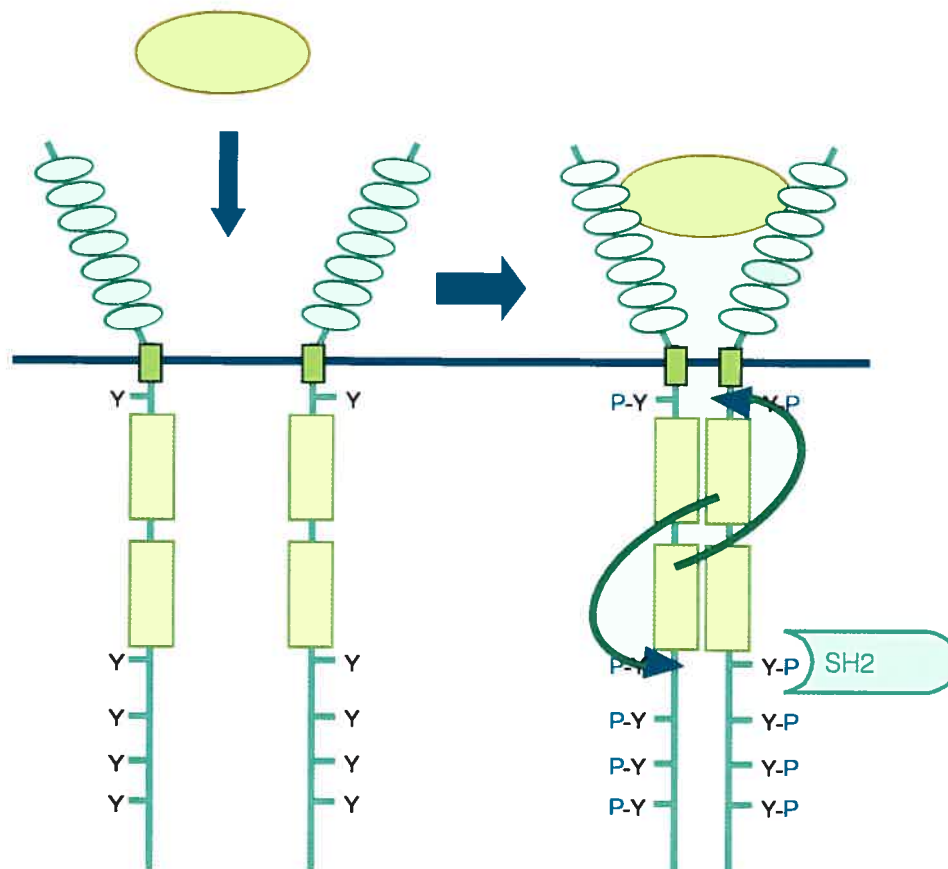


Figure 1.11 : Mécanisme général d'activation des récepteurs à activité tyrosine kinase- La liaison du ligand résulte en la dimérisation du récepteur. Par la suite le domaine kinase d'un monomère du récepteur phosphoryle les résidus tyrosines présents sur l'autre monomère. Ceci crée des sites de liaison pour des protéines contenant des domaines d'homologie à Src 2 (SH2) et qui sont impliquées dans la transmission de signaux intracellulaires.

1.8.1 Résidu Y801

La tyrosine 801 du VEGFR-2 fut l'un des premiers résidus du récepteur à avoir été mentionné dans la littérature comme étant un site de phosphorylation potentiel du récepteur (Cunningham *et al.*, 1997). Lors de cette première étude, l'alignement des séquences des récepteurs VEGFR-1 et -2 a permis de déterminer que le résidu Y801 du VEGFR-2 correspondait à la tyrosine 794 du VEGFR-1, un résidu ayant été démontré comme étant phosphorylé en réponse à une stimulation au VEGF. De plus, il a été démontré que la Y801 est entourée de séquences consensus d'autophosphorylation et de liaison à la PLC- γ puis, par des études de double-hybride en levure, une interaction entre l'enzyme et ce résidu du VEGFR-2 a été observée (Cunningham *et al.*, 1997). Par contre, une deuxième étude sur la Y801 effectuée par Dayanir *et al.* montre clairement que la phosphorylation de ce résidu est essentielle à l'activation de la PI3K mais pas à l'activation de la PLC- γ (Dayanir *et al.*, 2001). En effet, l'utilisation d'un mutant du VEGFR-2 dont la tyrosine 801 est non-phosphorylable (Y801F) montre une diminution de la production de PIP₃ dans un essai d'activité kinase PI3K *in vitro*. De même, la mutation de ce résidu abolit l'interaction entre le VEGFR-2 et la sous-unité régulatrice de la PI3K (la p85), affecte la phosphorylation d'Akt mais n'a aucune conséquence sur la phosphorylation de la PLC- γ . Finalement, cette même étude montre que la Y801 est importante dans la stimulation de la croissance cellulaire induite par le VEGFR-2.

1.8.2 Résidu Y951

La tyrosine 951 du VEGFR-2 est un site qui a gagné beaucoup d'importance ces dernières années. Au tout début, les recherches sur ce résidu s'étaient révélées peu concluantes. En effet, il avait été démontré que la mutation de la tyrosine 951 se traduisait par une diminution de la phosphorylation de la PLC- γ . Toutefois, un peptide synthétique représentant ce résidu sous sa forme phosphorylé n'arrivait pas à recruter aucun des deux domaines SH2 de l'enzyme (lesquels avaient été

fusionnés à GST) dans un essai *in vitro* (Dougher and Terman, 1999). Ce n'est que plus tard que ces observations ont pu être conciliées, soit lorsque la Y951 a été démontré comme étant le site de liaison de l'adaptateur spécifique aux cellules-T (TSA_d, aussi appelé protéine associée au récepteur au VEGF (VRAP)) sur le VEGFR-2 (Wu *et al.*, 2000b;Matsumoto *et al.*, 2005). En fait, il a été proposé que cet adaptateur soit constitutivement associé à la PLC- γ et à la PI3K. Finalement, il a aussi été mentionné que ce résidu serait impliqué dans la migration des cellules endothéliales induite par le VEGFR-2 (Zeng *et al.*, 2001;Matsumoto *et al.*, 2005).

1.8.3 Résidus Y996 et Y1008

Très peu d'études portent sur les résidus Y996 et Y1008 du VEGFR-2. Dans le cas de la tyrosine 996, une seule étude de cartographie triptyque a proposé ce site comme étant phosphorylé en réponse au VEGF (Dougher-Vermazen *et al.*, 1994). Par contre, aucune réponse cellulaire découlant de cette phosphorylation n'a pu être identifiée (Dougher *et al.*, 1999). De plus, une deuxième étude de cartographie triptyque a échoué lors de l'identification de ce site comme étant un site d'autophosphorylation du récepteur (Matsumoto *et al.*, 2005). Du côté de la Y1008, ce résidu a été proposé comme étant un site de liaison pour la PLC- γ sur le VEGFR-2. En effet, la mutation de ce site se traduit par une diminution de l'activation de la PLC- γ et la relâche de calcium intracellulaire dans les cellules endothéliales (Meyer *et al.*, 2003). Par contre, la phosphorylation de ce site n'a toujours pas été démontrée de façon directe.

1.8.4 Résidus Y1054 et Y1059

Ces deux sites sont maintenant clairement reconnus comme étant nécessaires à l'activité catalytique maximale du récepteur (Dougher *et al.*, 1999;Kendall *et al.*, 1999). En effet, ces deux résidus se trouvent sur la boucle d'activation de la kinase dont la phosphorylation a été présentée plus tôt comme étant essentielle à l'activité kinase du récepteur. Il n'est donc pas surprenant que le double mutant

Y1054/1059F ne montre que 10% de la phosphorylation totale du VEGFR-2 sauvage (Dougher *et al.*, 1999). En fait, ces observations sont similaires à celles préalablement rapportées pour le récepteur à l'insuline et d'autres RTK, lesquels contiennent aussi des résidus tyrosines dont la phosphorylation est essentielle à l'induction de l'activité catalytique maximale du récepteur (Wilden *et al.*, 1992).

1.8.5 Résidu Y1175

Le résidu tyrosine Y1175 est le site de phosphorylation le mieux documenté du VEGFR-2. À de nombreuses occasions, il a été démontré que sa phosphorylation donne lieu au recrutement et à l'activation de la PLC- γ . En effet, ce résidu se trouve entouré de séquences consensus de liaison à la PLC- γ et correspond à la tyrosine Y1169 du VEGFR-1, un résidu connu comme interagissant avec l'enzyme (Cunningham *et al.*, 1997). De plus, que ce soit par des études de double-hybride en levure, de co-transfection ou suite à l'utilisation d'un phospho-peptide Y1175F synthétique en combinaison avec une protéine recombinante contenant les domaines SH2 de la PLC- γ , il a été démontré que la Y1175 joue un rôle important dans l'interaction VEGFR-2/PLC- γ (Cunningham *et al.*, 1997; Takahashi *et al.*, 2001; Ratcliffe *et al.*, 2002). Finalement, la forme non phosphorylable du VEGFR-2 pour ce résidu montre une diminution de la phosphorylation de la PLC- γ , de la MAPK ainsi qu'une baisse de la synthèse d'ADN induites par le VEGF (Knight *et al.*, 2000; Takahashi *et al.*, 2001). Ces observations indiquent donc que ce résidu joue un rôle important dans la régulation de la prolifération des cellules endothéliales par le VEGFR-2. De plus, ce même résidu a été reconnu comme interagissant avec les protéines adaptatrices Shc/Sck et Shb (Warner *et al.*, 2000; Stoletov *et al.*, 2001; Ratcliffe *et al.*, 2002; Holmqvist *et al.*, 2004). La protéine Shc est connue pour coupler plusieurs RTK à la voie de Ras-MAPK (Pelicci *et al.*, 1992) alors que Shb a été reliée à l'activation de la PI3K ainsi qu'à la subséquente phosphorylation de FAK menant à la régulation de la migration cellulaire (Holmqvist *et al.*, 2004). Fait intéressant, une étude récente suggère que la

tyrosine 1173 (forme murine du gène VEGFR-2, résidu correspondant à la Y1175 de la forme humaine) joue un rôle essentiel dans la vasculogénèse des souris (Sakurai *et al.*, 2005). Ainsi, des souris homozygotes pour une version mutante du VEGFR-2 dont la tyrosine 1173 est mutée en phénylalanine meurent aux jours 8,5-9,5. La létalité de ces souris est due à une déficience de vaisseaux sanguins, d'îlots sanguins et une diminution marquée de précurseurs hématopoïétiques, un phénotype semblable à celui des souris VEGFR-2^{-/-}. Finalement, une étude propose que la phosphorylation de la tyrosine Y1175 soit requise pour l'activation de la PI3K (Dayanir *et al.*, 2001). Par contre, cette étude contredit aussi l'implication de la Y1175 dans son action la plus documentée; l'activation de la PLC- γ . Il se pourrait donc que ces observations soient plus le résultat de l'utilisation d'un récepteur chimérique (composé des domaines transmembranaires et intracellulaire du VEGFR-2 fusionnés au domaine extracellulaire du récepteur CSF-1R/*c-fms*) qu'un effet physiologique réel.

1.8.6 Résidu Y1214

Deux rôles ont été attribués à la phosphorylation de la tyrosine 1214 du VEGFR-2; 1) la régulation de la migration des cellules endothéliales induite par le VEGF (Lamalice *et al.*, 2004) et 2) la régulation de l'autophosphorylation du récepteur (Meyer *et al.*, 2002). En effet, une équipe a observé que l'utilisation d'une forme mutante du VEGFR-2, dont le résidu 1214 est non phosphorylable (Y1214F), résulte en une diminution importante de la phosphorylation totale du récepteur en réponse à une stimulation par le VEGF. Ceci semble accompagné d'une diminution de l'activation de certaines protéines de signalisation telles que PLC- γ , MAPK et Src (Meyer *et al.*, 2002). Par contre, ces informations n'ont pu être confirmées, la majorité des études utilisant cette forme mutante du VEGFR-2 ne montrent pas une telle diminution de l'activité catalytique du récepteur ni de l'activation des enzymes PLC- γ , ERK ou de la synthèse d'ADN (Takahashi *et al.*, 2001; Lamalice *et al.*, 2004). Par contre, le mutant Y1214F semble inhiber

l'activation de la p38/MAPK et la protéine en aval de cette dernière, la petite GTPase Cdc42, en réponse au VEGF (Lamallice *et al.*, 2004). Tel que mentionné plus tôt, la p38/MAPK est responsable du remodelage du cytosquelette d'actine menant à la migration des cellules endothéliales induite par le VEGF. Par conséquent, le résidu Y1214 serait impliqué dans la régulation de la migration endothéliale par le VEGFR-2. Finalement, il a été proposé que la Y1214 se trouve au sein d'une séquence de liaison pour l'adaptateur Grb2 (Songyang *et al.*, 1993; Takahashi *et al.*, 2001). Toutefois, une interaction directe entre ce résidu et l'adaptateur n'a toujours pas été observée.

1.9 Problématique et hypothèse

Il a été mentionné plus tôt que les principaux mécanismes régulant l'activité catalytique d'eNOS, soit l'augmentation du calcium intracellulaire menant à la liaison de la calmoduline à l'enzyme ainsi que la phosphorylation de cette dernière sur son résidu sérine 1177, sont des composantes importantes de voies de signalisation activées par le VEGFR-2. Faisant partie de la famille RTK, suite à une stimulation par le VEGF le VEGFR-2 s'autophosphoryle sur certains de ses résidus tyrosines intracellulaires. Ces résidus deviennent ainsi des points d'ancrage pour des protéines contenant des domaines SH2 et responsables de l'activation de voies de signalisation intracellulaires. Plusieurs sites d'autophosphorylation du VEGFR-2 ont été identifiés ces dernières années. De plus, afin de mieux comprendre la signalisation induite par le VEGFR-2, des études utilisant des formes non-phosphorylables du récepteur pour chacune de ces tyrosines ont été générées et ont mené à l'identification des protéines recrutées et activées par ces sites. Par contre, le ou les résidus tyrosines du VEGFR-2 dont la phosphorylation est essentielle à l'activation d'eNOS par le VEGF ainsi que la ou les voies de signalisation comprises entre ces résidus et l'enzyme demeurent à ce jour inconnus. Or, l'implication du NO dans de graves pathologies telles que les maladies cardiovasculaires et la progression tumorale font de lui une excellente cible thérapeutique. Par conséquent, une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires entourant la régulation de l'enzyme responsable de sa synthèse dans les cellules endothéliales, eNOS, ne peut être que bénéfique afin de mieux comprendre et traiter ces maladies.

Cette étude se base donc sur l'hypothèse voulant qu'une fois phosphorylés, en réponse à une stimulation du récepteur par le VEGF, un ou

plusieurs des résidus tyrosines du VEGFR-2 activeraient des voies de signalisation intracellulaires impliquées dans la régulation d'eNOS et menant ultimement à l'induction de la synthèse de NO par le VEGF. Par conséquent, l'utilisation de versions mutantes non-phosphorylables du VEGFR-2 pour certains de ses résidus tyrosines, ceux identifiés dans la littérature comme étant des sites importants d'autophosphorylation du récepteur, nous permettrait d'identifier le ou les sites dont la phosphorylation est essentielle à la régulation d'eNOS par le VEGF. De plus, en comparant la signalisation intracellulaire induite par le ou les mutants incapables de stimuler la synthèse de NO à celle induite par le récepteur VEGFR-2 sauvage, nous pourrions identifier la ou les voies jouant un rôle majeur dans le processus d'activation d'eNOS par ce récepteur. Ainsi, cette étude nous permettra d'identifier, pour la première fois, les étapes moléculaires du VEGFR-2 essentielles à l'activation d'eNOS dans les cellules endothéliales.

1.10 Approche expérimentale

Dans un premiers temps, le but de cette étude était de générer des versions mutantes du VEGFR-2, non-phosphorylables pour des tyrosines reconnues dans la littérature comme étant des sites importants d'autophosphorylation du récepteur; soit les tyrosines 801, 1175 et 1214. Par mutagenèse dirigée, ces résidus ont été mutés en phénylalanine (F), un acide aminé de structure similaire à la tyrosine mais ne pouvant être phosphorylé. Ceci préserve la structure tridimensionnelle du récepteur tout en le rendant non-phosphorylable au site muté. Ainsi, la signalisation du récepteur mutant sera semblable à celle

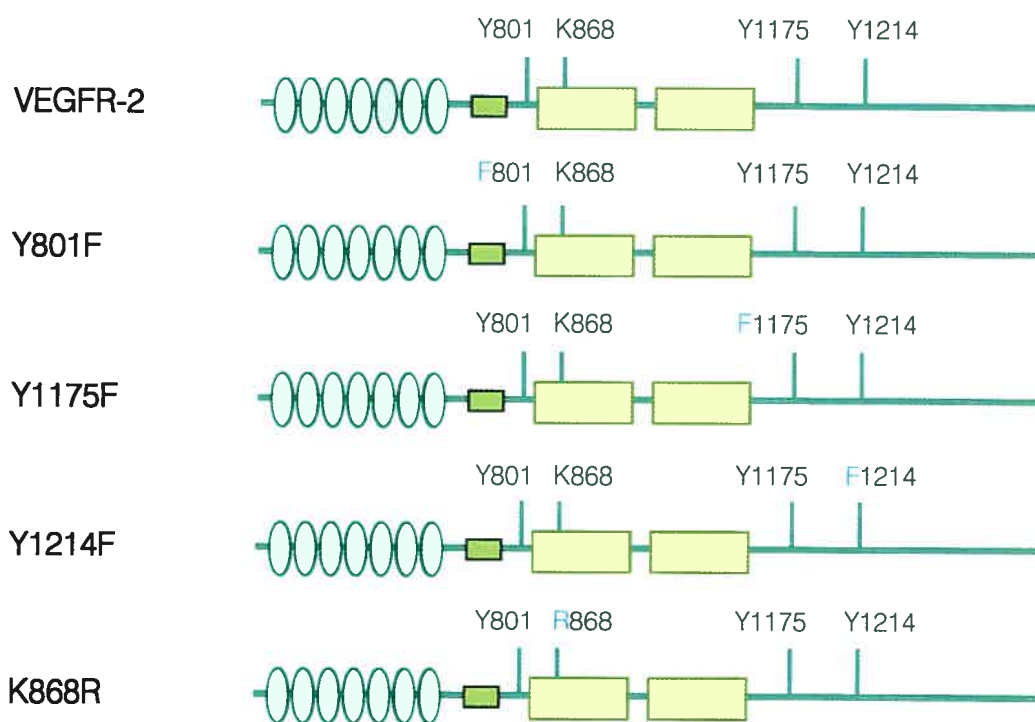


Figure 1.12 : Représentation structurale des différentes versions du VEGFR-2 utilisées lors de cette étude- On peut voir le récepteur de type sauvage (VEGFR-2) et les mutants (Y801F, Y1175F, Y1214F et K868R) ainsi que l'emplacement des résidus mutés. Y= tyrosine, F=phénylalanine, K= lysine, R= arginine.

du récepteur sauvage sauf pour l'incapacité du mutant à induire les voies de signalisation partant de la tyrosine mutée. De plus, un récepteur mutant pour la lysine (K) 868 fut créé afin de servir comme contrôle négatif. En effet, ce résidu est le site de liaison de l'ATP sur le récepteur. Étant muté en arginine (R), acide aminé de structure semblable à la lysine mais ne pouvant lier l'ATP, le récepteur ne peut s'autophosphoryler et perd son activité kinase. Par la suite, ces récepteurs mutants furent utilisés afin de déterminer la ou les tyrosines du VEGFR-2 dont la phosphorylation est essentielle à l'activation d'eNOS et à la production de NO, stimulées par le VEGF. Finalement, nous avons déterminé quelles voies de signalisation intracellulaires étaient principalement affectées par ces mutations et résultaient en une diminution de la production NO.

2. Article

Phosphorylation of tyrosine 801 of the VEGFR-2 is necessary for AKT-dependent eNOS activation and nitric oxide release from endothelial cells

Accord des coauteurs

1. Identification de l'étudiant et du programme

Mariela Garcia Blanes
M.Sc. Biologie Moléculaire (2-466-1-0)

2. Description de l'article

Ordre des auteurs : Garcia Blanes, M., Oubaha, M., Rautureau, Y., Gratton, JP.

Titre de l'article: Phosphorylation of tyrosine 801 of the VEGFR-2 is necessary for AKT-dependent eNOS activation and nitric oxide release from endothelial cells

Revue de soumission : The Journal of Biological Chemistry

État actuel de l'article : Publié le 6 avril 2007

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

À titre de coauteur de l'article ci-dessus, je suis d'accord pour que Mariela Garcia Blanes inclut cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre : *Étude des événements moléculaires impliqués dans l'activation de la synthèse endothéliale du monoxyde d'azote (eNOS) par le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF)*.

Malika Oubaha

Coauteur

Signature

02/04/2007

Date

Dr Yohann Rautureau

Coauteur

Signature

02/04/2007

Date

Dr Jean-Philippe Gratton

Coauteur

Signature

2/04/2007

Date

Copyright Permission Policy

ASBMB Journals

Journal of Biological Chemistry

Molecular and Cellular Proteomics

Journal of Lipid Research

Biochemistry and Molecular Biology Education

ASBMB Today

ASBMB does not charge for and grants use without requiring your copyright permission request for:

- Original authors wanting to reproduce portions of their own work; or to republish their material in not-for-profit formats or venues.
- Students wanting to reproduce or republish their work for educational purposes.
- Students using other authors' material for their theses.
- Reproduction or republication of abstracts only.
- Photocopying up to 5 copies for personal use.
- Non-profit educational institutions making multiple photocopies of articles for classroom use; all such reproduction must utilize institutionally owned equipment for this purpose.

Use of copyrighted material requires proper citation.

For all other uses, contact [Copyright Clearance Center](#).


Phosphorylation of tyrosine 801 of the VEGFR-2 is necessary for Akt-dependent eNOS activation and nitric oxide release from endothelial cells.

Mariela Garcia Blanes and Jean-Philippe Gratton*

Laboratory of Endothelial Cell Biology, Institut de recherches cliniques de Montréal (IRCM), Université de Montréal, 110 des Pins Ave West, Montréal, QC, H2W 1R7, Canada.

Running title: Tyrosine 801 signaling of the VEGFR-2

Key words: VEGF, VEGFR-2, tyrosine phosphorylation, endothelial nitric oxide synthase, nitric oxide, endothelial cells.

* Author for correspondence:
Dr. Jean-Philippe Gratton
110 des Pins Ave West, Montreal
QC, Canada, H2W 1R7
Phone: 514-987-5610
Fax: 514-987-5676
Email: 

2.1 Abstract

Vascular endothelial growth factor (VEGF)-stimulated nitric oxide (NO) release from endothelial cells is mediated through the activation of the VEGF receptor-2 (VEGFR-2). Herein, we have attempted to determine which autophosphorylated tyrosine residue on the VEGFR-2 is essential for VEGF-mediated eNOS activation and NO production from endothelial cells. Tyrosine residues 801, 1175 and 1214 of the VEGFR-2 were mutated to phenylalanine and the mutated receptors were analyzed for their ability to stimulate NO production. We show, both in COS-7 cell cotransfected with the VEGFR-2 mutants and eNOS and in bovine aortic endothelial cells (BAEC), that the Y801F-VEGFR-2 mutant is unable to stimulate NO synthesis and eNOS activation in contrast to the wild type, Y1175F and Y1214F-VEGFR-2. However, the Y801F mutant retains the capacity to activate phospholipase C- γ in contrast to the Y1175F-VEGFR-2. Interestingly, the Y801F-VEGFR-2, in contrast to the wild type receptor, does not fully activate phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) nor recruit the p85 subunit upon receptor activation. This results in inhibition of both VEGF-stimulated Akt activation and eNOS phosphorylation on serine 1179 in endothelial cells. In addition, constitutive activation of Akt or a phosphomimetic mutant of eNOS (S1179D) fully rescue the inability of the Y801F-VEGFR-2 to induce NO release. Finally, we generated an antibody that specifically recognizes the phosphorylated form of tyrosine 801 of the VEGFR-2 and demonstrate that this residue is actively phosphorylated in response to VEGF stimulation of endothelial cells. We thus conclude that autophosphorylation of tyrosine residue 801 of the VEGFR-2 is essential for VEGF-stimulated NO production from endothelial cells and this is primarily accomplished via the activation of PI3K and Akt signaling to eNOS.

2.2 Introduction

The vascular endothelial growth factor receptor-2 (VEGFR-2/Flk-1/KDR), is mainly responsible for the biological effects of VEGF in endothelial cells (1-4). Other transmembrane tyrosine kinase receptors, such as VEGFR-1 and -3, have also been shown to transduce the intracellular signals of VEGF (1;5). The role of VEGFR-1 appears, however, to be mostly evident during embryonic angiogenesis and VEGFR-3 signaling is restricted to lymphatic endothelial cells (5). Gene inactivation studies in mice have revealed an essential role for VEGFR-2 in vasculogenesis since VEGFR-2^{-/-} animals die between embryonic day 8.5 and 9.5 due to a lack of vascular development similar to the phenotype observed in VEGF null mice (6;7).

Signal transduction of the VEGFR-2 in endothelial cells leads to the endothelial responses that are characteristic of pro-angiogenic factors. VEGF-dependent DNA synthesis and proliferation of endothelial cells are strongly dependent on the activation of extracellular signal-regulated kinases (ERKs) 1 and 2 by the VEGFR-2, (2;8-10). Endothelial cell migration stimulated by VEGF involves both the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) and the p38 MAP kinase pathways (11-14). Activation of endothelial cell survival or anti-apoptotic signaling by VEGF participate in the formation of new blood vessels and in the maintenance of their integrity; VEGF inhibits endothelial cell apoptosis via the PI3K/Akt pathway (15).

VEGF-stimulated nitric oxide (NO) release from endothelial cell also depends on the activation of the VEGFR-2. NO is an important endothelial mediator that intervenes at most stages of VEGF-initiated cellular responses: proliferation, survival, migration and increase in vascular permeability (14;16-20). Moreover, eNOS deficient mice exhibit reduced responses to VEGF both in terms of new blood vessels formation and increase in vascular permeability (21). VEGF stimulation of endothelial cells activates at least two signaling pathways that

converge towards NO production. VEGF stimulates intracellular calcium mobilization in endothelial cells through the activation of phospholipase C- γ (PLC- γ) (22). Simultaneously, the PI3K-dependent activation of Akt by VEGFR-2 is responsible for eNOS phosphorylation on serine 1179 (1177 in human eNOS) which leads to increased eNOS activity and NO release (23;24).

As for other receptor tyrosine kinases, phosphorylation of several tyrosine (Y) residues in the intracellular domain of the VEGFR-2 has been shown to be essential for the recruitment and activation of SH2-bearing proteins implicated in intracellular signal transmission. Many of these ligand-induced autophosphorylated tyrosines have been directly identified through systematic phosphomapping of activated receptors or have been proposed to be phosphorylated based on their essential role in the activation of defined signaling pathway by VEGF. Some of the proposed phosphorylated tyrosines residues are: 801, 951, 996, 1008, 1054, 1059, 1175 and 1214 (8;25-28). Even though some slight discrepancies are present in the literature on the implication of certain residues in VEGFR-2 signaling, a consensus emerged on the role of some. Tyrosine residues 1054 and 1059, in the kinase insert domain seem to be needed for maximal intrinsic VEGFR-2 kinase activity (29;30). Other phosphorylated residues have been linked to the association and activation of SH2-containing adaptors as is the case for Y951 and the VRAP/TSad adaptor and Y1175 for Shb and Sck adaptors (25;31-34). Phosphorylation of Y1175 has been linked to PLC- γ activation, cell proliferation and more recently to vasculogenesis in mice (8;35;36). Phosphorylation of Y1214 is needed for p38 MAP kinase dependent actin remodeling and cellular migration (37). Finally, phosphorylation of Y801 has been linked to PI3K association to the VEGFR-2 and its activation (28).

The tyrosine residues on VEGFR-2 whose phosphorylation is needed for VEGF-stimulated eNOS activation and NO release remain unknown. Herein, we have attempted to determine which phosphorylated tyrosine on the VEGFR-2 is essential for VEGF-mediated NO production from endothelial cells. Since eNOS

activation is the resultant of at least two converging intracellular signals (PLC- γ and PI3K), we also investigated which of these pathways, upstream of eNOS, are essential for its activation. Our results show, both in a reconstituted COS-7 cell system and in bovine aortic endothelial cells (BAEC), that NO synthesis induced by the mutant Y1175F and Y1214F-VEGFR-2 is similar to that of the wild type receptor. In contrast, mutation of tyrosine 801 results in a complete inhibition of VEGFR-2-induced NO synthesis. Furthermore, the Y801F-VEGFR-2, in contrast to the wild type receptor, cannot activate the PI3K/Akt signaling pathway and induce eNOS phosphorylation on serine 1179. However, the Y801F mutant can still activate PLC- γ in contrast to the Y1175F-VEGFR-2. Finally, we demonstrate, using a phosphospecific antibody, that tyrosine 801 of the VEGFR-2 is actively phosphorylated in response to VEGF stimulation of endothelial cells. We thus conclude that autophosphorylation of the tyrosine residue 801 of the VEGFR-2 is essential for VEGF-stimulated NO production from endothelial cells and this is primarily accomplished via the activation of PI3K and Akt signaling to eNOS.

2.3 Experimental procedures

Cell culture

COS-7 cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% Foetal Bovine Serum (FBS, Gibco), 2.0 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin and 100 μ g/ml streptomycin. Bovine aortic endothelial cells (BAEC) were cultured in DMEM supplemented with 10% FBS (HyClone), 2.0 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin and 100 μ g/ml streptomycin. Endothelial cells were used at passages 7 or 8. For VEGF stimulations, cells were starved, 6h or overnight, in DMEM supplemented with 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.

Plasmids and transfections

Single point mutations resulting in codon change from tyrosine to phenylalanine for residues Y801, Y1175 and Y1214 and lysine to arginine for residue K868 were achieved using the QuikChangeSite-Directed mutagenesis kit (Stratagene) on human VEGFR-2 (in pRK7). The mutagenic primers (Invitrogen) used were: 5'-GGAAGTGAAGACAGGCTTCTTGTCATCGTCATGG-3' (Y801F), 5'-GCAGGATGGCAAAGACTTCATTGTTCTTCCGATATCA-3' (Y1175F), 5'-GACCCCAAATTCCATTTT GACAACACTGAGGAATCAGTC-3' (Y1214F), 5'-AGGACAGTAGCAGTCAGAATGTTGAAAGAAGGAGC-3' (K868R). All mutations were verified by DNA sequencing. Plasmid cDNA coding for human VEGFR-2, bovine eNOS, HA-HSP90 β , HA-Akt, and HA-myr-Akt were previously described (24;38;39). Mutant bovine eNOS plasmids (S1179A and S1179D) and p85-Flag were generously provided by Dr. William C. Sessa (Yale University School of Medicine, New Haven, CT, USA) and Dr. Charalabos Pothoulakis (Harvard Medical School, Boston, MA, USA)

respectively. For transfections, COS-7 and BAEC were cultured in either 6 wells plates, 60 or 100 mm dishes and were transfected at 80% confluence using Lipofectamine 2000 according to manufacturer's protocol (Invitrogen).

Nitric oxide release

To measure the amount of nitric oxide (NO) released from cells, samples of culture medium were taken and 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) as described previously (40). For the measurement of cumulated NO production in transfected COS-7 and BAEC, cell medium was taken 48h post-transfection and first subjected to ethanol precipitation of proteins. VEGF-stimulated NO production from BAEC was performed 48h post transfection on serum starved cells. The medium was processed for the measurement of nitrite following a 30 min VEGF (40 ng/ml) stimulation.

Antibodies

Mouse anti-VEGFR-2 antibody was from Santa Cruz Biotechnology; rabbit anti-phospho-Ser¹¹⁷⁷-eNOS, anti-Akt, anti-phospho-Ser⁴⁷³-Akt, anti-PLC- γ 1, anti-phospho-Tyr⁷⁸³-PLC- γ 1 and mouse anti-HA Tag (6E2) antibodies were purchased from Cell Signaling; Mouse anti-eNOS antibody from BD transduction laboratory; rabbit anti-HA antibody from Rockland; mouse anti-phospho-tyrosine (4G10) antibody from Upstate Biotechnology and mouse anti-Flag tag (M2) antibody from Sigma.

The rabbit anti-phospho-Tyr⁸⁰¹-VEGFR-2 antibody was raised against a KLH-conjugated synthetic phospho-peptide (G(pY)LSIVMDPDELPLDEC, Sigma-genosys) and the obtained serum was affinity purified using the SulfoLink Kit (Pierce Biotechnology). The rabbit anti-serum was first passed through a column linked to the corresponding unphosphorylated peptide (GYLSIVMDPDELPLDEC)

and the flow through of this step passed through a second column linked to the above phosphorylated peptide. Antibody specificity was verified following the purification steps of the serum using dot blot against the phosphorylated and unphosphorylated peptides.

Immunoprecipitations and immunoblotting

Cells were solubilized with a lysis buffer containing 1% NP-40, 50mM Tris-HCL, 125 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 0.1% SDS, 0.1% deoxycholic acid, 20mM sodium fluoride, 1 mM sodium pyrophosphate, 1 mM sodium orthovanadate, and protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics). Soluble proteins were quantified by DC protein assay (BioRad) and equal protein amounts were boiled in SDS sample buffer, separated by SDS-PAGE, transferred onto a nitrocellulose membrane (Hybond ECL, GE Healthcare). For immunoprecipitations, 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 and transferred to nitrocellulose membranes. For HA-Hsp90 immunoprecipitations, cells were solubilized using the following lysis buffer: 1% Tx-100, 20mM Tris-HCL, 100 mM NaCl, 2,5 mM EDTA, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 20mM sodium fluoride, 1 mM sodium pyrophosphate, 1 mM sodium orthovanadate, and protease inhibitor cocktail, and Protein G (Sigma) (50 μ l of a 50% slurry) was used for immunoprecipitation of the complex. For western blotting, antibody detection was performed by a chemiluminescence-based detection system (ECL, GE Healthcare) or by a LI-COR Odyssey infrared imaging system (LI-COR Biosciences) using Alexa 680 or Alexa 800 labeled secondary antibodies (Invitrogen).

Statistical analysis

Data were analyzed by ANOVA followed by Bonferroni's *post hoc* test. P value less than 0.05 was considered as significant.

2.4 Results and discussion

VEGFR-2 tyrosine mutants

VEGF-stimulated NO release from endothelial cells requires the autophosphorylation on tyrosine residues of the VEGFR-2. In order to identify the phosphorylated tyrosine residues of the VEGFR-2, essential for the activation of intracellular signaling pathways leading to eNOS activation and NO production, we generated punctual substitutions on the receptor. Tyrosine residues (Y) 801, 1175 and 1214, proposed in the literature as being potential autophosphorylation sites of the VEGFR-2 receptor, were changed to phenylalanine (F) (8;27;28;35-37;41). In addition, a kinase inactive receptor that has a lysine (K) to arginine (R) mutation at residue 868 in the ATP binding site of the tyrosine kinase domain was generated as a negative control (Fig. 2.1A). To monitor the level of total tyrosine phosphorylation of mutants versus wild type (WT) receptors, cell lysates from COS-7 cells expressing either the wild type or mutant receptors (K868R, Y801F, Y1175F, Y1214F) were immunoprecipitated using an anti-VEGFR-2 antibody and levels of tyrosine phosphorylation were evaluated by western blot with a pan anti-phosphotyrosine antibody (4G10). All VEGFR-2 constructs were expressed to similar levels and autophosphorylation levels on tyrosine were comparable for all the tyrosine substitution mutants and wild type receptors in contrast to the tyrosine kinase dead receptor K868R (Fig. 2.1B). This indicates that the overall tyrosine kinase activity of the tyrosine mutated receptor was not affected by the mutations.

Tyrosine 801 of the VEGFR-2 is essential for stimulation of NO release

We then sought to identify the tyrosine residues of the VEGFR-2 whose phosphorylation is essential for the activation of eNOS. Following 24h incubation, samples of culture medium from COS-7 cells, transfected with either eNOS alone or eNOS in combination with the wild type or the mutated receptors (K868R,

Y801F, Y1175F or Y1214F), were quantified for the amounts of accumulated nitrite (NO_2^-). Nitrites are the major nitric oxide oxidation by-product in aqueous solution (42). Firstly, higher levels of NO_2^- were detected in the medium of COS-7 cells expressing eNOS than in the medium of mock transfected cells (Fig 2.2, columns 1 and 2). Moreover, the cotransfection of wild type VEGFR-2 receptor with eNOS induced a significant augmentation in the production of NO compared to the production of cells expressing the enzyme alone (Fig. 2.2, columns 2 and 3). In contrast, expression of the kinase inactive receptor (K868R) did not produce this effect (Fig. 2.2, column 4). These results are consistent with the fact that the VEGFR-2 receptor has the capacity of inducing NO production (43) and show that this COS-7 heterologous expression system is suitable for monitoring of eNOS activation by the VEGFR-2. Interestingly, mutation of the tyrosine 801 to phenylalanine of the VEGFR-2 resulted in decreased NO production compared to the wild type VEGFR-2. The extent of NO synthesis induced by the Y801F mutant was similar to the NO released from cells transfected with the kinase inactive receptor K868R or eNOS alone, meaning that the Y801F mutation totally abolished the VEGFR-2-stimulated NO production. In contrast, mutation of tyrosines 1175 and 1214 did not significantly affect the amounts of NO released by the transfected cells when compared to the amounts released from the wild type VEGFR-2 transfected cells. Thus, these results suggest an essential role for tyrosine 801 of the VEGFR-2 in the stimulation of eNOS-dependent NO release. The slight, but non-significant, reduction in NO release by the 1175 and 1214 mutants compared to wild type receptor may point towards a secondary role for these residues in eNOS signaling in sharp contrast to Y801, which shows to be essential. In addition, we cotransfected with eNOS a Y1059F-VEGFR-2 mutant that has been previously shown to have altered the overall tyrosine kinase activity (results not shown) (30;44) and the amounts of NO released from these transfected cells were similar to the kinase dead K868R and Y801F mutants (results not shown).

To confirm the involvement of Y801 in signal transduction leading to eNOS activation, we characterized the impact of this mutation on VEGF-induced NO generation in an endothelial cell model. BAEC were transiently transfected with either an empty vector (pcDNA3.1), wild type, Y801F or Y1175F mutated VEGFR-2. Transfected BAEC were serum starved for 6 hours, stimulated for 30 minutes with VEGF (40 ng/ml) and medium samples collected for the quantification of the amount of nitrite present. Figure 2.3A shows the VEGF-stimulated increase in NO levels from the transfected BAEC. As expected, stimulation of the endogenous VEGFR-2 receptor in mock transfected cells resulted in increased basal NO production. Transfection of the WT-VEGFR-2 induced a marked increase in VEGFR-2 protein levels, as revealed by western blotting, and no changes were observed on eNOS protein levels (Fig. 2.3 bottom panels). The overexpression of the VEGFR-2 resulted in a slight increase, following VEGF stimulation, in the amounts of nitrite accumulated in the culture medium compared to mock transfected cells (Fig. 2.3A). Similarly, the mutation of tyrosine 1175 did not affect the VEGF-stimulated increase in NO production when compared to cells overexpressing the wild type receptor (Fig. 2.3A, columns 2 and 4). In contrast, VEGF stimulation of BAEC overexpressing the mutant Y801F receptor lead to a significant decrease in NO production compared to cells overexpressing the wild type and Y1175F receptors (Fig. 2.3A, column 3). Interestingly, NO released from cells expressing the Y801F mutant was less than from cells only expressing endogenous VEGFR-2 (Fig. 2.3A, compare columns 1 and 3). Based on this result, it seems that the mutant Y801F receptor possesses the ability to act as a dominant negative on the endogenous VEGFR-2 receptor and thus reduce eNOS activation by VEGF. Overall, these results allow us to confirm the tyrosine 801 residue of the VEGFR-2 as being essential for VEGF-dependent eNOS activation and NO synthesis from endothelial cells.

The amounts of NO released from transfected BAEC following a 24h accumulation in presence of serum was also quantified (Fig. 2.3B). As seen

previously in the transfected COS-7 cells (Fig. 2.2), overexpression of the WT-VEGFR-2 in BAEC increased NO release, in a VEGF-independent manner (Fig. 2.3B, column 2 versus column 1). This suggests that at in these conditions a fraction of the overexpressed VEGFR-2 becomes activated and this is sufficient to stimulate NO production. Mutation of tyrosine 1175 had no major impact on the capacity of the VEGFR-2 to increase basal NO synthesis. Conversely, BAEC overexpressing the Y801F mutant exhibited a reduced 24h NO accumulation compared to cells overexpressing the WT-VEGFR-2. Similarly, to the reconstituted COS-7 cells, NO levels in the Y801F transfected BAEC were comparable to the mock transfected cells (Fig. 2.3B, column 1 and 3).

Increased association between Hsp90 and eNOS requires tyrosine 801 of the VEGFR-2

To further confirm the inability of the Y801F mutant to activate eNOS, we monitored the association of eNOS to its activating protein Hsp90. It is well known that following stimulation of endothelial cells with agonists that promote NO release, the chaperone protein Hsp90 associates with eNOS and this results in increased enzyme activity and thus NO production (45;46). The level of association of eNOS to Hsp90 is a good indicator of the enzyme activation status (45-47). We thus monitored the Hsp90-eNOS interaction in response to VEGFR-2 activation using the WT and mutant receptors. COS-7 cells were transfected with HA tagged Hsp90, eNOS and the various VEGFR-2 constructs. Cell lysates were immunoprecipitated using anti-HA antibodies and the presence of eNOS in the immunoprecipitate monitored by western blotting (Fig. 2.4). Firstly, in lysates from cells transfected only with eNOS expression vector, eNOS protein was not detected in the HA immunoprecipitate demonstrating the specificity of the co-immunoprecipitation in this system (Fig. 2.4, lane 5). When both HA-Hsp90 and eNOS were transfected, a basal association between eNOS and HA-Hsp90 was observed (Fig. 2.4, top panel lane 1). The extent of eNOS and HA-Hsp90

association was increased when the wild type VEGFR-2 receptor was cotransfected (Fig. 2.4, lane 2), consistent with eNOS activation by the VEGFR-2. An increase in eNOS-Hsp90 association was also induced by the expression of the Y1175F-VEGFR-2 mutant (Fig. 2.4, lane 4). Finally, the level of eNOS-Hsp90 association in cells expressing the Y801F mutant was similar to that of cells expressing only eNOS and HA-Hsp90 demonstrating that mutation of this tyrosine residue prevents the VEGFR-2-dependent increase in eNOS and Hsp90 association (Fig. 2.4, compare lanes 1 and 3). Results obtained here, using the induction of eNOS-Hsp90 association as an indicator of the eNOS activation status, again confirm residue Y801 of the VEGFR-2 as essential for eNOS activation downstream of the receptor.

Activation of PLC- γ by the mutants VEGFR-2

The activation of eNOS by the VEGFR-2 is regulated mainly by two intracellular signaling cascades: the PI3K/Akt pathway and the increase in intracellular free calcium initiated by the activation of PLC- γ . We first analyzed the activation of PLC- γ by the VEGFR-2 by monitoring the phosphorylation level of the PLC- γ by western blotting COS-7 cell lysates expressing the wild type or mutant Y801F, Y1175F or Y1214F receptors. As expected, expression of a wild type VEGFR-2 receptor in COS-7 cells results in endogenous PLC- γ phosphorylation. In contrast, the expression of the kinase inactive receptor K868R did not induce PLC- γ activation (Fig. 2.5A). Expression of the mutants Y801F and Y1214F receptors increased PLC- γ tyrosine phosphorylation to levels similar to those induced by the wild type VEGFR-2. Conversely, the Y1175F mutation prevented the VEGFR-2-dependent PLC- γ phosphorylation as COS-7 cells expressing this mutant displayed levels of PLC- γ phosphorylation similar to those induced by the K868R inactive kinase mutant. These results were confirmed by the assessment of the VEGFR-2-dependent activation of PLC- γ in endothelial cells. BAEC overexpressing the WT-VEGFR-2 receptor or the mutants Y801F and Y1175F were stimulated with VEGF

(40 ng/ml; 10 min) and PLC- γ activation was monitored via the levels of tyrosine 783 phosphorylation. Figure 2.5B shows that VEGF stimulation of control transfected BAEC, expressing only the endogenous VEGFR-2 receptor, resulted in the phosphorylation of PLC- γ . BAEC that overexpress the WT-VEGFR-2, as confirmed by western blotting (Fig. 2.5B, top panel), displayed increased PLC- γ activation following VEGF stimulation. As seen previously in transfected COS-7 cells (Fig. 2.5A), the Y801F mutant allowed for VEGF-dependent increase in PLC- γ phosphorylation to levels similar to the increase induced by the wild type receptor. In contrast, similar increases in the phosphorylation of PLC- γ in response to VEGF stimulation were not observed in BAEC overexpressing the Y1175F-VEGFR-2. PLC- γ activation in these cells was identical to control transfected BAEC expressing only the endogenous VEGFR-2 (Fig. 2.5B, middle panel). These results confirm the previously published data demonstrating the essential role of tyrosine 1175 phosphorylation in the activation of PLC- γ by VEGF. In addition, our results demonstrate that phosphorylation on tyrosine 801 of the VEGFR-2 is dispensable for PLC- γ activation.

Tyrosine 801 of the VEGFR-2 is essential for PI3K, Akt and eNOS phosphorylation

Firstly, we monitored if the Y801F mutant could induce tyrosine phosphorylation of the regulatory subunit of PI3K, p85. COS-7 cells were cotransfected with Flag tagged p85 in absence or in presence of WT or Y801F-VEGFR-2. Cell lysates were immunoprecipitated for the Flag epitope and tyrosine phosphorylation of p85 monitored by western blotting. Figure 2.6A shows that expression of the WT-VEGFR-2 induced a marked increase in the tyrosine phosphorylation levels of p85 when compared to cells expressing Flag-p85 alone. In contrast, the Y801F mutant only partially stimulated the phosphorylation of p85 indicating that tyrosine 801 is necessary for the full activation of PI3K by the VEGFR-2. We also monitored the phosphorylation dependent association between p85 and the VEGFR-2. Flag-p85 was thus immunoprecipitated from lysates of COS-7 cells expressing either the

WT-, Y801F- or K868R-VEGFR-2. Figure 2.6B shows that the WT-VEGFR-2 was present in the Flag immunoprecipitate only if Flag-p85 was cotransfected with the receptor indicating a specific association between the two proteins (Fig. 2.6B, lanes 1 and 2). Interestingly, when compared to the WT receptor the Y801F-VEGFR-2 displayed a marked reduction in its association with p85 (Fig. 2.6B, lanes 2 and 3). As expected, no association between the kinase inactive receptor, K868R-VEGFR-2, and p85 was observed. Overall these results are in agreement with the previously proposed participation of tyrosine 801 phosphorylation (799 in mouse) in the activation and docking of p85 to the VEGFR-2 (28).

The VEGF-dependent activation of Akt was then monitored in BAEC. As above, the WT and Y801F-VEGFR-2 were overexpressed in BAEC and the activation of Akt, following VEGF stimulation, monitored via serine 473 phosphorylation. As expected, VEGF stimulation of the endogenous VEGFR-2 receptor in mock transfected cells resulted in Akt phosphorylation. This phosphorylation was increased in BAEC overexpressing the wild type VEGFR-2 (Fig. 2.6C). However, the levels of VEGF-dependent Akt phosphorylation in BAEC overexpressing the Y801F mutant were similar to those observed in cells expressing only the endogenous receptor indicating that the Y801F is deficient for the VEGF-stimulated activation of Akt.

We then monitored, by western blotting, the Akt phosphorylation site on eNOS, serine 1179, in response to VEGF stimulation of BAEC (Fig. 2.6D). BAEC, transfected either with an empty vector or overexpressing the wild type and the mutant Y801F-VEGFR-2, were stimulated with VEGF (40 ng/ml; 5 min). Stimulation of the control transfected BAEC resulted, as expected, in eNOS phosphorylation on Ser1179 and this phosphorylation was increased in cells overexpressing the WT-VEGFR-2. BAEC overexpressing the Y801F mutant displayed eNOS phosphorylation levels, in response to VEGF stimulation, identical to those seen in mock transfected cells (Fig. 2.6D). We can thus conclude that the phosphorylation of the VEGFR-2 on tyrosine 801 is essential for the VEGF-dependent

phosphorylation/activation of Akt and its substrate eNOS in endothelial cells.

eNOS phosphorylation by Akt restores NO release

To further demonstrate the essential role of Y801 phosphorylation in the activation of eNOS by Akt, we verified if artificial activation of 1) Akt and 2) eNOS would rescue the phenotype induced by the mutation of the tyrosine 801 of the VEGFR-2. Figure 2.7A shows that the cotransfection of eNOS and the wild type VEGFR-2 in COS-7 cells resulted in increased NO production compared to eNOS expressed alone (white columns). As previously shown, the Y801F-VEGFR-2 mutant did not increase eNOS-dependent NO production. Transfection of a constitutively activated form of Akt, myristoylated-Akt (myr-Akt), along with eNOS markedly increased NO production over eNOS expressed alone (Fig. 2.7A, black columns). Cotransfection of the WT-VEGFR-2 with eNOS and myr-Akt further increased NO release when compared to the levels of NO detected in eNOS and myr-Akt transfected cells. Interestingly, even though the Y801F mutant did not potentiate NO release from eNOS expressing cells, cotransfection of this mutant with eNOS and myr-Akt significantly increased NO production to levels seen in cells expressing the wild type VEGFR-2, eNOS and myr-Akt. This suggests that the VEGFR-2-independent activation of Akt signaling re-establishes the capacity of the Y801F mutant to induce eNOS activation.

In a similar manner, we investigated if constitutively activated eNOS, using an aspartate substitution at residue Ser1179, which acts as a phosphomimetic, could rescue the Y801F-VEGFR-2 NO release defect (23;24;48). Cotransfection of COS-7 cells with wild type eNOS and in combination with the wild type or mutant (Y801F or Y1175F) VEGFR-2 gave similar results as previously (Fig. 2.2): the wild type and Y1175F-VEGFR-2 both induced an increase in NO production when compared to cells expressing eNOS alone whereas the Y801F mutation abolished this VEGFR-2-stimulated increase in NO synthesis (Fig. 2.7B, white columns). However, when the different forms of the receptor (WT, Y801F, Y1175F) were

transfected in combination with the non-phosphorylatable S1179A mutant of eNOS, the increases in NO synthesis induced by the VEGFR-2 were not observable (Fig. 2.7B, black columns). As previously reported, elimination of the Akt phosphorylation site on eNOS has the ability to abolish the VEGFR-2-dependent stimulation of NO production (23;24). Furthermore, when the constitutively active S1179D-eNOS, was transfected alone into COS-7 cells, the amount of NO released were, as expected, greater than those released by WT-eNOS (Fig. 2.7B, grey columns) (23;24;48). Moreover, cotransfection of S1179D-eNOS with the WT-VEGFR-2 resulted in a further increase in NO release indicating that signaling events other than serine 1179 phosphorylation on eNOS contribute to VEGFR-2-dependent NO release. Cotransfection of the Y1175F-VEGFR-2 with S1179D-eNOS yielded similar amounts of NO when compared to the WT-VEGFR-2. Interestingly, the Y801F-VEGFR-2 was able to stimulate NO production from S1179D-eNOS to levels identical to those of the wild type receptor. This clearly suggests that restoration of the phosphorylation of eNOS on the Ser1179 Akt site allows for a complete rescue of the capacity of the Y801F-VEGFR-2 to stimulate NO release. In addition, these results also confirm that induction of the phosphorylation of eNOS on serine 1179 is an essential event in the activation of the enzyme by VEGF. Other VEGF signaling pathways surely converge on eNOS, as suggested by the fact that the wild type VEGFR-2 still potentiated NO release from S1179D-eNOS, however these last results indicate that phosphorylation on serine 1179 downstream of Akt is a primary and essential step for VEGF-mediated NO release.

Tyrosine 801 is actively phosphorylated in response to VEGF stimulation

Finally, to demonstrate that tyrosine 801 of the VEGFR-2 is phosphorylated following activation of the receptor by VEGF and confirm that it plays a role in VEGF signaling, we have generated an antibody that recognizes the phosphorylated form of the receptor at tyrosine 801. Tyrosine residues 956, 1175

and 1214 of the VEGFR-2 have been directly identified as major autophosphorylation sites following VEGF stimulation (8;25). Although tyrosine 801 has been proposed as a VEGFR-2 activation site for the PI3K signaling pathway (28) and now eNOS activation, direct demonstration of its phosphorylation has never been achieved. To verify the specificity of our antibody for the phosphorylation status of Tyr801, we first performed dot blot analysis using the phosphorylated (G(pY)LSIVMDPDELPLDEC) immunogenic peptides and non-phosphorylated (GYLSIVMDPDELPLDEC) version. The affinity-purified serum clearly recognized the phosphorylated version of the peptide with higher affinity than the non-phosphorylated version (Fig. 2.8A). Next, we transfected COS-7 cells with the wild type and mutant VEGFR-2 receptors (K868R, Y801F, Y1175F). Cell lysates were immunoprecipitated for the VEGFR-2 and western blotted with the tyrosine 801 phosphospecific antibody. The antibody specifically detected phosphorylation in the wild type and the mutant Y1175F-VEGFR-2 but failed to recognize the kinase inactive receptor K868R and minimally detected the Y801F-VEGFR-2 (Fig. 2.8B). In addition, we controlled for the levels of total tyrosine phosphorylation using the pan-phosphotyrosine antibody (4G10) and found, as shown in figure 2.1B, that the overall phosphorylation of the mutant receptor Y801F was similar to that of the mutant Y1175F and wild type receptors (Fig. 2.8B). This shows that the tyrosine 801 phosphospecific antibody recognized predominantly the phosphorylated form of tyrosine 801.

To demonstrate that this residue on the VEGFR-2 is phosphorylated in endothelial cells in response to VEGF stimulation, BAEC were stimulated with VEGF (40ng/ml) for 0, 3, 5, 15, 30 min and the receptor was immunoprecipitated and subjected to a western blot using the phosphospecific-Y801 antibody. Figure 2.8C shows an increase in Tyr801 phosphorylation in response to VEGF in endothelial cells that reached maximal phosphorylation at 5 minutes of stimulation (Fig. 2.8C, top panel). The kinetics of tyrosine 801 phosphorylation followed the overall autophosphorylation of the VEGFR-2 as revealed by reprobing the

membrane with the pan-phosphotyrosine antibody (4G10) (Fig. 2.8C, middle panel). As previously reported, VEGF stimulation of endothelial cells induced the downregulation of the VEGFR-2, as revealed by reprobing of the immunoprecipitate with an anti-VEGFR-2 antibody (Fig. 2.8C, bottom panel) (38). These results clearly indicate that the tyrosine residue 801 of the VEGFR-2 is an important autophosphorylation site of this receptor following VEGF stimulation and thus, can potentially participate in the VEGFR-2 induced cellular response leading to eNOS activation and NO release from endothelial cells.

Concluding comments

The results presented here clearly show that activation of eNOS following VEGF stimulation of endothelial cells necessitate the autophosphorylation of tyrosine residue 801 of the VEGFR-2. Nitric oxide release from endothelial cells is regulated primarily through the activation of the PI3K/Akt pathway, which leads to eNOS phosphorylation. Our results demonstrate that eNOS phosphorylation on serine 1179 by Akt is an obligatory event for eNOS activation and NO production in response to VEGF and suggest that other VEGF signaling pathways such as PLC- γ activation are not primary events for eNOS activation. Even though other signaling pathways surely participate in eNOS activation by VEGF, shown by the fact that the VEGFR-2 still potentiates NO release from the constitutively activated eNOS (S1179D), we suggest that phosphorylation of tyrosine 801 of the VEGFR-2, full PI3K-mediated activation of Akt and eNOS phosphorylation are obligatory events for NO release stimulated by VEGF. Our results do not exclude secondary tyrosine phosphorylation sites on the VEGFR-2 that may participate in PI3K activation since partial recruitment and phosphorylation of p85 was still observed in the Y801F-VEGFR-2. However, the full activation of PI3K seems to be necessary for eNOS phosphorylation by Akt. In addition, intermediate adaptor proteins, in response to the phosphorylation of tyrosine residues, may intervene in the recruitment of p85 to the receptor. Such a role was recently described for Gab1

(49). Nonetheless, our results suggest that the full activation of this pathway is essential for the resulting NO release to occur.

Interestingly, phosphorylation of tyrosine 1175 of the VEGFR-2 has been shown to be essential for embryonic vasculogenesis in mice. The fact that phosphorylation of this residue is not essential for NO release is in line with a predominant role for NO in VEGF-driven angiogenesis in adults, suggesting that the phosphorylation of the two residues (801 and 1175) participate in different components of VEGF-mediated vessel formation. In summary, we have identified phosphorylation of tyrosine 801 of the VEGFR-2 as the earliest intracellular event essential for VEGF signal transduction to eNOS and for the release of an important modulator of VEGF effects on endothelial cells, nitric oxide.

2.5 References

1. Takahashi, H. and Shibuya, M. (2005) *Clin. Sci. (Lond)* **109**, 227-241
2. Munoz-Chapuli, R., Quesada, A. R., and Angel, M. M. (2004) *Cell Mol. Life Sci.* **61**, 2224-2243
3. Ferrara, N. (2004) *Endocr. Rev.* **25**, 581-611
4. Zachary, I. and Glick, G. (2001) *Cardiovasc. Res.* **49**, 568-581
5. Shibuya, M. and Claesson-Welsh, L. (2006) *Exp. Cell Res.* **312**, 549-560
6. Shalaby, F., Rossant, J., Yamaguchi, T. P., Gertsenstein, M., Wu, X. F., Breitman, M. L., and Schuh, A. C. (1995) *Nature* **376**, 62-66
7. 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., and Nagy, A. (1996) *Nature* **380**, 435-439
8. Takahashi, T., Yamaguchi, S., Chida, K., and Shibuya, M. (2001) *EMBO J.* **20**, 2768-2778
9. Ng, Y. S., Krilleke, D., and Shima, D. T. (2006) *Exp. Cell Res.* **312**, 527-537
10. Takahashi, T. and Shibuya, M. (1997) *Oncogene* **14**, 2079-2089
11. Rousseau, S., Houle, F., Kotanides, H., Witte, L., Waltenberger, J., Landry, J., and Huot, J. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 10661-10672
12. Rousseau, S., Houle, F., Landry, J., and Huot, J. (1997) *Oncogene* **15**, 2169-2177
13. Dimmeler, S., Dernbach, E., and Zeiher, A. M. (2000) *FEBS Lett.* **477**, 258-262
14. Morales-Ruiz, M., Fulton, D., Sowa, G., Languino, L. R., Fujio, Y., Walsh, K., and Sessa, W. C. (2000) *Circ. Res.* **86**, 892-896
15. Gerber, H. P., McMurtrey, A., Kowalski, J., Yan, M., Keyt, B. A., Dixit, V., and Ferrara, N. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 30336-30343

16. Shizukuda, Y., Tang, S., Yokota, R., and Ware, J. A. (1999) *Circ. Res.* **85**, 247-256
17. Parenti, A., Morbidelli, L., Cui, X. L., Douglas, J. G., Hood, J. D., Granger, H. J., Ledda, F., and Ziche, M. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 4220-4226
18. Morbidelli, L., Chang, C. H., Douglas, J. G., Granger, H. J., Ledda, F., and Ziche, M. (1996) *Am. J. Physiol* **270**, H411-H415
19. Papapetropoulos, A., Garcia-Cardena, G., Madri, J. A., and Sessa, W. C. (1997) *J. Clin. Invest* **100**, 3131-3139
20. Murohara, T., Horowitz, J. R., Silver, M., Tsurumi, Y., Chen, D., Sullivan, A., and Isner, J. M. (1998) *Circulation* **97**, 99-107
21. 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
22. He, H., Venema, V. J., Gu, X., Venema, R. C., Marrero, M. B., and Caldwell, R. B. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 25130-25135
23. Dimmeler, S., Fleming, I., Fisslthaler, B., Hermann, C., Busse, R., and Zeiher, A. M. (1999) *Nature* **399**, 601-605
24. 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
25. Matsumoto, T., Bohman, S., Dixelius, J., Berge, T., Dimberg, A., Magnusson, P., Wang, L., Wikner, C., Qi, J. H., Wernstedt, C., Wu, J., Bruheim, S., Mugishima, H., Mukhopadhyay, D., Spurkland, A., and Claesson-Welsh, L. (2005) *EMBO J.* **24**, 2342-2353
26. Dougher-Vermazen, M., Hulmes, J. D., Bohlen, P., and Terman, B. I. (1994) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **205**, 728-738
27. Cunningham, S. A., Arrate, M. P., Brock, T. A., and Waxham, M. N. (1997) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **240**, 635-639

28. Dayanir, V., Meyer, R. D., Lashkari, K., and Rahimi, N. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 17686-17692
29. Dougher, M. and Terman, B. I. (1999) *Oncogene* **18**, 1619-1627
30. Kendall, R. L., Rutledge, R. Z., Mao, X., Tebben, A. J., Hungate, R. W., and Thomas, K. A. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 6453-6460
31. Wu, L. W., Mayo, L. D., Dunbar, J. D., Kessler, K. M., Ozes, O. N., Warren, R. S., and Donner, D. B. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 6059-6062
32. Warner, A. J., Lopez-Dee, J., Knight, E. L., Feramisco, J. R., and Prigent, S. A. (2000) *Biochem. J.* **347**, 501-509
33. Ratcliffe, K. E., Tao, Q., Yavuz, B., Stoletov, K. V., Spring, S. C., and Terman, B. I. (2002) *Oncogene* **21**, 6307-6316
34. Holmqvist, K., Cross, M. J., Rolny, C., Hagerkvist, R., Rahimi, N., Matsumoto, T., Claesson-Welsh, L., and Welsh, M. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 22267-22275
35. Knight, E. L., Warner, A. J., Maxwell, A., and Prigent, S. A. (2000) *Oncogene* **19**, 5398-5405
36. Sakurai, Y., Ohgimoto, K., Kataoka, Y., Yoshida, N., and Shibuya, M. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **102**, 1076-1081
37. Lamalice, L., Houle, F., Jourdan, G., and Huot, J. (2004) *Oncogene* **23**, 434-445
38. Duval, M., Bedard-Goulet, S., Delisle, C., and Gratton, J. P. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 20091-20097
39. 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
40. 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
41. Meyer, R. D., Dayanir, V., Majnoun, F., and Rahimi, N. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 27081-27087

42. Ignarro, L. J., Fukuto, J. M., Griscavage, J. M., Rogers, N. E., and Byrns, R. E. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **90**, 8103-8107
43. Kroll, J. and Waltenberger, J. (1999) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **265**, 636-639
44. Dougher, M. and Terman, B. I. (1999) *Oncogene* **18**, 1619-1627
45. Russell, K. S., Haynes, M. P., Caulin-Glaser, T., Rosneck, J., Sessa, W. C., and Bender, J. R. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 5026-5030
46. Garcia-Cardena, G., Fan, R., Shah, V., Sorrentino, R., Cirino, G., Papapetropoulos, A., and Sessa, W. C. (1998) *Nature* **392**, 821-824
47. Gratton, J. P., Fontana, J., O'Connor, D. S., Garcia-Cardena, G., McCabe, T. J., and Sessa, W. C. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 22268-22272
48. McCabe, T. J., Fulton, D., Roman, L. J., and Sessa, W. C. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 6123-6128
49. Dance, M., Montagner, A., Yart, A., Masri, B., Audigier, Y., Perret, B., Salles, J. P., and Raynal, P. (2006) *J. Biol. Chem.* **281**, 23285-23295

2.6 Footnotes

Abbreviations used are: BAEC, bovine aortic endothelial cell; DMEM, dulbecco's modified eagle's medium; eNOS, endothelial nitric oxide synthase; FBS, fetal bovine serum; HA, hemagglutinin; Hsp90, heat shock protein 90; MAP, mitogen-activated protein; myr-Akt, myristoylated-Akt; NO, nitric oxide; PI3K, phosphatidylinositol 3-kinase; PLC- γ , phospholipase C-gamma; SH, Src homology; VEGF, vascular endothelial growth factor; VEGFR, vascular endothelial growth factor receptor; WT, wild type.

The authors wish to thank Dr. Jean-Francois Côté for critically reading the manuscript. This work was supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) (MOP-53295 to J.P.G) and by a grant from the Terry Fox Foundation through the National Cancer Institute of Canada (#15139 to J.P.G.). M.G.B. was a recipient of a Masters studentship from the CIHR. J.P.G. holds a Tier II Canada Research Chair.

2.7 Figure legends

Figure 2.1. Expression and activation of wild type and mutants VEGFR-2 receptors.

A, Schematic drawing of the different receptors used in this study. The tyrosine residue 801 is located in the intracellular juxtamembrane region of the VEGFR-2 whereas tyrosines 1175 and 1214 are at the carboxy-terminal end of the receptor. Lysine 868 is in the first kinase domain of the VEGFR-2. The immunoglobuline-like domains, transmembrane-spanning domain and tyrosine kinase domains characteristics of the VEGFR-2 are represented by grey circles, black boxes and grey boxes, respectively. *B*, COS-7 cells were transfected with the expression vectors coding for β -gal as a control, the wild type and mutant VEGFR-2 as indicated. 48h post-transfection, cells were lysed and equal amounts of soluble protein were subjected to VEGFR-2 immunoprecipitation (IP). The total tyrosine phosphorylation levels of these receptors were detected by western blotting (wb) using the anti- PO_4^- -Tyr antibody and the same membrane was then stripped and reprobed with anti-VEGFR-2 antibody to confirm protein levels.

Figure 2.2. Stimulation of NO release by the VEGFR-2 mutants.

COS-7 cells were transfected with eNOS in absence or in presence of the wild type (WT) or mutant VEGFR-2 as indicated. Following a 24h incubation, samples of culture medium were subjected to NO quantification as described in *Experimental procedures*. Expression levels of the transfected proteins were monitored by western blotting (wb) using anti-VEGFR-2 and anti-eNOS antibodies. For each experiment, the mean amounts of NO produced over basal by cells transfected with eNOS alone were normalized for comparison between experiments. These results represent the mean of 4 experiments performed in triplicates. * $P < 0.01$ and n/s: not significant versus WT-VEGFR-2 expressing cells.

Figure 2.3. Implication of tyrosine 801 of the VEGFR-2 in VEGF-stimulated NO production from endothelial cells.

A, BAEC cells were transfected with either an empty vector (control), wild type (WT)-VEGFR-2, Y801F and Y1175F mutants as indicated. Transfected BAEC were serum starved for 6 hours and duplicates were stimulated or not with VEGF (40 ng/ml) for 30 minutes. Samples of culture medium were taken for nitrite quantification as described in Experimental procedures. The increase in NO_2^- production was calculated by subtracting the amounts of NO produced by the non VEGF-stimulated cells from the amounts produced by VEGF-stimulated BAEC in each duplicate. B, BAEC were transfected as in A and 24 h accumulation of nitrite in the culture medium was quantified as above. For comparison between experiments, the NO_2^- production was normalized to the amounts released from control transfected cells. These results represent the mean of 3 and 5 experiments respectively. * $P < 0.05$, n/s= not significant. Bottom panels show a representative VEGFR-2 and eNOS protein expression levels in transfected BAEC detected by western blotting (wb).

Figure 2.4. The Y801F-VEGFR-2 mutant does not increase the association between eNOS and Hsp90.

COS-7 cells were transfected with eNOS alone, eNOS and HA-Hsp90 or eNOS and HA-Hsp90 in presence of the indicated VEGFR-2 constructs. 48h post-transfection, serum starved transfected cells were stimulated with VEGF (40 ng/ml; 10 min). Cells were then lysed and the lysates were subjected to HA-Hsp90 immunoprecipitation using an anti-HA antibody. Samples were separated by SDS-PAGE and western blotted (wb) with anti-eNOS antibody followed by anti-HA antibody. Transfection levels were verified by western blot of whole cell lysates (WCL) using anti-VEGFR-2 and anti-eNOS antibodies.

Figure 2.5. Activation of PLC- γ requires tyrosine 1175 of the VEGFR-2 but not tyrosine 801.

A, COS-7 cells were transfected with either an empty vector (mock) or the wild type (WT) or mutants VEGFR-2 as indicated. 48h following transfection, serum starved cells were stimulated with VEGF (40 ng/ml; 10min) and lysed. Cell lysates were separated by SDS-PAGE and the levels of PLC- γ tyrosine phosphorylation was analyzed by western blot (wb) with an antibody recognizing the phosphorylated form of PLC- γ at tyrosine 783 (PO₄⁻-Tyr⁷⁸³-PLC- γ). The same membrane was stripped and reprobbed with anti-VEGFR-2 and anti-PLC- γ antibodies. *B*, BAEC cells were transfected with expression vectors coding for the wild type (WT) or mutant VEGFR-2, as indicated. 48h following transfection, serum starved BAEC were stimulated or not with VEGF (40 ng/ml; 10min), lysed and cell lysates were treated as in *A*.

Figure 2.6. Tyrosine 801 of the VEGFR-2 is essential for PI3K, Akt and eNOS phosphorylation.

A-B, COS-7 cells were transfected with the indicated VEGFR-2 expression vectors in combination with Flag-p85. 48h following transfection, serum starved cells were lysed and subjected to Flag immunoprecipitation. *A*, The levels of p85 phosphorylation were analyzed by western blot using the anti-PO₄⁻-Tyr antibody. In *B*, the amounts of VEGFR-2 present in the Flag immunoprecipitate was monitored by western blotting using an anti-VEGFR-2 antibody. Protein expression levels were verified by western blot (wb) with the anti-Flag antibody on the immunoprecipitate and the anti-VEGFR-2 antibody on whole cell lysates (WCL). *C-D*, BAEC cells were transfected with either an empty vector (Mock), wild type (WT)-VEGFR-2 or Y801F expression plasmids. Serum starved cells were stimulated or not with VEGF (40 ng/ml; 5 min) and lysed. Levels of *C*, Akt and *D*, eNOS phosphorylation were analyzed by western blotting with antibodies recognizing the phosphorylated form of Akt at serine 473 or eNOS at serine 1177, respectively.

Total protein levels were verified by western blot with anti-VEGFR-2 antibody followed by anti-Akt or anti-eNOS antibody. These results are representative of at least 4 independent experiments.

Figure 2.7. Constitutive phosphorylation of eNOS by Akt restores NO release stimulated by Y801F-VEGFR-2.

A, COS-7 cells were transfected with either eNOS alone or in presence of the various VEGFR-2 constructs (white bars). eNOS was also transfected with myr-Akt in absence or presence of the indicated VEGFR-2 constructs (black bars). Samples of culture medium from the transfected cells were taken following a 24h accumulation and were then subjected to nitrite quantification as describe in *Experimental procedures*. Protein expression was verified by western blot (wb) of cellular lysates using anti-VEGFR-2, anti-eNOS and anti-Akt antibodies. For comparison between experiments, NO levels were normalized over the mean production of cells transfected with eNOS alone. * $P < 0.05$ versus eNOS alone, † $P < 0.05$ versus eNOS and myr-Akt transfected cells. These results are the mean of at least 3 different experiments in triplicate. B, Wild type (WT) eNOS (white bars), S1179A eNOS (black bars) or S1179D eNOS (grey bars) were transfected in COS-7 cells either alone or in combination with the different VEGFR-2 constructs, as indicated. Following a 24h accumulation, samples of culture medium were subjected to nitrite quantification and protein expression levels were verified by western blotting as in A. * $P < 0.05$ versus S1179D eNOS transfected cells. These results are the average of at least 3 experiments.

Figure 2.8. Tyrosine residue 801 of the VEGFR-2 is phosphorylated following VEGF stimulation.

A, The purified tyrosine 801 phosphospecific antibody (1:1000 dilution; 0.2 $\mu\text{g/ml}$) was used for dot blot analysis of increasing amounts (0 to 100 ng) of the phosphorylated immunogenic peptides and the non-phosphorylated version used

for affinity purification of the serum. *B*, The tyrosine 801 phosphospecific antibody was used for the western blotting of VEGFR-2 immunoprecipitated from COS-7 cell lysates transfected with either an empty vector, the wild type (WT)-VEGFR-2 or the mutants receptors (K868R, Y801F or Y1175F). The membrane was subsequently stripped and reprobed with the pan anti-PO₄⁻-Tyr antibody followed by the anti-VEGFR-2 antibody. *B*, Serum starved BAEC were stimulated with 40ng/ml VEGF for 0, 3, 5, 15 and 30 min and cell lysates were subjected to immunoprecipitation using anti-VEGFR-2 or non-immune (NI) antibodies. Immunoprecipitates were then western blotted using the tyrosine 801 phosphospecific antibody followed by the pan anti-PO₄⁻-Tyr and anti-VEGFR-2 antibodies. These results are representative of 3 independent experiments.

2.8 Figures

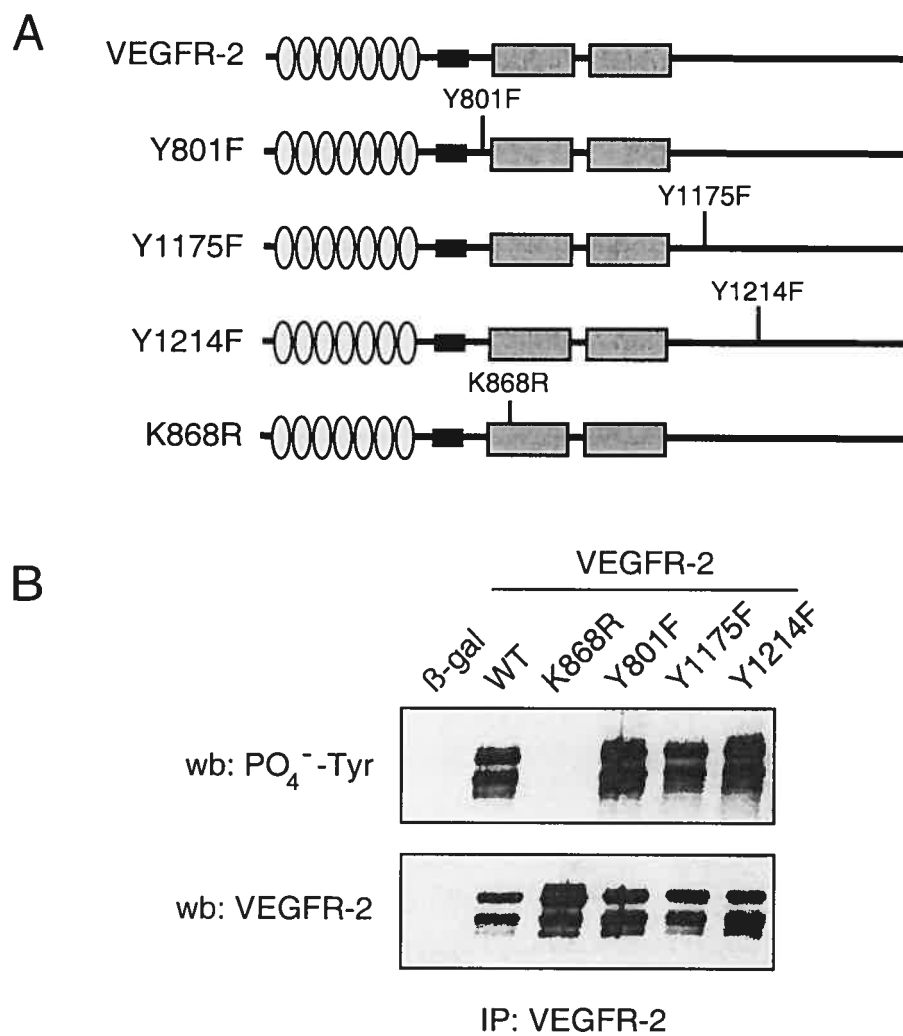


Figure 2.1: Expression and activation of wild type and mutants VEGFR-2 receptors.

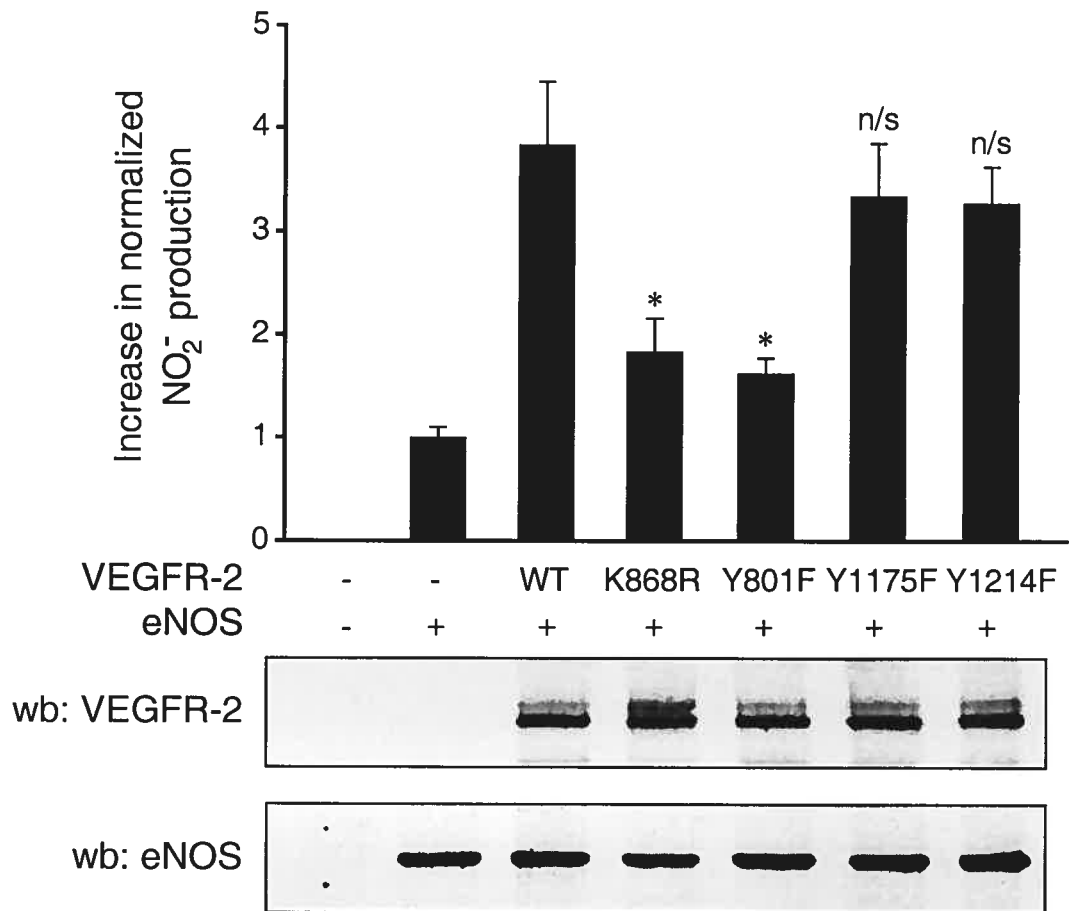


Figure 2.2: Stimulation of NO release by the VEGFR-2 mutants.

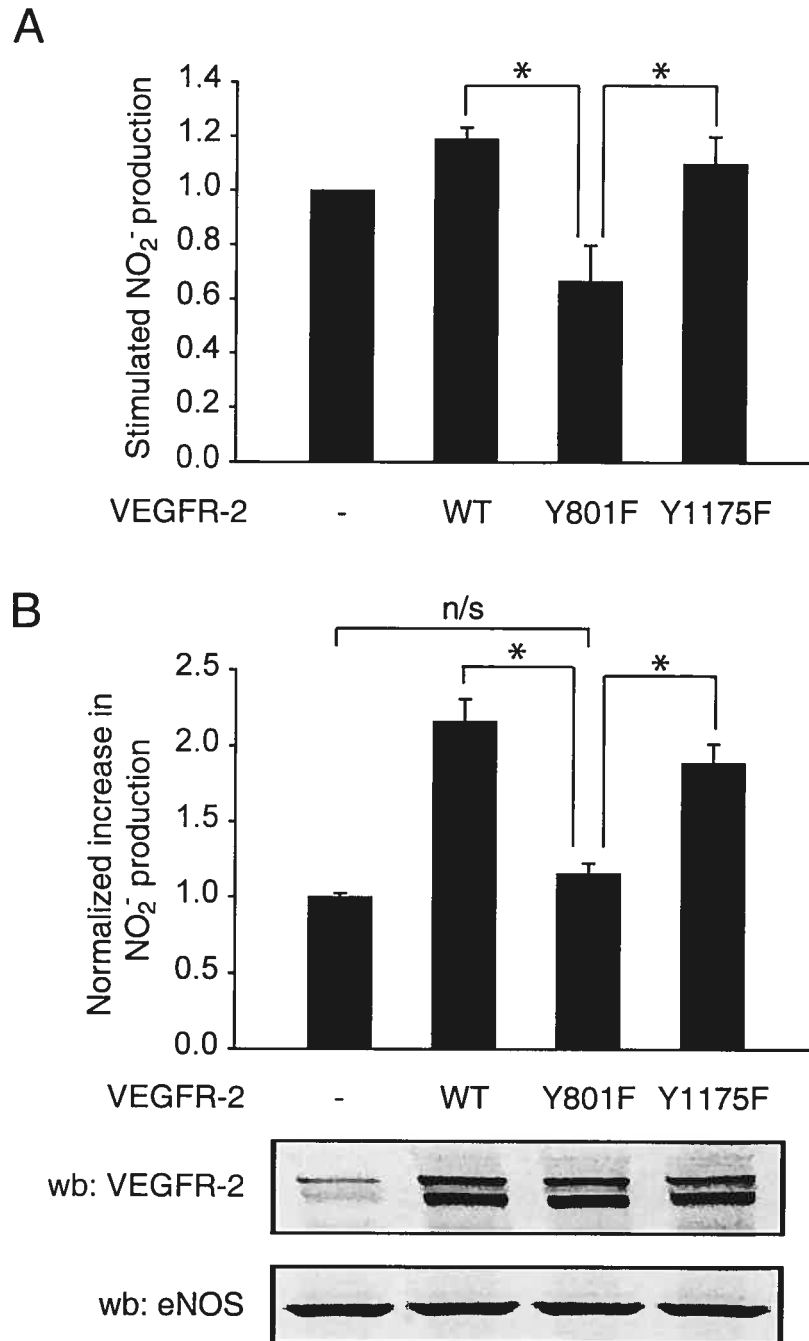


Figure 2.3: Implication of tyrosine 801 of the VEGFR-2 in VEGF-stimulated NO production from endothelial cells.

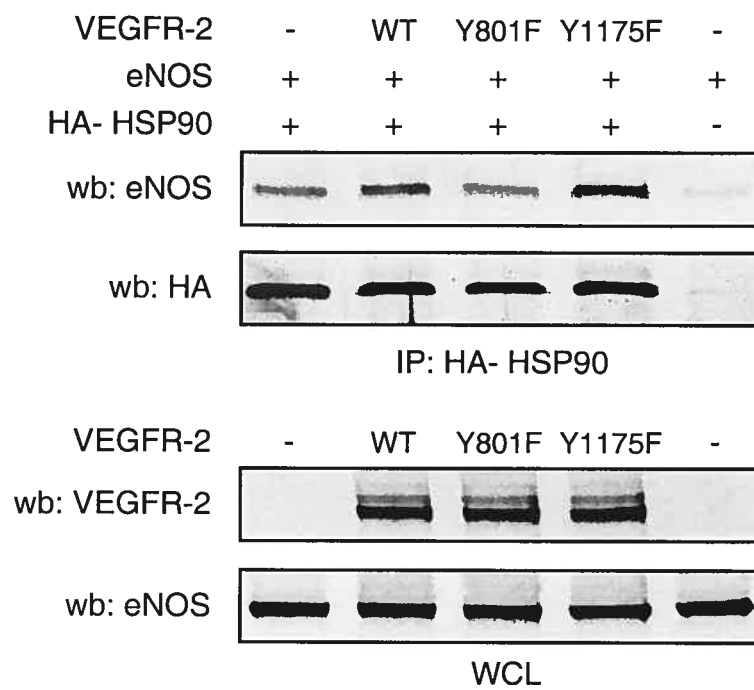


Figure 2.4: The Y801F-VEGFR-2 mutant does not increase the association between eNOS and Hsp90.

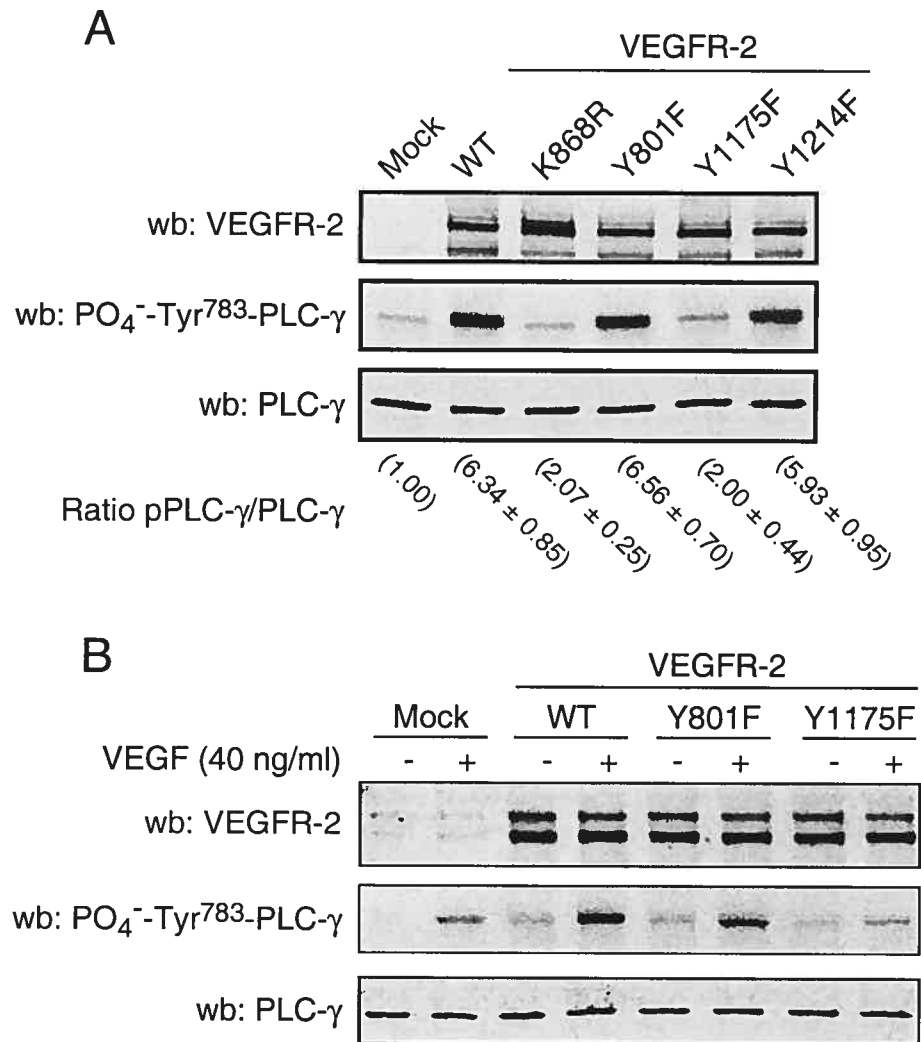


Figure 2.5: Activation of PLC-γ requires tyrosine 1175 of the VEGFR-2 but not tyrosine 801.

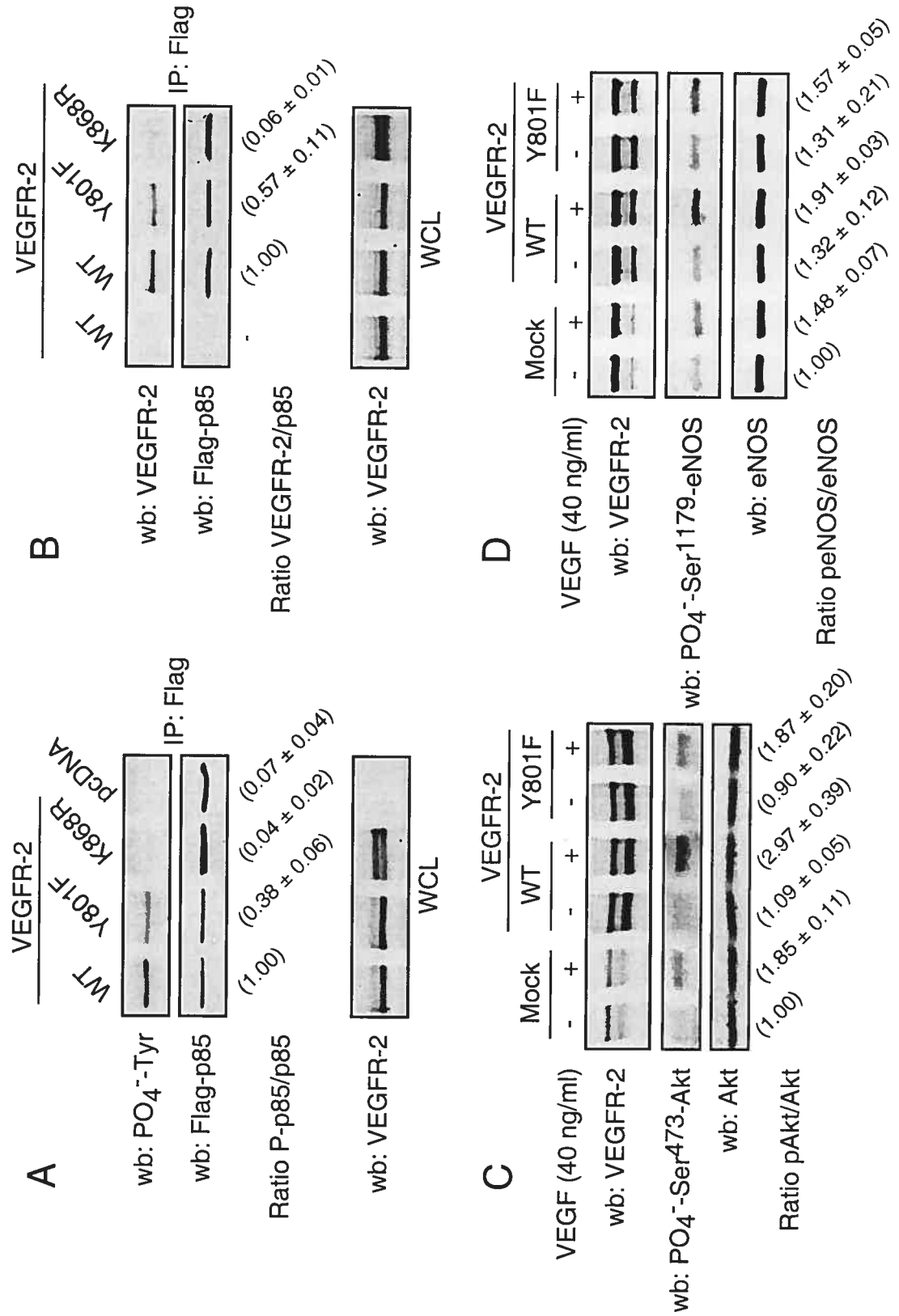


Figure 2.6: Tyrosine 801 of the VEGFR-2 is essential for PI3K, Akt and eNOS phosphorylation.

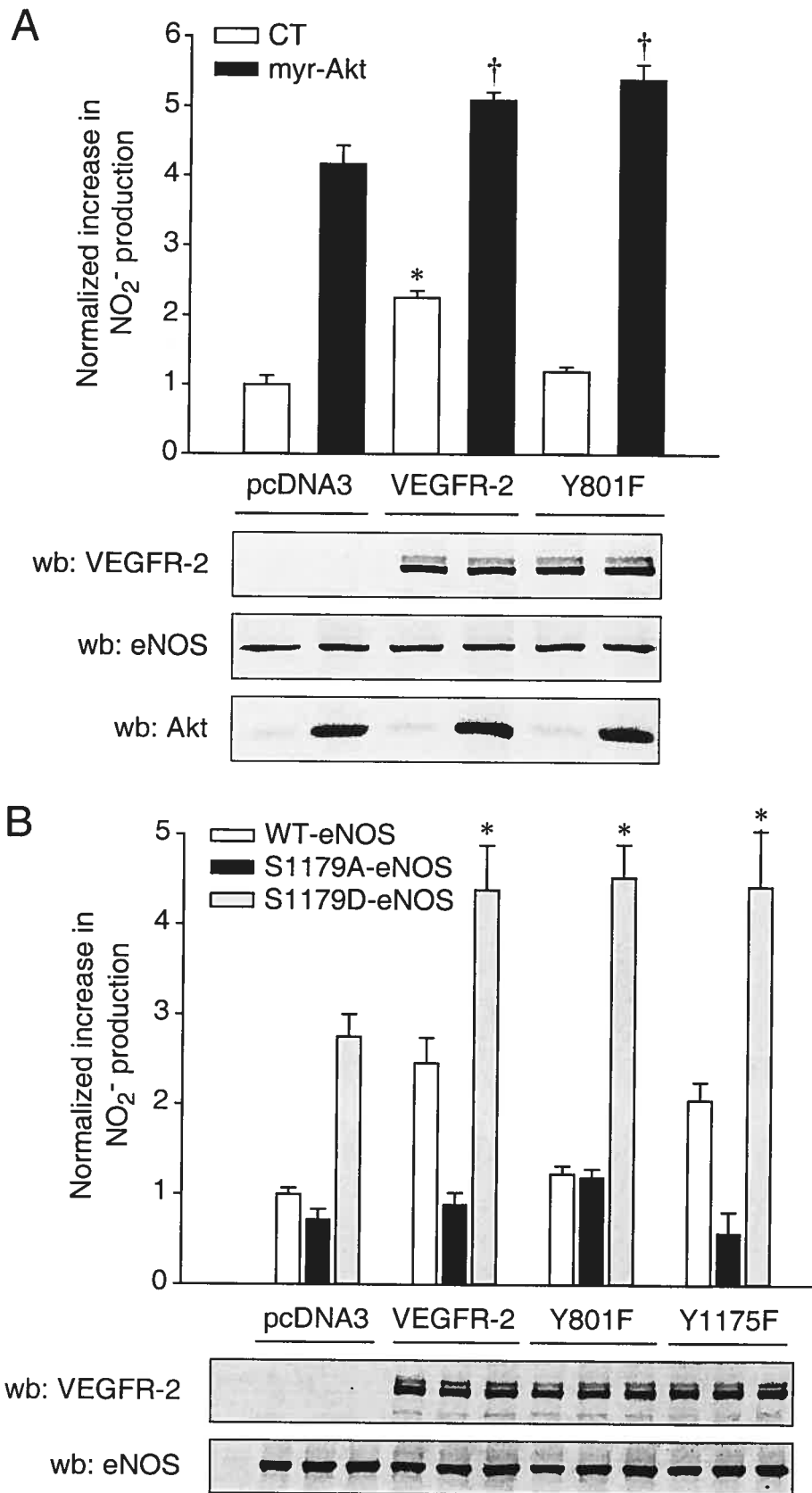


Figure 2.7: Constitutive phosphorylation of eNOS by Akt restores NO release stimulated by Y801F-VEGFR-2.

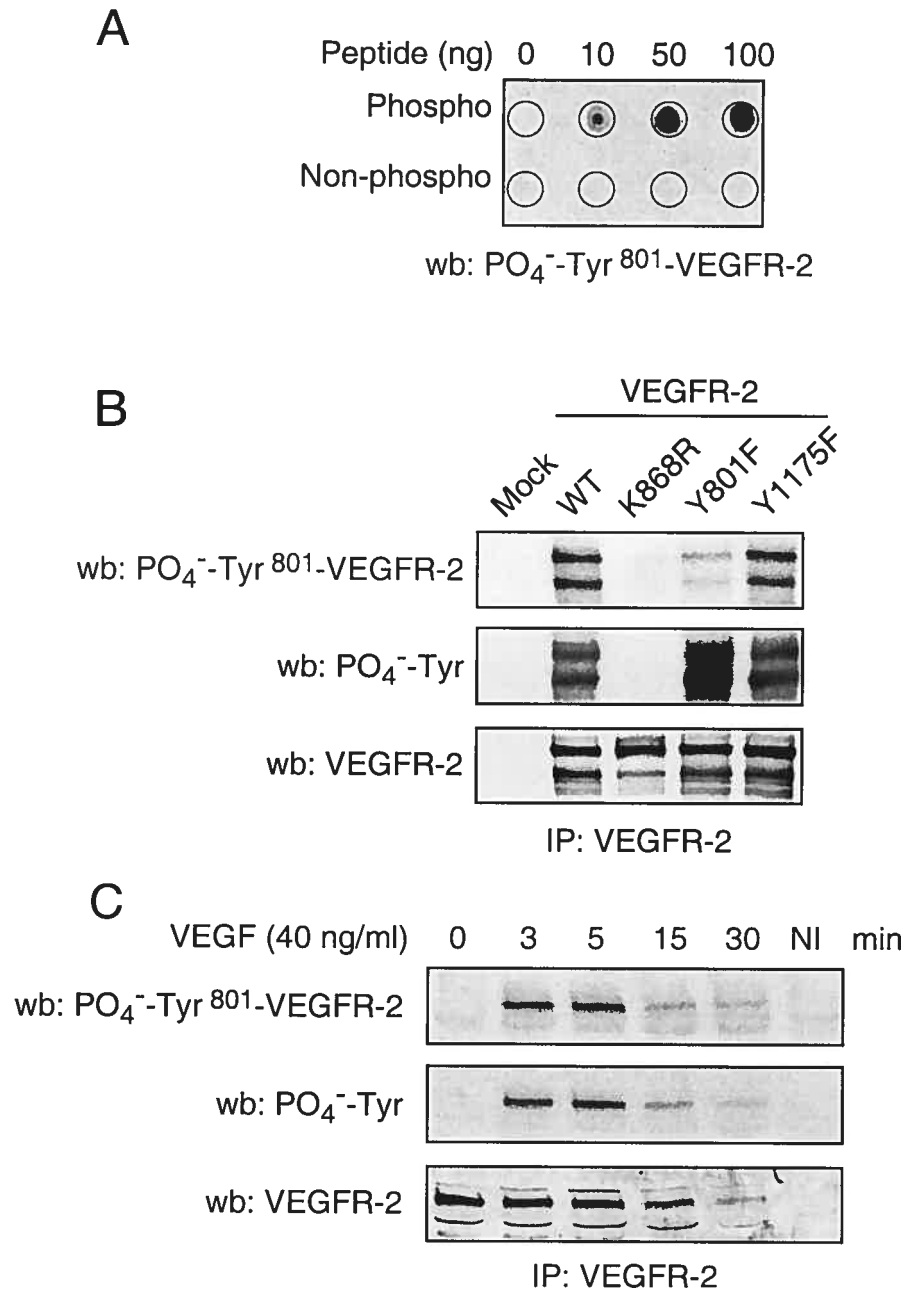


Figure 2.8: Tyrosine residue 801 of the VEGFR-2 is phosphorylated following VEGF stimulation.

3. Discussion, conclusions et perspectives

3.1 Discussion

La synthèse endothéliale du monoxyde d'azote est l'enzyme responsable de la production de NO par les cellules endothéliales. Celle-ci est régulée, entre autres, via son interaction à la calmoduline, une association modulée par l'augmentation du calcium intracellulaire. Aussi, la phosphorylation du résidu sérine 1177 d'eNOS par la sérine/thréonine kinase Akt contribue à augmenter l'activité catalytique de l'enzyme. Fait intéressant, le récepteur responsable de l'augmentation de la production de NO dans les cellules endothéliales, le VEGFR-2, active les enzymes PLC- γ et PI3K, des protéines connues pour leur implication dans l'augmentation du calcium intracellulaire et l'activation d'Akt. Le VEGFR-2 étant un récepteur à activité tyrosine kinase, la phosphorylation de certains de ses résidus tyrosine cytosoliques sert de point d'ancrage au recrutement et à l'activation de protéines responsables de la transmission de signaux intracellulaires. Certains de ces résidus, ainsi que les protéines qui y sont recrutées, ont été identifiés ces dernières années. Par contre, les résidus tyrosines du VEGFR-2 dont la phosphorylation est essentielle à l'activation d'eNOS, ainsi que les voies de signalisation comprises entre ces résidus et l'enzyme, restent encore à être définis.

Afin d'identifier ce ou ces résidus tyrosines, nous avons généré des versions mutantes du VEGFR-2 où les résidus tyrosines 801, 1175 et 1214 ont été changés en résidus phénylalanine. Ces récepteurs mutants, ainsi que le VEGFR-2 sauvage, ont été cotransfectés avec l'enzyme eNOS dans des cellules COS-7 puis la production de NO a été mesurée. Nos résultats démontrent clairement que le résidu tyrosine en position 801 du VEGFR-2 est nécessaire afin d'induire la production de NO dépendante d'eNOS (Fig. 2.2). Ces résultats ont été confirmés à l'aide de cellules BAEC surexprimant les récepteurs VEGFR-2 sauvage, mutant Y1175F-VEGFR-2 ou mutant

Y801F-VEGFR-2 (Fig. 2.3). Il est intéressant de noter que le mutant Y801F-VEGFR-2 semble agir comme dominant négatif sur le récepteur VEGFR-2 endogène dans la régulation de la synthèse de NO stimulée par le VEGF (Fig. 2.3B). De plus, tel que mentionné en introduction, l'association de la chaperonne Hsp90 à eNOS est une caractéristique de l'état actif de la synthase. Fait intéressant, le mutant Y801F du VEGFR-2, contrairement aux récepteurs sauvage et mutant Y1175F-VEGFR-2, n'induit pas cette association d'Hsp90 à eNOS (Fig. 2.4). Cette observation confirme donc l'incapacité de ce mutant du VEGFR-2 à activer l'enzyme. Par la suite, nous avons tenté de déterminer quelle voie de signalisation intracellulaire, activée par le VEGFR-2, était nécessaire pour l'activation d'eNOS. Ainsi, l'étude du niveau de phosphorylation de l'enzyme PLC- γ , dans des cellules COS-7 et endothéliales transfectées, montre que le Y801F-VEGFR-2, mais pas le mutant Y1175F-VEGFR-2, possède toujours la capacité d'activer l'enzyme (Fig. 2.5). Ceci suggère donc que l'incapacité du mutant Y801F-VEGFR-2 à stimuler la production de NO n'est pas une conséquence d'une activation déficiente de la signalisation dépendante de la PLC- γ . Toutefois, le mutant Y801F-VEGFR-2 n'est plus en mesure de pleinement recruter et phosphoryler la sous-unité régulatrice de la PI3K, la p85, dans des cellules COS-7 (Fig. 2.6A et B). Dans le même ordre d'idées, la mutation de la tyrosine 801 du VEGFR-2 inhibe l'augmentation de la phosphorylation d'Akt et d'eNOS induite par la surexpression du récepteur de type sauvage dans les cellules endothéliales BAEC (Fig. 2.6C et D). Ces résultats suggèrent donc que la phosphorylation de la tyrosine 801 du VEGFR-2 joue un rôle important dans l'activation d'eNOS stimulée par le VEGF et ceci via l'induction de la voie de signalisation PI3K/Akt par ce récepteur. Afin de confirmer ces résultats, nous avons vérifié si l'activation artificielle d'Akt ou d'eNOS avait le pouvoir de secourir l'effet induit par la mutation de la tyrosine 801 du VEGFR-2 sur la production de NO dépendante du VEGF. Fait intéressant, l'expression d'une forme

constitutivement active d'Akt (myr-Akt) ou d'un mutant d'eNOS mimant la forme phosphorylée de l'enzyme par Akt (S1179D-eNOS) permettent de rétablir la stimulation de la production de NO par le mutant Y801F-VEGFR-2 à un niveau similaire à celui induit par le récepteur de type sauvage (Fig. 2.7). Finalement, afin de démontrer que le résidu tyrosine 801 du VEGFR-2 est phosphorylé suite à une stimulation par le VEGF, nous avons généré un anticorps reconnaissant spécifiquement la forme phosphorylée du VEGFR-2 à ce résidu. Ceci nous a permis d'identifier le résidu 801 comme étant un site important d'autophosphorylation du récepteur suite à une stimulation par le VEGF (Fig. 2.8). L'ensemble de ces résultats nous permettent donc de proposer que suite à une stimulation du VEGFR-2 par le VEGF, la tyrosine 801 du récepteur est phosphorylée. Ceci permet d'activer la voie de signalisation PI3K/Akt laquelle induira l'activation d'eNOS et ultimement la production de NO.

3.1.1 Choix des mutants du VEGFR-2 pour la réalisation de l'étude

Le VEGFR-2 contient 19 résidus tyrosines potentiellement phosphorylables (Matsumoto *et al.*, 2005). L'une des principales étapes de cette étude était donc de sélectionner, parmi ceux-ci, les résidus tyrosines du VEGFR-2 qui, basé sur les informations présentes dans la littérature, avaient le potentiel d'être impliqués dans la régulation d'eNOS par le VEGF. Ainsi, ayant été identifiés plusieurs fois comme étant des sites importants d'autophosphorylation du récepteur, les tyrosines 801, 1175 et 1214 ont retenu notre attention (Cunningham *et al.*, 1997; Dayanir *et al.*, 2001; Takahashi *et al.*, 2001; Matsumoto *et al.*, 2005). De plus, la phosphorylation des résidus Y801 et Y1175 a été proposée dans la littérature comme étant essentielle à l'activation des enzymes PLC- γ et PI3K, rendant ainsi leur choix encore plus opportun (Cunningham *et al.*, 1997; Knight *et al.*, 2000; Dayanir *et al.*, 2001; Takahashi *et al.*, 2001). En effet, la tyrosine Y1175 est entourée d'une séquence consensus pour la liaison de la PLC- γ (YIVL) puis sa phosphorylation a été démontrée comme étant essentielle

au recrutement et à l'activation de l'enzyme par le VEGFR-2 (voir section 1.8.5). Aussi, d'autres études ont associé la phosphorylation de ce résidu à l'activation voie de la PI3K (Dayanir *et al.*, 2001) ainsi qu'au recrutement de la protéine adaptatrice Shb, un adaptateur connu pour son interaction avec les enzymes PLC- γ et/ou PI3K (Lindholm *et al.*, 1999; Holmqvist *et al.*, 2004). De son côté, la tyrosine 801 se trouve aussi dans une séquence de liaison pour la PLC- γ (YLSI). De plus, sa mutation inhibe le recrutement et activation de la PI3K par le VEGFR-2 (voir section 1.8.1). Toutefois, alors que l'autophosphorylation des tyrosines Y1175 et Y1214 en réponse à une stimulation au VEGF a été observée par des méthodes directes (cartographie triptyque/ anticorps phosphospécifiques) et indirectes (identification d'une réponse cellulaire dépendante de leur phosphorylation), l'implication de la tyrosine 801 dans ce processus ne fut pas aussi simple. Ainsi, même si sa phosphorylation a été proposée comme étant importante pour l'activation des voies PLC- γ et PI3K par le VEGFR-2, les deux analyses de cartographie triptyque effectuées sur le VEGFR-2 n'ont pu identifier de phosphorylation au niveau de la Y801 suite à une stimulation du récepteur par le VEGF (Takahashi *et al.*, 2001; Matsumoto *et al.*, 2005). Ceci est probablement dû à l'emplacement juxtamembranaire de la Y801, rendant ainsi la cartographie triptyque difficile. Nous avons donc généré un anticorps reconnaissant uniquement la forme phosphorylée du VEGFR-2 à la tyrosine 801. Ceci nous a permis de confirmer que ce résidu est bel et bien un site important d'autophosphorylation du VEGFR-2 suite à une stimulation au VEGF et qu'il peut, par conséquent, participer à la signalisation intracellulaire induite par ce récepteur (Fig. 2.8C). Une autre considération importante lors du choix des résidus à muter était que la phosphorylation de ceux-ci ne soit pas impliquée dans l'induction de l'activité catalytique maximale du récepteur. En effet, prenons l'exemple des tyrosines 1054/1059 du VEGFR-2 dont le double mutant (Y1054F/Y1059F-VEGFR-2) présente un niveau d'autophosphorylation total nettement inférieur à celui du récepteur VEGFR-2 sauvage (Dougher *et al.*,

1999;Kendall *et al.*, 1999). Ainsi, l'effet de la mutation VEGFR-2-Y1054F/Y1059F n'étant pas restreinte à la phosphorylation de ces deux résidus mais influençant aussi l'autophosphorylation des autres tyrosines du récepteur, il a été observé que toutes les voies de signalisation normalement activées par le VEGFR-2 ne le sont pas par ce double mutant. Une telle conséquence sur l'activité catalytique totale du récepteur n'a jamais été observée dans les études utilisant les mutants Y801F et Y1175F. De plus, l'immunobuvardage des récepteurs mutants Y801F-VEGFR-2, Y1175F- et Y1214F- avec un anticorps anti-phosphotyrosine à la figure 2.1B de notre étude, nous a permis de confirmer que ces mutations n'influençaient en rien l'activité catalytique globale du récepteur. Par conséquent, ces informations soulignent encore une fois l'implication potentielle de ces résidus dans la régulation d'eNOS par le VEGFR-2.

3.1.2 La phosphorylation de la tyrosine 801 dans l'activation d'eNOS et la production de NO induites par le VEGF

Il est amplement connu que le VEGF induit l'activation d'eNOS et la synthèse de NO dans les cellules endothéliales (Papapetropoulos *et al.*, 1997;Ahmed *et al.*, 1997;Fulton *et al.*, 1999). Aussi, il a été démontré que l'autophosphorylation du VEGFR-2 cause une augmentation de la production de cGMP (Kroll and Waltenberger, 1999). Au cours de cette étude, nous identifions, pour la première fois, un résidu tyrosine du VEGFR-2 dont la phosphorylation est indispensable à la synthèse de NO stimulée par le VEGF. Ainsi, que se soit dans des cellules COS-7 (Fig. 2.2) ou dans un modèle endothélial (Fig. 2.3A et B), le mutant Y801F du VEGFR-2 est incapable d'induire la synthèse de NO caractéristique au récepteur de type sauvage. De même, le mutant Y801F-VEGFR-2 ne peut stimuler la phosphorylation d'eNOS sur son résidu S1177 (Fig. 2.6D), principal site de régulation positive de l'enzyme par la phosphorylation, ni induire l'association de la synthase à l'un de ses principaux régulateurs positifs, la protéine Hsp90 (Fig. 2.4). Ainsi, la mutation

rendant le VEGFR-2 non-phosphorylable à son résidu Y801 inhibe complètement l'activation d'eNOS et la stimulation de la synthèse de NO induites par le VEGF. Fait intéressant, ces observations au sujet de la tyrosine 801 du VEGFR-2 sont en ligne avec ceux présentés par Amhad *et al.* au cours d'une étude publiée récemment et qui porte essentiellement sur les mécanismes de régulation d'eNOS par le VEGFR-1 (Ahmad *et al.*, 2006). En effet, au cours de cette étude, les auteurs identifient la phosphorylation de la tyrosine 794 du VEGFR-1 comme étant essentielle à l'induction de la production de NO et l'activation d'eNOS par ce récepteur. Toutefois, il est maintenant grandement accepté que la Y794 du VEGFR-1 correspond à la Y801 du VEGFR-2, l'alignement des séquences de ces deux récepteurs montrant une forte homologie entre ces deux résidus (Cunningham *et al.*, 1997). Nous pouvons donc suggérer que, même si les récepteurs VEGFR-1 et -2 ont des rôles physiologiques différents, les résidus Y794 et Y801 partagent certaines propriétés fonctionnelles. Dans le même ordre d'idées, les résultats présentés par Ahmad *et al.* ressemblent grandement aux nôtres. Ainsi, la mutation Y794F, comme celle Y801F, résulte en une abolition complète de l'induction de la synthèse de NO et de la phosphorylation d'eNOS sur son résidu S1177 normalement observées avec le récepteur sauvage (VEGFR-1 dans ce cas-ci).

Tel que commenté plus tôt, huit résidus tyrosines du VEGFR-2 ont été identifiés, à ce jour, comme étant des sites d'autophosphorylation du récepteur suite à une stimulation au VEGF (section 1.8). Par conséquent, l'induction de certaines voies de signalisation/réponses cellulaires par le VEGFR-2 ne se limite pas toujours à la phosphorylation d'un seul de ses résidus tyrosines. Ainsi, même si la tyrosine Y1175 du VEGFR-2 est amplement connue comme étant le principal site d'activation de la PLC- γ , le résidu Y951 semble aussi participer dans ce processus (section 1.8). De même, les résidus Y801 et Y1175 ont tous deux été proposés comme étant essentiels à la synthèse d'ADN induite par le VEGF (Dayanir *et al.*, 2001). Dans le même ordre d'idées, nos observation

n'excluent pas l'existence de résidus tyrosines dont la phosphorylation aurait un effet mineur sur la production de NO stimulée par le VEGF; que ce soit en tant que site de recrutement alternatif pour une voie de signalisation jouant un rôle majeur dans la régulation d'eNOS par le VEGFR-2 ou en activant une voie de signalisation ayant un effet secondaire dans ce processus. Ainsi, on peut observer une diminution légère, mais non significative, dans la production de NO induite par les mutants Y1175F-VEGFR-2 et Y1214F- versus celle induite par le VEGFR-2 sauvage (Fig. 2.2). Ceci indique que ces résidus participent, quoique légèrement, dans l'induction de la synthèse de NO par le VEGFR-2. De plus, nos résultats indiquent que la voie de signalisation PI3K/Akt est la principale voie impliquée dans la stimulation de la synthèse de NO par le VEGFR-2. Toutefois, nous démontrons que le récepteur sauvage stimule toujours la synthèse de NO même lorsque cotransfecté avec des formes constitutivement actives d'Akt et d'eNOS (Fig. 2.7). La voie PI3K/Akt/eNOS^{S1179} étant activée de façon maximale dans les cellules exprimant myr-Akt ou S1179D-eNOS, l'augmentation de la production de NO induite par l'ajout de récepteur VEGFR-2 sauvage suggère la présence de voies de signalisation supplémentaires, activées par le VEGFR-2, et impliquées dans la stimulation de la synthèse de NO par ce récepteur. De plus, l'étude menée par Amhad *et al.* suggère, elle aussi, que d'autres voies de signalisation participent à l'activation d'eNOS par le VEGF. En effet, ceux-ci montrent que la mutation de la tyrosine 951 du VEGFR-2, résidu proposé comme étant impliqué dans l'activation de la PLC- γ , cause une diminution partielle de la synthèse de NO (Ahmad *et al.*, 2006). Toutefois, il est intéressant de noter que nos résultats montrent que la mutation Y801F inhibe complètement la production de NO stimulée par le VEGFR-2. Ceci suggère que la phosphorylation de la Y801 du VEGFR-2 joue un rôle principal dans la régulation de l'activité catalytique d'eNOS par le VEGF alors que l'implication potentielle de sites tels que les Y1175, Y1214 ou Y951 ne serait que secondaire.

3.1.3 Rôle de l'enzyme PLC- γ , ainsi que de l'augmentation du calcium intracellulaire induite par celle-ci, dans la stimulation de la synthèse de NO par le VEGFR-2

Tel que présenté à la section 1.5.3, la régulation de l'activité catalytique de l'enzyme eNOS est très diversifiée et comprend plusieurs étapes. Par contre, deux mécanismes jouent un rôle clé dans ce processus; l'interaction protéine-protéine entre eNOS et la calmoduline, favorisée par l'augmentation du calcium intracellulaire, et la phosphorylation de l'enzyme sur sa sérine 1177 par la sérine/thréonine kinase Akt. Toutefois, les mécanismes régulant la synthèse de NO par eNOS en réponse à la multitude de stimuli auxquels l'enzyme fait face présentent une grande variabilité. Dans cet ordre d'idées, certains stimuli ont une préférence pour l'une ou l'autre des deux voies de signalisation mentionnées plus haut. Ainsi, plusieurs agonistes dont l'acétylcholine, la bradykinine, la sérotonine, l'adénosine, l'ADP/ATP, l'histamine et la thrombine augmentent l'activité enzymatique d'eNOS principalement via l'augmentation du calcium intracellulaire. De fait, la chélation du calcium extracellulaire ou l'addition d'antagonistes de la CaM abolissent la production de NO endothéliale induite par l'acétylcholine ou la bradykinine (Luckhoff *et al.*, 1988; Busse *et al.*, 1990). Au contraire, les forces de cisaillement de l'afflux sanguin, principal agoniste physiologique de la synthèse de NO, régule l'activité d'eNOS par un mécanisme qui semble être indépendant des fluctuations de calcium. En effet, les forces de cisaillement de l'afflux sanguin causent bel et bien une augmentation rapide du calcium intracellulaire. Toutefois, celle-ci n'est en ligne qu'avec un premier pic de synthèse de NO et pas avec la deuxième phase, plus soutenue, de la production de NO induite par ce stimulus (Kuchan and Frangos, 1994; Fleming *et al.*, 1998). En ce qui a trait au VEGF, il a été proposé que l'induction de la synthèse de NO par cette cytokine ce fait, elle aussi, en deux étapes; une production immédiate, dépendante de l'augmentation du calcium intracellulaire, et une production

différée, basée sur la phosphorylation de la S1177 d'eNOS (Brouet *et al.*, 2001; Gelinass *et al.*, 2002). Fait intéressant, au cours de cette étude nous avons démontré que la phosphorylation de la tyrosine 1175 du VEGFR-2 n'est pas requise à la stimulation de la synthèse de NO endothéliale par le VEGF (Fig. 2.2 et 2.3). Toutefois, nos résultats et ceux préalablement présentés dans la littérature indiquent que l'activation de l'enzyme PLC- γ , et par conséquent l'augmentation du calcium intracellulaire, nécessite la phosphorylation de ce résidu (Fig. 2.5). Dans le même ordre d'idées, la mutation Y801F abolit la stimulation de la synthèse de NO par le VEGF tout en maintenant l'activation de l'enzyme PLC- γ . Nos résultats tendent donc à indiquer que l'augmentation du calcium intracellulaire ne joue pas un rôle prédominant dans l'induction de la production de NO par le VEGF. Par contre, nous n'excluons pas une certaine participation du calcium dans ce processus. En effet, il a clairement été démontré que la chélation complète du calcium extracellulaire inhibe l'augmentation de la synthèse de NO induite par le VEGF (Van Der Zee *et al.*, 1997). Aussi, l'utilisation d'un chélateur du calcium intracellulaire tel que le BAPTA inhibe l'augmentation immédiate de la production de NO induite par le VEGF (Gelinass *et al.*, 2002). De plus, nos résultats montrent que la perte de l'activation de la PLC- γ , induite par la mutation Y1175F, corrèle avec une légère mais non significative diminution dans la production de NO (Fig. 2.2, 2.3, 2.5). Toutefois, nos résultats concordent aussi avec ceux préalablement présentés dans la littérature comme quoi la mutation phospho-mimétique d'eNOS pour son résidu S1177 (S1177D-eNOS) altère la sensibilité de l'enzyme au Ca^{2+} , rendant son activité maximale même à des concentrations basales de calcium (Dimmeler *et al.*, 1999). En effet, nous avons démontré que la production de NO est maintenue dans les cellules où le calcium n'est pas augmenté mais où la sérine 1179 d'eNOS est phosphorylée de façon constitutive. Ainsi, les cellules exprimant la combinaison Y1175F-VEGFR-2/ S1179D-eNOS montrent une production de NO similaire à celle des cellules exprimant la combinaison

VEGFR-2 sauvage/ S1179D-eNOS (Fig. 2.7B). Donc, le récepteur mutant Y1175F-VEGFR-2, en maintenant la phosphorylation d'eNOS à la S1177, serait toujours capable d'induire la stimulation de la production de NO dans des cellules où le niveau basal de Ca^{2+} intracellulaire ne serait pas augmenté. Par conséquent, en ligne avec une activation en deux étapes d'eNOS par le VEGF (immédiate et différée), la perte de l'augmentation rapide du calcium intracellulaire causée par la mutation Y1175F résulterait en la perte du pic initial de production de NO (représentée par la légère diminution dans la synthèse de NO induite par ce mutant observée aux figures 2.2 et 2.3) mais maintiendrait la production différée. Au contraire, le mutant Y801F-VEGFR-2 présenterait toujours le pic initial de production de NO, coïncidant avec l'élévation du calcium intracellulaire, mais pas la production différée, donnant ainsi lieu à une perte drastique de la quantité de NO produit.

Fait intéressant, nos résultats montrent une certaine similitude avec le mécanisme proposé de régulation d'eNOS par les forces de cisaillement de l'afflux sanguin. En effet, nous avons vu plus haut que ce stimulus induit une production de NO maintenue mais seulement une augmentation transitoire du calcium intracellulaire (Ayajiki *et al.*, 1996; Corson *et al.*, 1996). Au contraire, la phosphorylation de la sérine 1177 d'eNOS en réponse aux forces de cisaillement de l'afflux sanguin joue un rôle critique dans l'induction de la production de NO par ce dernier; l'utilisation d'inhibiteurs bloquant cette phosphorylation inhibent aussi la production de NO en réponse à ce stimulus (Dimmeler *et al.*, 1999; Boo *et al.*, 2002). Ainsi, seule différence entre nos données et le mécanisme proposé pour les forces de cisaillement ne semble être en fait que la kinase responsable de la phosphorylation de la S1177 d'eNOS. En effet, tel que mentionnée à la section 1.5.3.4, il a été proposé que la kinase responsable de cette phosphorylation dépend grandement du stimulus appliqué. Ainsi, nous et autres avons suggéré Akt dans le cas du VEGF tandis que la PKA semble tenir ce rôle lors d'une stimulation par les

forces de cisaillement (Boo *et al.*, 2002). De plus, nos résultats tracent aussi un certain parallèle entre la régulation d'eNOS et celle d'iNOS, enzyme pour laquelle l'augmentation du calcium intracellulaire n'est pas nécessaire à l'induction de la production de NO mais dont des concentrations basales de Ca^{2+} sont toutefois essentielles à son activité enzymatique (Forstermann *et al.*, 1991)

Par conséquent, même si eNOS est identifiée comme une enzyme dépendante du calcium et que le VEGF est connu pour induire l'augmentation intracellulaire de cet ion, ce processus ne semble pas être la principale voie de signalisation empruntée par le VEGFR-2 lors de la régulation de l'activité catalytique de l'enzyme.

3.1.4 Rôle de la voie de signalisation PI3K/Akt dans l'activation d'eNOS et l'induction de la synthèse de NO par le VEGF

Il a été rapporté que l'utilisation du wortmannin et du LY294002, deux inhibiteurs de la PI3K, atténuent la synthèse de NO induite par le VEGF (Papapetropoulos *et al.*, 1997; Michell *et al.*, 1999; Gelinas *et al.*, 2002). De même, la perte d'Akt1 réduit grandement l'accumulation de NO, induite par le VEGF, dans des cellules endothéliales de poumon de souris (Ackah *et al.*, 2005). Aussi, il a été démontré que la mutation rendant eNOS non-phosphorylable sur son résidu S1179 (S1179A-eNOS) (séquence bovine d'eNOS, correspondant au résidu S1177 de la forme humaine) abolit complètement la stimulation de la production de NO par le VEGFR-2 (Fulton *et al.*, 1999; Dimmeler *et al.*, 1999). Nos résultats semblent indiquer que la mutation Y801F affecte la voie de signalisation PI3K/Akt et la synthèse de NO, toutes deux induites par le VEGF. Afin de tracer un lien entre ces deux phénomènes, nous avons tenté de restaurer l'incapacité du Y801F-VEGFR-2 à induire la production de NO en utilisant des formes constitutivement actives d'Akt ou d'eNOS. Ainsi, nous avons démontré que l'activation artificielle d'Akt (myr-Akt), en aval du VEGFR-2,

est suffisante afin de compenser pour le déficit de production de NO, dépendante du VEGF, encouru par la mutation de la Y801 de ce récepteur (Fig. 2.7A). De plus, la forme constitutivement active d'eNOS pour la voie PI3K/Akt (S1179D-eNOS) permet, encore une fois, de rétablir la production de NO du mutant Y801F-VEGFR-2 à un niveau similaire à celui induit par le récepteur VEGFR-2 sauvage (Fig. 2.7B). En accord avec la littérature, nous avons aussi observé que la production de NO est fortement réduite dans les cellules où le VEGFR-2 sauvage est exprimé en présence de la forme non-phosphorylable d'eNOS, S1179A. Il est intéressant de noter que la production de NO par ces dernières est similaire à celle observée chez les cellules exprimant le Y801F-VEGFR-2 en présence d'eNOS de type sauvage. Ces résultats nous permettent donc de confirmer que la voie de signalisation PI3K/Akt est essentielle à l'activation d'eNOS par le VEGFR-2.

Les résidus tyrosines phosphorylables des récepteurs RTK ne sont pas toujours exclusifs dans leurs spécificités de recrutement (voir plus bas, section 3.1.5), certains sites pouvant recruter et activer plus qu'une protéine/voie de signalisation. Ceci pourrait aussi être le cas de la tyrosine 801 du VEGFR-2. Toutefois, tel que démontré par le rétablissement complet de la production de NO lorsque le mutant Y801F-VEGFR-2 est cotransfecté avec myr-Akt ou S1179D-eNOS (Fig. 2.7), l'existence voies de signalisation secondaires activées par la Y801, en plus de la voie PI3K/Akt, et impliquées dans l'induction de la production de NO par le VEGFR-2 est peu possible. De même, une production de NO identique entre les cellules exprimant le mutant Y801F avec l'enzyme eNOS sauvage ou mutante S1179A indique que, tout de moins en ce qui a trait aux voies de signalisations régulant l'activité d'eNOS, la phosphorylation de ce résidu active principalement, voir seulement, la voie de signalisation de la PI3K/Akt (Fig. 2.7B).

3.1.5 Implication de la tyrosine 801 du VEGFR-2 dans l'activation de la voie de signalisation PI3K/Akt

Même si la séquence d'acides aminés entourant la tyrosine 801 du VEGFR-2 (YLSIVM) ne correspond pas à la séquence consensus de liaison de la sous-unité régulatrice de la PI3K (Y(M/V/I/E)XM), la p85, une étude menée par Dayanir *et al.* propose la phosphorylation de ce site comme étant essentielle à l'activation de cette voie de signalisation par le VEGFR-2 (Dayanir *et al.*, 2001). Certains groupes ont proposé que la PI3K serait couplée au VEGFR-2 au moyen de protéines adaptatrices. Ainsi, une étude récente montre que suite à une stimulation au VEGF, l'adaptateur Gab1 est phosphorylé, rélocalisé à la membrane et associé à la sous-unité p85 (Dance *et al.*, 2006). De plus, un mutant de Gab1, incapable de lier la p85, cause une réduction marquée de la production de PIP₃ et de la phosphorylation d'Akt induites par le VEGF. Toutefois, que l'association de la PI3K aux tyrosines phosphorylées du VEGFR-2 soit directe ou non, nos données confirment les allégations faites par Dayanir *et al.*. En effet, nous avons pu observer que la mutation Y801F cause une réduction marquée de la tyrosine phosphorylation de la p85 ainsi que du recrutement phospho-dépendent de cette protéine au récepteur VEGFR-2 (Fig. 2.6A et B). La phosphorylation de la tyrosine 801 du VEGFR-2 semble donc essentielle au recrutement et à l'activation maximale de la PI3K par le VEGFR-2. Par contre, nous détectons toujours une légère phosphorylation et un recrutement partiel de la p85 au Y801F-VEGFR-2, contrairement aux cellules où la sous-unité régulatrice de la PI3K a été cotransfectée avec le récepteur kinase inactif K868R-VEGFR-2 (Fig. 2.6A et B). Ceci peut paraître surprenant compte tenu que la mutation Y801F inhibe complètement l'augmentation de la production de NO induite par le VEGFR-2 et que la voie de signalisation PI3K/Akt semble jouer un rôle principal dans ce processus. Toutefois, plusieurs explications peuvent facilement réconcilier ces observations. Pour commencer, il est important de noter que même si la mutation Y801F n'induit qu'une

diminution de 43% du recrutement de la p85 au VEGFR-2, elle cause une diminution de 62% de la phosphorylation de l'enzyme suivie d'une abolition complète de la phosphorylation d'Akt et d'eNOS en réponse à une stimulation au VEGF (Fig. 2.6A, B, C et D). Il se pourrait donc qu'une trop grande surexpression de la sous-unité régulatrice de la PI3K couplée à la mutation de son principal site de recrutement sur le VEGFR-2, la Y801, favorisent une association entre l'enzyme et des sites secondaires de recrutement, lesquels sont possiblement moins aptes à activer cette voie. Ainsi, au moins 62% de la PI3K normalement activée par le VEGFR-2 ne le serait pas par le mutant Y801F-VEGFR-2, la phosphorylation de la p85 étant une bonne indication du degré d'activation de la PI3K (Cuevas *et al.*, 1999; Cuevas *et al.*, 2001). En effet, il a été démontré que la mutation rendant la p85 non-phosphorylable à son résidu tyrosine 688 (Y688A) accentue l'effet inhibiteur que la sous-unité régulatrice exerce sur l'activité de la PI3K. Au contraire, la mutation phospho-mimétique de ce résidu (Y688D) bloque complètement l'effet inhibiteur de la p85 sur l'activation de substrats de la PI3K tels que Akt et NF κ B (Cuevas *et al.*, 2001). De plus, la cotransfection de la PI3K avec une forme constitutivement active de la kinase Lck, responsable de la phosphorylation de la tyrosine 688, dans des cellules COS se traduit par une augmentation de l'activité de la PI3K. De son côté, la cotransfection de la PI3K avec la phosphatase SHP-1, connue pour déphosphoryler la Y688, diminue l'activité catalytique de l'enzyme (Cuevas *et al.*, 1999).

Toutefois, la mutation Y801F semble inhiber complètement la phosphorylation d'Akt et de la sérine 1177 d'eNOS ainsi que la production de NO, induites par le VEGF, et ceci même si une certaine fraction de la PI3K est toujours recrutée et phosphorylée par le mutant Y801F-VEGFR-2. Ce phénomène pourrait être expliqué par un effet de seuil où un certain niveau de lipide phosphorylé PIP₃, et donc de PI3K activée, serait nécessaire afin d'activer Akt. Ainsi, des sites secondaires de recrutement amèneraient une certaine

quantité d'enzyme au récepteur mutant Y801F-VEGFR-2. Ces PI3K recrutées seraient activées et produiraient du PIP₃. Toutefois, la quantité de PIP₃ produit sous ces conditions ne serait pas en quantité suffisante pour activer Akt ou induire sa phosphorylation à un niveau assez élevé pour être détecté par immunobuvardage (Fig 2.6C). La serine 1177 d'eNOS ne serait donc pas phosphorylée et il n'y aurait pas d'induction de la production de NO. Au contraire, l'association de la PI3K à son principal site de recrutement sur le VEGFR-2, la Y801, permettrait l'activation de l'enzyme en un nombre suffisant afin de produire la quantité de lipide nécessaire à l'induction de la voie Akt/eNOS/NO.

Enfin, il n'est pas exclu qu'une certaine fraction de la PI3K recrutée et activée par des sites secondaires sur le VEGFR-2 participe, quoique à un niveau très bas ne pouvant être détecté par immunobuvardage (Fig. 2.6C), à l'activation d'Akt. En effet, tel que mentionné plus haut, certaines études ont proposé que des protéines adaptatrices, dont la protéine associée au récepteur au VEGF (VRAP), Shb et l'adaptateur Gab1, participaient au recrutement et à l'activation de la PI3K par le VEGFR-2 (Wu *et al.*, 2000b; Holmqvist *et al.*, 2004; Matsumoto *et al.*, 2005; Dance *et al.*, 2006). De plus, ces études proposent que le VRAP est recruté au VEGFR-2 par la tyrosine 951 et que Shb l'est au résidu Y1175. De son côté, Gab1 nécessite la protéine Grb-2 afin d'interagir avec le VEGFR-2, une protéine pour laquelle une séquence consensus de liaison entoure la Y1214 de ce récepteur (Songyang *et al.*, 1993; Takahashi *et al.*, 2001). Les figures 2.2 et 2.3 nous montrent que les mutations Y1175F et Y1214F causent une diminution légère mais non significative de la production de NO. De même, une étude récente montre que la mutation de la tyrosine 951 du VEGFR-2 résulte en une diminution de plus ou moins 50% de la production de NO induite par le VEGFR-2 (Ahmad *et al.*, 2006). Nous avons proposé plus tôt que la légère diminution de la production de NO observée avec les mutants Y1175F- et Y1214F-VEGFR-2 était

possiblement due à l'activation, par ces résidus, de voies de signalisation intracellulaires ayant un rôle secondaire dans la régulation d'eNOS par le VEGF, dont la voie de la PLC- γ pour la Y1175. Sans toutefois nier le rôle joué par le calcium dans la régulation initiale d'eNOS par le VEGF, il se peut que ces résidus constituent aussi des sites de recrutement et d'activation secondaires pour la PI3K sur le VEGFR-2. Ainsi, la légère diminution de la production de NO observée avec les récepteurs mutants Y951F, Y1175F et Y1214F pourrait être causée non seulement par la perte de l'activation d'une voie de signalisation secondaire telle que la PLC- γ , mais aussi par la perte de certaines PI3K recrutées et activées par ces sites. Ce concept où un résidu couplerait plus qu'une voie de signalisation au récepteur dont il fait parti n'est pas nouveau. En effet, au niveau du FGFR-1, un autre membre de la famille RTK, tant l'adaptateur Shb que la PLC- γ ont le potentiel de lier le résidu tyrosine 766 (Cross *et al.*, 2002). Ceci expliquerait aussi que même si un certain consensus entoure l'activation de la PLC- γ par la Y1175 du VEGFR-2, une étude montre que la phosphorylation de ce résidu est requise pour le recrutement et l'activation de la PI3K (Dayanir *et al.*, 2001). Rappelons toutefois que dans l'éventualité où une fraction de la PI3K, activée par des sites secondaires de recrutement sur le VEGFR-2, participerait dans l'activation d'Akt, sa participation dans ce processus ne serait que minime. En effet, nos résultats démontrent que le recrutement et l'activation maximal de la PI3K sont requis afin d'observer une augmentation de la phosphorylation d'Akt, d'eNOS et induire la production de NO par le VEGF (Fig. 2.2, 2.3, 2.6C et 2.6D).

Fait intéressant, ces observations au sujet du rôle joué par la Y801 dans l'activation de la voie de signalisation PI3K/Akt sont aussi confirmées lors de l'étude récente menée par Ahmad *et al.*. En effet, au cours de cette étude, les auteurs proposent non seulement que l'activation d'eNOS et la stimulation de la synthèse de NO dépendent de la phosphorylation de la tyrosine 794 du VEGFR-1, correspondante à la tyrosine 801 du VEGFR-2, mais que ceci est

médié via l'activation de la voie de signalisation PI3K/Akt (Ahmad *et al.*, 2006). Ainsi, l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques de la PI3K, d'une forme dominante-négative de la p85 ou la mutation Y794F-VEGFR-1 bloquent la phosphorylation d'eNOS sur sa sérine 1177 et diminuent la production de NO stimulée par le VEGFR-1. Toutefois, au cours de cette étude, les auteurs observent que l'utilisation de ces mêmes inhibiteurs sur des cellules HUVEC exprimant un récepteur chimérique EGF/VEGFR-2 n'a aucun effet sur la phosphorylation d'eNOS et la synthèse de NO induite par l'EGF. Ceci est en désaccord avec nos résultats et ceux préalablement présentés dans la littérature comme quoi l'inhibition de la voie de la PI3K/Akt, soit avec des inhibiteurs pharmacologiques ou par la mutation Y801F, affecte la synthèse différée de NO induite par le VEGF (Papapetropoulos *et al.*, 1997; Michell *et al.*, 1999; Gelinas *et al.*, 2002). La tyrosine 801 ayant un emplacement juxtamembranaire, la création d'un récepteur chimérique (EGDR), constitué du domaine extracellulaire du récepteur EGF fusionné aux domaines transmembranaire et intracellulaire du VEGFR-2, aurait pu altérer l'autophosphorylation de ce résidu ou sa capacité à recruter/activer les voies de signalisation normalement activées par ce résidu dans le contexte du récepteur sauvage. Il n'est donc pas exclu que la signalisation via la PI3K soit déficiente chez les cellules exprimant le récepteur EGDR. Par conséquent, l'utilisation d'inhibiteurs pour cette protéine n'aurait aucun effet sur la production de NO de ces cellules. Toutes ces informations rassemblées confirment donc le rôle majeur et essentiel de la tyrosine Y801F du VEGFR-2 dans l'activation de la voie de signalisation PI3K/Akt et relègue les résidus 951, 1175 et 1214 comme étant possiblement des sites secondaires pour l'activation d'eNOS par le VEGFR-2.

3.2 Perspectives futures

Les observations effectuées au cours de la présente étude ouvrent la porte à plusieurs projets intéressants, qu'ils soient à court, moyen ou long terme. Pour commencer, le rôle de la tyrosine 801 du VEGFR-2 dans l'induction de l'angiogenèse *in vitro* pourrait être évalué. Dans l'étude menée par Ahmad *et al.*, les auteurs montrent que les cellules HUVEC exprimant le mutant Y951F-VEGFR-2, mutation donnant lieu à une diminution de près de 50% de la production de NO stimulée par le VEGF, sont toujours en mesure d'induire la formation d'un réseau tubulaire de style capillaire dans un essai Matrigel. Au contraire, les mutants Y1059F-VEGFR-2 et Y794F-VEGFR-1, tous deux inhibant complètement la synthèse de NO, en sont incapables. Ceci amène les auteurs à conclure qu'il existe un niveau basal de NO au dessous duquel l'angiogenèse n'a pas lieu. Il serait donc intéressant de vérifier l'effet du mutant Y801F-VEGFR-2, mutant ayant des effets similaires au VEGFR-1-Y794F quant à l'activation d'eNOS et la synthèse de NO, sur l'induction de l'angiogenèse *in vitro*.

À moyen terme, la vérification de l'importance de la tyrosine 801 du VEGFR-2 dans les effets *in vivo* du VEGF peut aussi être envisagée. En effet, des adénovirus exprimant le récepteur mutant Y801F-VEGFR-2 pourraient être construits puis injectés dans des modèles animaux d'ischémie afin de vérifier l'implication de ce résidu dans l'induction de l'angiogenèse par le VEGFR-2 *in vivo*. Par contre, même si le NO participe à toutes les étapes de la réponse cellulaire au VEGF, il est surtout le principal médiateur des effets perméabilisants de cette cytokine. Ainsi, l'implication de la tyrosine 801 dans l'induction de la perméabilité vasculaire *in vivo* par le VEGFR-2 pourrait aussi être évaluée. De plus, on a vu que le récepteur mutant Y801F-VEGFR-2 agit comme dominant négatif sur la production de NO induite par le VEGFR-2 endogène des cellules BAEC (Fig. 2.3A). Il y a donc de fortes chances que ceci

se produise encore lors de l'expression du mutant *in vivo*. Par conséquent, dans la possibilité où le résidu 801 du VEGFR-2 soit nécessaire à l'induction de la perméabilité vasculaire par ce récepteur et que l'expression du mutant *in vivo* bloque cet effet, les adénovirus Y801F-VEGFR-2 seraient un outil intéressant afin d'étudier la progression tumorale dans un modèle où la perméabilité vasculaire est réduite.

À plus long terme, des souris *Knock-in* (KI) exprimant le mutant Y801F pourraient être générées. Ce genre d'étude a été effectuée pour la tyrosine 1175 du VEGFR-2 et a donné lieu à des observations très intéressantes. En effet, après avoir proposé que la Y1175 était nécessaire à l'activation de l'enzyme PLC- γ et à la synthèse d'ADN dans les cellules endothéliales (Takahashi *et al.*, 2001), l'équipe de Shibuya a créé des souris *Knock-In*, ayant une mutation Y \rightarrow F au résidu tyrosine 1173 (correspondant au 1175 humain) (Sakurai *et al.*, 2005). À partir de celles-ci, ils ont pu déterminer que ce résidu jouait un rôle primordial dans la vasculogénèse des souris. Par conséquent, la génération de souris KI pour la tyrosine 801 du VEGFR-2 nous permettrait de vérifier l'importance de ce résidu dans l'induction de la vasculogénèse/angiogénèse, la perméabilité vasculaire et la production de NO *in vivo* par le VEGF. De plus, au cours de l'étude menée par Sakurai *et al.*, les auteurs ont pu observer qu'à cette étape du développement embryonnaire, soit lors de l'induction de la vasculogénèse, la mutation de la tyrosine 1173 n'avait aucune répercussion sur la phosphorylation de la MAPK, une des effectrices de la PLC- γ . Ainsi, une étude KI pour la Y801 du VEGFR-2 pourrait aussi être utile afin de confirmer le lien Y801 \rightarrow PI3K/Akt \rightarrow eNOS *in vivo*. En effet, les phénotypes des souris déficientes pour les gènes Akt et eNOS sont disponibles. Par conséquent, la comparaison du phénotype des souris VEGFR-2^{Y801F/Y801F} avec celui des souris *knock-out* (KO) pour Akt ou eNOS pourrait nous donner une idée sur l'implication de ce résidu du VEGFR-2 dans la régulation d'eNOS par Akt *in vivo*.

Enfin, il est intéressant de noter qu'au cours de la présente étude nous avons observé que les cellules exprimant le mutant inactif K868R-VEGFR-2 ont légèrement plus de VEGFR-2 que celles exprimant le récepteur sauvage. Aussi, un article récent montre que l'activité tyrosine kinase est requise pour l'ubiquitination et la dégradation du VEGFR-2 dans les cellules endothéliales (Ewan *et al.*, 2006). De plus, on sait que suite à une stimulation par son ligand, le VEGFR-2 est rapidement dégradé par la ligase d'ubiquitine Cbl (Duval *et al.*, 2003). Le récepteur K868R-VEGFR-2 étant catalytiquement inactif, il est probablement incapable de recruter Cbl, affectant ainsi son cycle de régulation négative. Il serait donc intéressant de déterminer le ou les résidus tyrosines du VEGFR-2 dont la phosphorylation est essentielle au recrutement de Cbl et donc à la dégradation du récepteur.

3.3 Conclusions

En résumé, les observations faites au cours de cette étude montrent clairement que le résidu tyrosine 801 du VEGFR-2 joue un rôle majeur dans le recrutement de la PI3K au récepteur, l'activation de la p85, d'Akt, d'eNOS et la production de NO induites par le VEGF. De plus, la phosphorylation du résidu sérine 1177 d'eNOS, phosphorylé par la kinase Akt, est essentielle à la stimulation de la production de NO par le VEGFR-2 via la phosphorylation de son résidu Y801. Finalement, l'activation de l'enzyme PLC- γ , responsable de la mobilisation du calcium intracellulaire, ne semble pas requise pour la production de NO stimulée par le VEGFR-2. Ainsi, nos observations nous permettent de conclure que la phosphorylation de la tyrosine 801 du VEGFR-2 est essentielle à la production de NO stimulée par le VEGF et ce principalement au moyen de l'activation de la voie de signalisation PI3K/Akt (Fig. 3.1).

La présente étude identifie donc les points clés de la régulation de l'activité d'eNOS et de la stimulation de la production de NO par le VEGFR-2. Le NO a une grande implication dans certaines conditions pathologiques telles que les maladies cardiovasculaires et la progression tumorale. Il va donc sans dire que les nouvelles connaissances soulevées au cours de cette étude et entourant les événements moléculaires menant à la production de cette molécule seront plus que bénéfiques afin d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques pouvant traiter ces maladies.

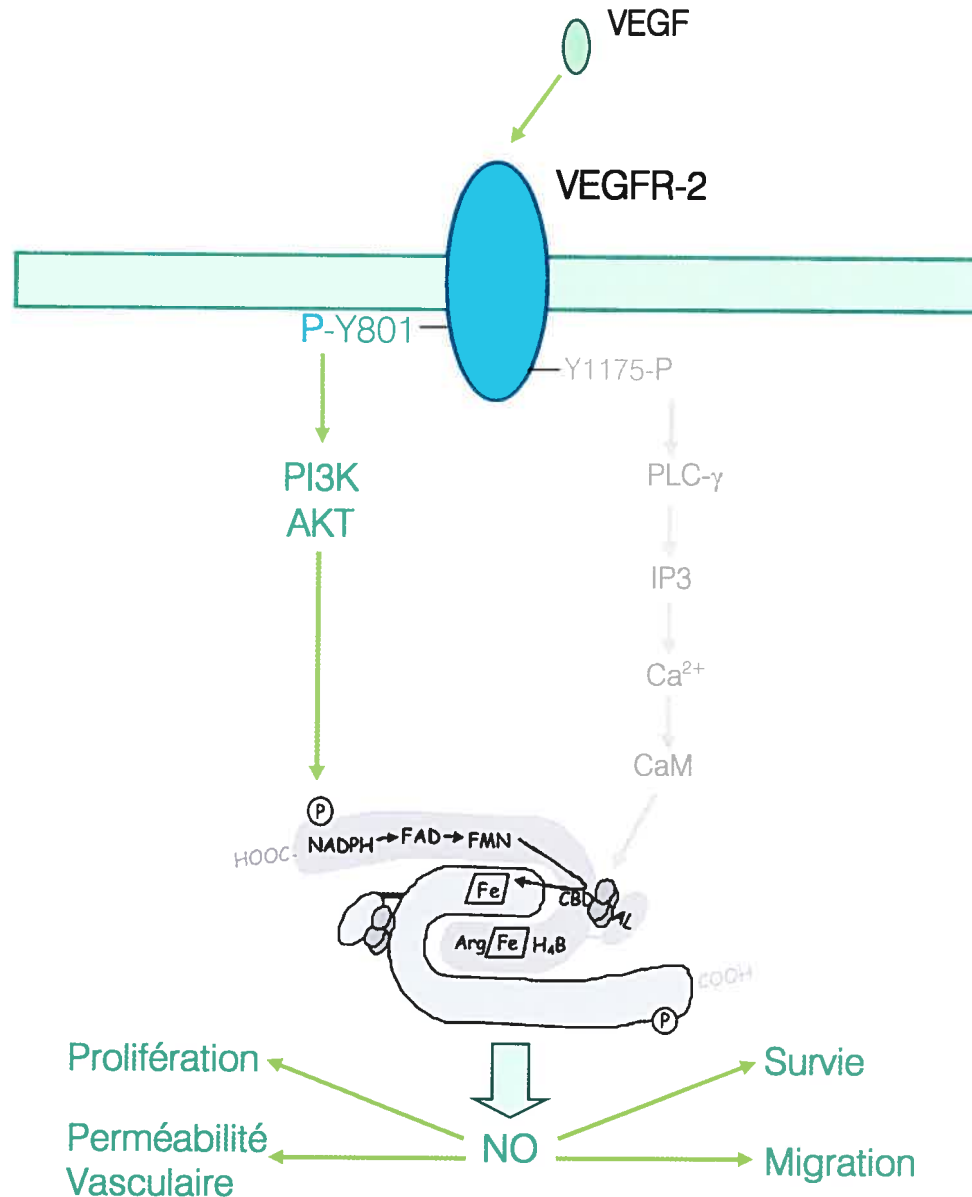


Figure 3.1 : Principal mécanisme de régulation d'eNOS par le VEGFR-2- Suite à sa stimulation par le VEGF, le VEGFR-2 est phosphorylé sur certains de ses résidus tyrosines, dont la Y801 et la Y1175. La phosphorylation de la Y801 du VEGFR-2 médie le recrutement de la PI3K ce qui résulte en l'activation de cette voie de signalisation intracellulaire. Par la suite, Akt, principal médiateur de la PI3K, phosphoryle eNOS sur son résidu sérine 1177. Ceci active l'enzyme et induit la production de NO lequel agira au niveau de la stimulation de la survie, de la migration et de la prolifération des cellules endothéliales ainsi que de la perméabilité vasculaire. De son côté, la phosphorylation de la Y1175 du VEGFR-2 résulte en l'activation de la PLC-γ puis, ultimement, en l'augmentation du calcium intracellulaire. Par contre, cette voie de signalisation ne semble pas avoir un effet majeur sur la stimulation de la production de NO par le VEGF.

4. Bibliographie

1. Abedi H and Zachary I (1995) Signalling mechanisms in the regulation of vascular cell migration. *Cardiovasc Res*, **30**, 544-556.
2. Abedi H and Zachary I (1997) Vascular endothelial growth factor stimulates tyrosine phosphorylation and recruitment to new focal adhesions of focal adhesion kinase and paxillin in endothelial cells. *J Biol Chem*, **272**, 15442-15451.
3. Abu-Soud HM, Gachhui R, Raushel FM, and Stuehr DJ (1997) The ferrous-dioxy complex of neuronal nitric oxide synthase. Divergent effects of L-arginine and tetrahydrobiopterin on its stability
1. *J Biol Chem*, **272**, 17349-17353.
4. Ackah E, Yu J, Zoellner S, Iwakiri Y, Skurk C, Shibata R, Ouchi N, Easton RM, Galasso G, Birnbaum MJ, Walsh K, and Sessa WC (2005) Akt1/protein kinase B α is critical for ischemic and VEGF-mediated angiogenesis
1. *J Clin Invest*, **115**, 2119-2127.
5. Acker T and Plate KH (2003) Role of hypoxia in tumor angiogenesis-molecular and cellular angiogenic crosstalk. *Cell Tissue Res*, **314**, 145-155.
6. Adamis AP, Shima DT, Tolentino MJ, Gragoudas ES, Ferrara N, Folkman J, D'Amore PA, and Miller JW (1996) Inhibition of vascular endothelial growth factor prevents retinal ischemia-associated iris neovascularization in a nonhuman primate. *Arch Ophthalmol*, **114**, 66-71.
7. Ahmad S, Hewett PW, Wang P, Al-Ani B, Cudmore M, Fujisawa T, Haigh JJ, le NF, Wang L, Mukhopadhyay D, and Ahmed A (2006) Direct evidence for endothelial vascular endothelial growth factor receptor-1 function in nitric oxide-mediated angiogenesis
1. *Circ Res*, **99**, 715-722.
8. Ahmed A, Dunk C, Kniss D, and Wilkes M (1997) Role of VEGF receptor-1 (Flt-1) in mediating calcium-dependent nitric oxide release and limiting DNA synthesis in human trophoblast cells
1. *Lab Invest*, **76**, 779-791.
9. Aiello LP, Avery RL, Arrigg PG, Keyt BA, Jampel HD, Shah ST, Pasquale LR, Thieme H, Iwamoto MA, Park JE, and . (1994) Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders. *N Engl J Med*, **331**, 1480-1487.

10. Aiello LP, Pierce EA, Foley ED, Takagi H, Chen H, Riddle L, Ferrara N, King GL, and Smith LE (1995) Suppression of retinal neovascularization in vivo by inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) using soluble VEGF-receptor chimeric proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 10457-10461.
11. Alderton WK, Cooper CE, and Knowles RG (2001) Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition
4. *Biochem J*, **357**, 593-615.
12. Alonso J, Sanchez de ML, Monton M, Casado S, and Lopez-Farre A (1997) Endothelial cytosolic proteins bind to the 3' untranslated region of endothelial nitric oxide synthase mRNA: regulation by tumor necrosis factor alpha
2. *Mol Cell Biol*, **17**, 5719-5726.
13. Arnet UA, McMillan A, Dinerman JL, Ballermann B, and Lowenstein CJ (1996) Regulation of endothelial nitric-oxide synthase during hypoxia. *J Biol Chem*, **271**, 15069-15073.
14. Ayajiki K, Kindermann M, Hecker M, Fleming I, and Busse R (1996) Intracellular pH and tyrosine phosphorylation but not calcium determine shear stress-induced nitric oxide production in native endothelial cells
1. *Circ Res*, **78**, 750-758.
15. Bae DG, Gho YS, Yoon WH, and Chae CB (2000) Arginine-rich anti-vascular endothelial growth factor peptides inhibit tumor growth and metastasis by blocking angiogenesis. *J Biol Chem*, **275**, 13588-13596.
16. Bates DO and Harper SJ (2002) Regulation of vascular permeability by vascular endothelial growth factors. *Vascul Pharmacol*, **39**, 225-237.
17. Bauer PM, Fulton D, Boo YC, Sorescu GP, Kemp BE, Jo H, and Sessa WC (2003) Compensatory phosphorylation and protein-protein interactions revealed by loss of function and gain of function mutants of multiple serine phosphorylation sites in endothelial nitric-oxide synthase
2. *J Biol Chem*, **278**, 14841-14849.
18. Bernatchez PN, Rollin S, Soker S, and Sirois MG (2002) Relative effects of VEGF-A and VEGF-C on endothelial cell proliferation, migration and PAF synthesis: Role of neuropilin-1
5. *J Cell Biochem*, **85**, 629-639.
19. Boo YC, Sorescu G, Boyd N, Shiojima I, Walsh K, Du J, and Jo H (2002) Shear stress stimulates phosphorylation of endothelial nitric-oxide

- synthase at Ser1179 by Akt-independent mechanisms: role of protein kinase A
2. *J Biol Chem*, **277**, 3388-3396.
20. Bouloumie A, Schini-Kerth VB, and Busse R (1999) Vascular endothelial growth factor up-regulates nitric oxide synthase expression in endothelial cells
7. *Cardiovasc Res*, **41**, 773-780.
21. Bredt DS (1999) Endogenous nitric oxide synthesis: biological functions and pathophysiology
1. *Free Radic Res*, **31**, 577-596.
22. Bredt DS and Snyder SH (1990) Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, 682-685.
23. Brouet A, Sonveaux P, Dessy C, Balligand JL, and Feron O (2001) Hsp90 ensures the transition from the early Ca²⁺-dependent to the late phosphorylation-dependent activation of the endothelial nitric-oxide synthase in vascular endothelial growth factor-exposed endothelial cells. *J Biol Chem*, **276**, 32663-32669.
24. Brown LF, Detmar M, Claffey K, Nagy JA, Feng D, Dvorak AM, and Dvorak HF (1997) Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a multifunctional angiogenic cytokine
4. *EXS*, **79**, 233-269.
25. Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS, Anderson MJ, Arden KC, Blenis J, and Greenberg ME (1999) Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell*, **96**, 857-868.
26. Burnett AL, Lowenstein CJ, Bredt DS, Chang TS, and Snyder SH (1992) Nitric oxide: a physiologic mediator of penile erection. *Science*, **257**, 401-403.
27. Busse R and Mulsch A (1990) Calcium-dependent nitric oxide synthesis in endothelial cytosol is mediated by calmodulin. *FEBS Lett*, **265**, 133-136.
28. Cao S, Yao J, McCabe TJ, Yao Q, Katusic ZS, Sessa WC, and 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.

29. Cao S, Yao J, and 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.
30. Carmeliet P (2000) Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med*, **6**, 389-395.
31. Carmeliet P (2005) Angiogenesis in life, disease and medicine
1. *Nature*, **438**, 932-936.
32. Carmeliet P and Collen D (1997) Molecular analysis of blood vessel formation and disease
3. *Am J Physiol*, **273**, H2091-H2104.
33. 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, and Nagy A (1996) Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele
1. *Nature*, **380**, 435-439.
34. Carmeliet P, Ng YS, Nuyens D, Theilmeier G, Brusselmans K, Cornelissen I, Ehler E, Kakkar VV, Stalmans I, Mattot V, Perriard JC, Dewerchin M, Flameng W, Nagy A, Lupu F, Moons L, Collen D, D'Amore PA, and Shima DT (1999) Impaired myocardial angiogenesis and ischemic cardiomyopathy in mice lacking the vascular endothelial growth factor isoforms VEGF164 and VEGF188. *Nat Med*, **5**, 495-502.
35. Carvajal JA, Germain AM, Huidobro-Toro JP, and Weiner CP (2000) Molecular mechanism of cGMP-mediated smooth muscle relaxation
3. *J Cell Physiol*, **184**, 409-420.
36. Cieslik K, Lee CM, Tang JL, and Wu KK (1999) Transcriptional regulation of endothelial nitric-oxide synthase by an interaction between casein kinase 2 and protein phosphatase 2A. *J Biol Chem*, **274**, 34669-34675.
37. Claesson-Welsh L (2003) Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. *Biochem Soc Trans*, **31**, 20-24.
38. Conway EM, Collen D, and Carmeliet P (2001) Molecular mechanisms of blood vessel growth. *Cardiovasc Res*, **49**, 507-521.
39. Corada M, Mariotti M, Thurston G, Smith K, Kunkel R, Brockhaus M, Lampugnani MG, Martin-Padura I, Stoppacciaro A, Ruco L, McDonald DM, Ward PA, and Dejana E (1999) Vascular endothelial-cadherin is an

- important determinant of microvascular integrity in vivo
1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 9815-9820.
40. Corson MA, James NL, Latta SE, Nerem RM, Berk BC, and Harrison DG (1996) Phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase in response to fluid shear stress
1. *Circ Res*, **79**, 984-991.
41. Couet J, Li S, Okamoto T, Ikezu T, and Lisanti MP (1997) Identification of peptide and protein ligands for the caveolin-scaffolding domain. Implications for the interaction of caveolin with caveolae-associated proteins
1. *J Biol Chem*, **272**, 6525-6533.
42. Crane BR, Arvai AS, Ghosh DK, Wu C, Getzoff ED, Stuehr DJ, and Tainer JA (1998) Structure of nitric oxide synthase oxygenase dimer with pterin and substrate. *Science*, **279**, 2121-2126.
43. Cross MJ, Lu L, Magnusson P, Nyqvist D, Holmqvist K, Welsh M, and Claesson-Welsh L (2002) The Shb adaptor protein binds to tyrosine 766 in the FGFR-1 and regulates the Ras/MEK/MAPK pathway via FRS2 phosphorylation in endothelial cells. *Mol Biol Cell*, **13**, 2881-2893.
44. Cuevas B, Lu Y, Watt S, Kumar R, Zhang J, Siminovitch KA, and Mills GB (1999) SHP-1 regulates Lck-induced phosphatidylinositol 3-kinase phosphorylation and activity. *J Biol Chem*, **274**, 27583-27589.
45. Cuevas BD, Lu Y, Mao M, Zhang J, LaPushin R, Siminovitch K, and Mills GB (2001) Tyrosine phosphorylation of p85 relieves its inhibitory activity on phosphatidylinositol 3-kinase
1. *J Biol Chem*, **276**, 27455-27461.
46. Cunningham SA, Arrate MP, Brock TA, and 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.
47. Daff S, Sagami I, and Shimizu T (1999) The 42-amino acid insert in the FMN domain of neuronal nitric-oxide synthase exerts control over Ca(2+)/calmodulin-dependent electron transfer. *J Biol Chem*, **274**, 30589-30595.
48. Dance M, Montagner A, Yart A, Masri B, Audigier Y, Perret B, Salles JP, and Raynal P (2006) The adaptor protein Gab1 couples the stimulation of vascular endothelial growth factor receptor-2 to the activation of

- phosphoinositide 3-kinase
1. *J Biol Chem*, **281**, 23285-23295.
49. Dayanir V, Meyer RD, Lashkari K, and Rahimi N (2001) Identification of tyrosine residues in vascular endothelial growth factor receptor-2/FLK-1 involved in activation of phosphatidylinositol 3-kinase and cell proliferation. *J Biol Chem*, **276**, 17686-17692.
50. Dedio J, Konig P, Wohlfart P, Schroeder C, Kummer W, and Muller-Esterl W (2001) NOSIP, a novel modulator of endothelial nitric oxide synthase activity
4. *FASEB J*, **15**, 79-89.
51. deVries C, Escobedo JA, Ueno H, Houck K, Ferrara N, and Williams LT (1992) The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor
1. *Science*, **255**, 989-991.
52. Dickie BG, Lewis MJ, and Davies JA (1992) NMDA-induced release of nitric oxide potentiates aspartate overflow from cerebellar slices. *Neurosci Lett*, **138**, 145-148.
53. Dimmeler S, Dernbach E, and Zeiher AM (2000) Phosphorylation of the endothelial nitric oxide synthase at ser-1177 is required for VEGF-induced endothelial cell migration
12. *FEBS Lett*, **477**, 258-262.
54. Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, and Zeiher AM (1999) Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation
8. *Nature*, **399**, 601-605.
55. DiPietro LA (1997). Thrombospondin as a regulator of angiogenesis. In Rosen, E. & G.I.D. (Ed.), *Regulation of Angiogenesis*, . Springer, Berlin, pp. 295-314.
56. Doanes AM, Hegland DD, Sethi R, Kovesdi I, Bruder JT, and Finkel T (1999) VEGF stimulates MAPK through a pathway that is unique for receptor tyrosine kinases. *Biochem Biophys Res Commun*, **255**, 545-548.
57. Dougher M and Terman BI (1999) Autophosphorylation of KDR in the kinase domain is required for maximal VEGF-stimulated kinase activity and receptor internalization
1. *Oncogene*, **18**, 1619-1627.

58. Dougher-Vermazen M, Hulmes JD, Bohlen P, and Terman BI (1994) Biological activity and phosphorylation sites of the bacterially expressed cytosolic domain of the KDR VEGF-receptor
4. *Biochem Biophys Res Commun*, **205**, 728-738.
59. Drake CJ and Little CD (1995) Exogenous vascular endothelial growth factor induces malformed and hyperfused vessels during embryonic neovascularization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 7657-7661.
60. Drummond GR, Cai H, Davis ME, Ramasamy S, and Harrison DG (2000) Transcriptional and posttranscriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase expression by hydrogen peroxide
3. *Circ Res*, **86**, 347-354.
61. Duval M, Bedard-Goulet S, Delisle C, and 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.
62. Dvorak HF (2005) Angiogenesis: update 2005
1. *J Thromb Haemost*, **3**, 1835-1842.
63. Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, and Dvorak AM (1995) Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol*, **146**, 1029-1039.
64. Ellis LM (2005) Bevacizumab
1. *Nat Rev Drug Discov*, **Suppl**, S8-S9.
65. Eriksson A, Cao R, Roy J, Tritsarlis K, Wahlestedt C, Dissing S, Thyberg J, and Cao Y (2003) Small GTP-binding protein Rac is an essential mediator of vascular endothelial growth factor-induced endothelial fenestrations and vascular permeability
1. *Circulation*, **107**, 1532-1538.
66. Esser S, Wolburg K, Wolburg H, Breier G, Kurzchalia T, and Risau W (1998) Vascular endothelial growth factor induces endothelial fenestrations in vitro. *J Cell Biol*, **140**, 947-959.
67. Ewan LC, Jopling HM, Jia H, Mittar S, Bagherzadeh A, Howell GJ, Walker JH, Zachary IC, and 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.

68. Faehling M, Kroll J, Fohr KJ, Fellbrich G, Mayr U, Trischler G, and Waltenberger J (2002) Essential role of calcium in vascular endothelial growth factor A-induced signaling: mechanism of the antiangiogenic effect of carboxyamidotriazole
1. *FASEB J*, **16**, 1805-1807.
69. Fam NP, Verma S, Kutryk M, and Stewart DJ (2003) Clinician guide to angiogenesis
1. *Circulation*, **108**, 2613-2618.
70. Feron O, Belhassen L, Kobzik L, Smith TW, Kelly RA, and Michel T (1996) Endothelial nitric oxide synthase targeting to caveolae. Specific interactions with caveolin isoforms in cardiac myocytes and endothelial cells
2. *J Biol Chem*, **271**, 22810-22814.
71. Ferrara N (2004) Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev*, **25**, 581-611.
72. Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H, Dowd M, Lu L, O'Shea KS, Powell-Braxton L, Hillan KJ, and Moore MW (1996) Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene
87. *Nature*, **380**, 439-442.
73. Ferrara N and Kerbel RS (2005) Angiogenesis as a therapeutic target
1. *Nature*, **438**, 967-974.
74. Ferrara N and vis-Smyth T (1997) The biology of vascular endothelial growth factor
4. *Endocr Rev*, **18**, 4-25.
75. Fleming I, Bara AT, and Busse R (1996) Calcium signalling and autacoid production in endothelial cells are modulated by changes in tyrosine kinase and phosphatase activity
1. *J Vasc Res*, **33**, 225-234.
76. Fleming I, Bauersachs J, Fisslthaler B, and Busse R (1998) Ca²⁺-independent activation of the endothelial nitric oxide synthase in response to tyrosine phosphatase inhibitors and fluid shear stress
5. *Circ Res*, **82**, 686-695.
77. Fleming I, Fisslthaler B, Dimmeler S, Kemp BE, and Busse R (2001) Phosphorylation of Thr(495) regulates Ca(2+)/calmodulin-dependent endothelial nitric oxide synthase activity
3. *Circ Res*, **88**, E68-E75.

78. Folkman J (1995) Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med*, **1**, 27-31.
79. Folkman J and D'Amore PA (1996) Blood vessel formation: what is its molecular basis?
 1. *Cell*, **87**, 1153-1155.
80. Fong GH, Rossant J, Gertsenstein M, and Breitman ML (1995) Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium
 2. *Nature*, **376**, 66-70.
81. Fong GH, Zhang L, Bryce DM, and Peng J (1999) Increased hemangioblast commitment, not vascular disorganization, is the primary defect in flt-1 knock-out mice. *Development*, **126**, 3015-3025.
82. Fontana J, Fulton D, Chen Y, Fairchild TA, McCabe TJ, Fujita N, Tsuruo T, and Sessa WC (2002) 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.
83. Forstermann U, Schmidt HH, Pollock JS, Sheng H, Mitchell JA, Warner TD, Nakane M, and Murad F (1991) Isoforms of nitric oxide synthase. Characterization and purification from different cell types. *Biochem Pharmacol*, **42**, 1849-1857.
84. Frank S, Hubner G, Breier G, Longaker MT, Greenhalgh DG, and Werner S (1995) Regulation of vascular endothelial growth factor expression in cultured keratinocytes. Implications for normal and impaired wound healing. *J Biol Chem*, **270**, 12607-12613.
85. Fraser HM, Dickson SE, Lunn SF, Wulff C, Morris KD, Carroll VA, and Bicknell R (2000) Suppression of luteal angiogenesis in the primate after neutralization of vascular endothelial growth factor. *Endocrinology*, **141**, 995-1000.
86. Freeman MR, Schneck FX, Gagnon ML, Corless C, Soker S, Niknejad K, Peoples GE, and Klagsbrun M (1995) Peripheral blood T lymphocytes and lymphocytes infiltrating human cancers express vascular endothelial growth factor: a potential role for T cells in angiogenesis. *Cancer Res*, **55**, 4140-4145.

87. Fresno Vara JA, Casado E, de CJ, Cejas P, Belda-Iñiesta C, and Gonzalez-Baron M (2004) PI3K/Akt signalling pathway and cancer
4. *Cancer Treat Rev*, **30**, 193-204.
88. Frisch SM and Ruoslahti E (1997) Integrins and anoikis. *Curr Opin Cell Biol*, **9**, 701-706.
89. Fukumura D, Gohongi T, Kadambi A, Izumi Y, Ang J, Yun CO, Buerk DG, Huang PL, and 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.
90. Fulton D, Church JE, Ruan L, Li C, Sood SG, Kemp BE, Jennings IG, and Venema RC (2005) Src kinase activates endothelial nitric-oxide synthase by phosphorylating Tyr-83
7. *J Biol Chem*, **280**, 35943-35952.
91. Fulton D, Gratton JP, McCabe TJ, Fontana J, Fujio Y, Walsh K, Franke TF, Papapetropoulos A, and Sessa WC (1999) Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature*, **399**, 597-601.
92. Furchgott RF (1988). Studies on relaxation of rabbit aorta by sodium nitrite: the basis for the proposal that the acid-activable inhibitory factor from retractor penis is inorganic nitrite and endothelium-derived relaxing factor is nitric oxide. In Vanhoutte, P.M. (Ed.), *Vasodilatation: Vascular Smooth Muscle, Peptides, Autonomic Nerves and Endothelium*, . Raven Press, New York, pp. 401-414.
93. Furchgott RF and Zawadzki JV (1980) The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, **288**, 373-376.
94. Garcia Blanes M and Gratton JP (2006). Molecular regulation of endothelial nitric oxide synthase. In Re, RN., Dipette, DJ., Schiffrin, EL., and Sowers, JR. (Eds.), *Molecular mechanisms in hypertension*, . Taylor and Francis Publishing.
95. Garcia-Cardena G, Fan R, Shah V, Sorrentino R, Cirino G, Papapetropoulos A, and Sessa WC (1998) Dynamic activation of endothelial nitric oxide synthase by Hsp90
1. *Nature*, **392**, 821-824.

96. Garcia-Cardena G, Fan R, Stern DF, Liu J, and Sessa WC (1996a) Endothelial nitric oxide synthase is regulated by tyrosine phosphorylation and interacts with caveolin-1
1. *J Biol Chem*, **271**, 27237-27240.
97. Garcia-Cardena G, Martasek P, Masters BS, Skidd PM, Couet J, Li S, Lisanti MP, and Sessa WC (1997) Dissecting the interaction between nitric oxide synthase (NOS) and caveolin. Functional significance of the nos caveolin binding domain in vivo
1. *J Biol Chem*, **272**, 25437-25440.
98. Garcia-Cardena G, Oh P, Liu J, Schnitzer JE, and Sessa WC (1996b) Targeting of nitric oxide synthase to endothelial cell caveolae via palmitoylation: implications for nitric oxide signaling
1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 6448-6453.
99. Garner A. Pathobiology of Ocular Disease. Garner, A. Klintworth G. K. Vascular diseases. 1625-1710. 1994. New York, Marcel Dekker.
Ref Type: Generic
100. Gelinas DS, Bernatchez PN, Rollin S, Bazan NG, and Sirois MG (2002) Immediate and delayed VEGF-mediated NO synthesis in endothelial cells: role of PI3K, PKC and PLC pathways
1. *Br J Pharmacol*, **137**, 1021-1030.
101. Gerber HP, Hillan KJ, Ryan AM, Kowalski J, Keller GA, Rangell L, Wright BD, Radtke F, Aguet M, and Ferrara N (1999a) VEGF is required for growth and survival in neonatal mice
3. *Development*, **126**, 1149-1159.
102. Gerber HP, Malik AK, Solar GP, Sherman D, Liang XH, Meng G, Hong K, Marsters JC, and Ferrara N (2002) VEGF regulates haematopoietic stem cell survival by an internal autocrine loop mechanism. *Nature*, **417**, 954-958.
103. Gerber HP, McMurtrey A, Kowalski J, Yan M, Keyt BA, 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
1. *J Biol Chem*, **273**, 30336-30343.
104. Gerber HP, Vu TH, Ryan AM, Kowalski J, Werb Z, and Ferrara N (1999b) VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nat Med*, **5**, 623-628.

105. Gilbert Scott F. (2000). Lateral plate mesoderm and endoderm. *Developmental Biology*, . Sibauer Associates, Inc., pp. 471-501.
106. Gille H, Kowalski J, Li B, LeCouter J, Moffat B, Zioncheck TF, Pelletier N, and Ferrara N (2001) Analysis of biological effects and signaling properties of Flt-1 (VEGFR-1) and KDR (VEGFR-2). A reassessment using novel receptor-specific vascular endothelial growth factor mutants
1. *J Biol Chem*, **276**, 3222-3230.
107. Gillespie JS, Liu XR, and Martin W (1989) The effects of L-arginine and NG-monomethyl L-arginine on the response of the rat anococcygeus muscle to NANC nerve stimulation
11. *Br J Pharmacol*, **98**, 1080-1082.
108. Glick G, bu-Ghazaleh R, Jezequel S, Wheeler-Jones C, and Zachary I (2001) Vascular endothelial growth factor-induced prostacyclin production is mediated by a protein kinase C (PKC)-dependent activation of extracellular signal-regulated protein kinases 1 and 2 involving PKC-delta and by mobilization of intracellular Ca²⁺. *Biochem J*, **353**, 503-512.
109. Goligorsky MS, Abedi H, Noiri E, Takhtajan A, Lense S, Romanov V, and Zachary I (1999) Nitric oxide modulation of focal adhesions in endothelial cells
1. *Am J Physiol*, **276**, C1271-C1281.
110. Golser R, Gorren AC, Leber A, Andrew P, Habisch HJ, Werner ER, Schmidt K, Venema RC, and 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
1. *J Biol Chem*, **275**, 5291-5296.
111. Gonzalez D, Herrera B, Beltran A, Otero K, Quintero G, and Rojas A (2003) Nitric oxide disrupts VE-cadherin complex in murine microvascular endothelial cells
1. *Biochem Biophys Res Commun*, **304**, 113-118.
112. Gratton JP, Fontana J, O'Connor DS, Garcia-Cardena G, McCabe TJ, and 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
1. *J Biol Chem*, **275**, 22268-22272.

113. Gratton JP, Lin MI, Yu J, Weiss ED, Jiang ZL, Fairchild TA, Iwakiri Y, Groszmann R, Claffey KP, Cheng YC, and Sessa WC (2003) Selective inhibition of tumor microvascular permeability by cavtratin blocks tumor progression in mice
1. *Cancer Cell*, **4**, 31-39.
114. Grugel S, Finkenzeller G, Weindel K, Barleon B, and Marme D (1995) Both v-Ha-Ras and v-Raf stimulate expression of the vascular endothelial growth factor in NIH 3T3 cells. *J Biol Chem*, **270**, 25915-25919.
115. Harrington EO, Loffler J, Nelson PR, Kent KC, Simons M, and Ware JA (1997) Enhancement of migration by protein kinase Calpha and inhibition of proliferation and cell cycle progression by protein kinase Cdelta in capillary endothelial cells. *J Biol Chem*, **272**, 7390-7397.
116. Harris MB, Blackstone MA, Sood SG, Li C, Goolsby JM, Venema VJ, Kemp BE, and Venema RC (2004) Acute activation and phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase by HMG-CoA reductase inhibitors. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **287**, H560-H566.
117. 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, and Rafii S (2002) Placental growth factor reconstitutes hematopoiesis by recruiting VEGFR1(+) stem cells from bone-marrow microenvironment
14. *Nat Med*, **8**, 841-849.
118. Hecker M, Mulsch A, and Busse R (1994) Subcellular localization and characterization of neuronal nitric oxide synthase. *J Neurochem*, **62**, 1524-1529.
119. Hess DT, Matsumoto A, Kim SO, Marshall HE, and Stamler JS (2005) Protein S-nitrosylation: purview and parameters
1. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **6**, 150-166.
120. Hirata K, Miki N, Kuroda Y, Sakoda T, Kawashima S, and Yokoyama M (1995) Low concentration of oxidized low-density lipoprotein and lysophosphatidylcholine upregulate constitutive nitric oxide synthase mRNA expression in bovine aortic endothelial cells
21. *Circ Res*, **76**, 958-962.
121. Hiratsuka S, Minowa O, Kuno J, Noda T, and Shibuya M (1998) Flt-1 lacking the tyrosine kinase domain is sufficient for normal development and angiogenesis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 9349-9354.

122. Hirsch DB, Steiner JP, Dawson TM, Mammen A, Hayek E, and Snyder SH (1993) Neurotransmitter release regulated by nitric oxide in PC-12 cells and brain synaptosomes. *Curr Biol*, **3**, 749-754.
123. Hobson B and Denekamp J (1984) Endothelial proliferation in tumours and normal tissues: continuous labelling studies. *Br J Cancer*, **49**, 405-413.
124. Holmqvist K, Cross MJ, Rolny C, Hagerkvist R, Rahimi N, Matsumoto T, Claesson-Welsh L, and Welsh M (2004) The adaptor protein shb binds to tyrosine 1175 in vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor-2 and regulates VEGF-dependent cellular migration. *J Biol Chem*, **279**, 22267-22275.
125. Hood J and Granger HJ (1998) Protein kinase G mediates vascular endothelial growth factor-induced Raf-1 activation and proliferation in human endothelial cells. *J Biol Chem*, **273**, 23504-23508.
126. Houck KA, Ferrara N, Winer J, Cachianes G, Li B, and Leung DW (1991) The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. *Mol Endocrinol*, **5**, 1806-1814.
127. Houck KA, Leung DW, Rowland AM, Winer J, and Ferrara N (1992) Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms. *J Biol Chem*, **267**, 26031-26037.
128. Hurshman AR, Krebs C, Edmondson DE, Huynh BH, and Marletta MA (1999) Formation of a pterin radical in the reaction of the heme domain of inducible nitric oxide synthase with oxygen. *Biochemistry*, **38**, 15689-15696.
129. Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, Cartwright T, Hainsworth J, Heim W, Berlin J, Baron A, Griffing S, Holmgren E, Ferrara N, Fyfe G, Rogers B, Ross R, and Kabbinavar F (2004) Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med*, **350**, 2335-2342.
130. Iadecola C, Zhang F, and Xu X (1993) Role of nitric oxide synthase-containing vascular nerves in cerebrovasodilation elicited from cerebellum. *Am J Physiol*, **264**, R738-R746.
131. Igarashi J, Bernier SG, and Michel T (2001) Sphingosine 1-phosphate and activation of endothelial nitric-oxide synthase. differential regulation

- of Akt and MAP kinase pathways by EDG and bradykinin receptors in vascular endothelial cells. *J Biol Chem*, **276**, 12420-12426.
132. Ilic D, Almeida EA, Schlaepfer DD, Dazin P, Aizawa S, and Damsky CH (1998) Extracellular matrix survival signals transduced by focal adhesion kinase suppress p53-mediated apoptosis. *J Cell Biol*, **143**, 547-560.
133. Inoue N, Venema RC, Sayegh HS, Ohara Y, Murphy TJ, and Harrison DG (1995) Molecular regulation of the bovine endothelial cell nitric oxide synthase by transforming growth factor-beta 1
2. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **15**, 1255-1261.
134. Ivan M, Kondo K, Yang H, Kim W, Valiando J, Ohh M, Salic A, Asara JM, Lane WS, and Kaelin WG, Jr. (2001) HIFalpha targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing. *Science*, **292**, 464-468.
135. Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, Wilson MI, Gielbert J, Gaskell SJ, Kriegsheim A, Hebestreit HF, Mukherji M, Schofield CJ, Maxwell PH, Pugh CW, and Ratcliffe PJ (2001) Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. *Science*, **292**, 468-472.
136. Ju H, Venema VJ, Marrero MB, and Venema RC (1998) Inhibitory interactions of the bradykinin B2 receptor with endothelial nitric-oxide synthase
5. *J Biol Chem*, **273**, 24025-24029.
137. Ju H, Zou R, Venema VJ, and Venema RC (1997) Direct interaction of endothelial nitric-oxide synthase and caveolin-1 inhibits synthase activity
5. *J Biol Chem*, **272**, 18522-18525.
138. Junqueira de Azevedo I, Farsky SH, Oliveira ML, and Ho PL (2001) Molecular cloning and expression of a functional snake venom vascular endothelium growth factor (VEGF) from the *Bothrops insularis* pit viper. A new member of the VEGF family of proteins
2. *J Biol Chem*, **276**, 39836-39842.
139. Kanno S, Oda N, Abe M, Terai Y, Ito M, Shitara K, Tabayashi K, Shibuya M, and Sato Y (2000) Roles of two VEGF receptors, Flt-1 and KDR, in the signal transduction of VEGF effects in human vascular endothelial cells
4. *Oncogene*, **19**, 2138-2146.
140. Katoh O, Tauchi H, Kawaishi K, Kimura A, and Satow Y (1995) Expression of the vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor

- gene, KDR, in hematopoietic cells and inhibitory effect of VEGF on apoptotic cell death caused by ionizing radiation. *Cancer Res*, **55**, 5687-5692.
141. Kendall RL, Rutledge RZ, Mao X, Tebben AJ, Hungate RW, and Thomas KA (1999) Vascular endothelial growth factor receptor KDR tyrosine kinase activity is increased by autophosphorylation of two activation loop tyrosine residues
8. *J Biol Chem*, **274**, 6453-6460.
142. Kendall RL and Thomas KA (1993) Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 10705-10709.
143. Kendall RL, Wang G, and Thomas KA (1996) Identification of a natural soluble form of the vascular endothelial growth factor receptor, FLT-1, and its heterodimerization with KDR. *Biochem Biophys Res Commun*, **226**, 324-328.
144. Kevil CG, Payne DK, Mire E, and Alexander JS (1998) Vascular permeability factor/vascular endothelial cell growth factor-mediated permeability occurs through disorganization of endothelial junctional proteins. *J Biol Chem*, **273**, 15099-15103.
145. Kim F, Gallis B, and 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.
146. Knight EL, Warner AJ, Maxwell A, and Prigent SA (2000) Chimeric VEGFRs are activated by a small-molecule dimerizer and mediate downstream signalling cascades in endothelial cells. *Oncogene*, **19**, 5398-5405.
147. Korth HG, Sustmann R, Thater C, Butler AR, and Ingold KU (1994) On the mechanism of the nitric oxide synthase-catalyzed conversion of N omega-hydroxyl-L-arginine to citrulline and nitric oxide
1. *J Biol Chem*, **269**, 17776-17779.
148. Kou R, Greif D, and Michel T (2002) Dephosphorylation of endothelial nitric-oxide synthase by vascular endothelial growth factor. Implications for the vascular responses to cyclosporin A. *J Biol Chem*, **277**, 29669-29673.

149. Kovacs Z, Ikezaki K, Samoto K, Inamura T, and Fukui M (1996) VEGF and flt. Expression time kinetics in rat brain infarct
3. *Stroke*, **27**, 1865-1872.
150. Kroll J and Waltenberger J (1998) VEGF-A induces expression of eNOS and iNOS in endothelial cells via VEGF receptor-2 (KDR)
6. *Biochem Biophys Res Commun*, **252**, 743-746.
151. Kroll J and Waltenberger J (1999) A novel function of VEGF receptor-2 (KDR): rapid release of nitric oxide in response to VEGF-A stimulation in endothelial cells
4. *Biochem Biophys Res Commun*, **265**, 636-639.
152. Kuboki K, Jiang ZY, Takahara N, Ha SW, Igarashi M, Yamauchi T, Feener EP, Herbert TP, Rhodes CJ, and King GL (2000) Regulation of endothelial constitutive nitric oxide synthase gene expression in endothelial cells and in vivo : a specific vascular action of insulin
1. *Circulation*, **101**, 676-681.
153. Kuchan MJ and Frangos JA (1994) Role of calcium and calmodulin in flow-induced nitric oxide production in endothelial cells
2. *Am J Physiol*, **266**, C628-C636.
154. Kvanta A (2006) Ocular angiogenesis: the role of growth factors
2. *Acta Ophthalmol Scand*, **84**, 282-288.
155. Lamalice L, Houle F, Jourdan G, and 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.
156. Landry J and Huot J (1999) Regulation of actin dynamics by stress-activated protein kinase 2 (SAPK2)-dependent phosphorylation of heat-shock protein of 27 kDa (Hsp27). *Biochem Soc Symp*, **64**, 79-89.
157. Lane P and 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
2. *J Biol Chem*, **277**, 19087-19094.
158. Lange T, Guttman-Raviv N, Baruch L, Machluf M, and Neufeld G (2003) VEGF162, a new heparin-binding vascular endothelial growth factor splice form that is expressed in transformed human cells. *J Biol Chem*, **278**, 17164-17169.

159. Lantin-Hermoso RL, Rosenfeld CR, Yuhanna IS, German Z, Chen Z, and Shaul PW (1997) Estrogen acutely stimulates nitric oxide synthase activity in fetal pulmonary artery endothelium. *Am J Physiol*, **273**, L119-L126.
160. LeBoeuf F, Houle F, and 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
2. *J Biol Chem*, **279**, 39175-39185.
161. Levkau B, Herren B, Koyama H, Ross R, and Raines EW (1998) Caspase-mediated cleavage of focal adhesion kinase pp125FAK and disassembly of focal adhesions in human endothelial cell apoptosis. *J Exp Med*, **187**, 579-586.
162. Li CG and Rand MJ (1989) Evidence for a role of nitric oxide in the neurotransmitter system mediating relaxation of the rat anococcygeus muscle
37. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, **16**, 933-938.
163. Li J, Billiar TR, Talanian RV, and Kim YM (1997) Nitric oxide reversibly inhibits seven members of the caspase family via S-nitrosylation. *Biochem Biophys Res Commun*, **240**, 419-424.
164. Liao JK, Shin WS, Lee WY, and Clark SL (1995) Oxidized low-density lipoprotein decreases the expression of endothelial nitric oxide synthase
5. *J Biol Chem*, **270**, 319-324.
165. Lin MI, Fulton D, Babbitt R, Fleming I, Busse R, Pritchard KA, Jr., and Sessa WC (2003) Phosphorylation of threonine 497 in endothelial nitric-oxide synthase coordinates the coupling of L-arginine metabolism to efficient nitric oxide production
1. *J Biol Chem*, **278**, 44719-44726.
166. Lindholm CK, Gylfe E, Zhang W, Samelson LE, and Welsh M (1999) Requirement of the Src homology 2 domain protein Shb for T cell receptor-dependent activation of the interleukin-2 gene nuclear factor for activation of T cells element in Jurkat T cells
1. *J Biol Chem*, **274**, 28050-28057.
167. Liu J, Garcia-Cardena G, and Sessa WC (1995a) 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
8. *Biochemistry*, **34**, 12333-12340.
168. Liu J, Garcia-Cardena G, and 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.
169. Liu J and Sessa WC (1994) Identification of covalently bound amino-terminal myristic acid in endothelial nitric oxide synthase
10. *J Biol Chem*, **269**, 11691-11694.
170. Liu Y, Cox SR, Morita T, and Kourembanas S (1995b) Hypoxia regulates vascular endothelial growth factor gene expression in endothelial cells. Identification of a 5' enhancer
1. *Circ Res*, **77**, 638-643.
171. Lodish BZMBD (2000). Cell-to-Cell Signaling: Hormones and Receptors. In Tenney, A.S.U. (Ed.), *Molecular Cell Biology*, W. H. Freeman and Company, New York, pp. 848-909.
172. Lonart G, Wang J, and Johnson KM (1992) Nitric oxide induces neurotransmitter release from hippocampal slices. *Eur J Pharmacol*, **220**, 271-272.
173. Lopez-Farre A, Sanchez de ML, Caramelo C, Gomez-Macias J, Garcia R, Mosquera JR, de FT, Millas I, Rivas F, Echezarreta G, and Casado S (1997) Role of nitric oxide in autocrine control of growth and apoptosis of endothelial cells
21. *Am J Physiol*, **272**, H760-H768.
174. Lu JL, Schmiege LM, III, Kuo L, and Liao JC (1996) Downregulation of endothelial constitutive nitric oxide synthase expression by lipopolysaccharide
1. *Biochem Biophys Res Commun*, **225**, 1-5.
175. Luckhoff A, Pohl U, Mulsch A, and Busse R (1988) Differential role of extra- and intracellular calcium in the release of EDRF and prostacyclin from cultured endothelial cells
3. *Br J Pharmacol*, **95**, 189-196.
176. Maes C, Stockmans I, Moermans K, Van LR, Smets N, Carmeliet P, Bouillon R, and Carmeliet G (2004) Soluble VEGF isoforms are essential for establishing epiphyseal vascularization and regulating chondrocyte

development and survival

3. *J Clin Invest*, **113**, 188-199.

177. Makinen T, Jussila L, Veikkola T, Karpanen T, Kettunen MI, Pulkkanen KJ, Kauppinen R, Jackson DG, Kubo H, Nishikawa S, Yla-Herttuala S, and Alitalo K (2001) Inhibition of lymphangiogenesis with resulting lymphedema in transgenic mice expressing soluble VEGF receptor-3. *Nat Med*, **7**, 199-205.
178. Malecaze F, Clamens S, Simorre-Pinatel V, Mathis A, Chollet P, Favard C, Bayard F, and Plouet J (1994) Detection of vascular endothelial growth factor messenger RNA and vascular endothelial growth factor-like activity in proliferative diabetic retinopathy. *Arch Ophthalmol*, **112**, 1476-1482.
179. Marrero MB, Venema VJ, Ju H, He H, Liang H, Caldwell RB, and Venema RC (1999) Endothelial nitric oxide synthase interactions with G-protein-coupled receptors
4. *Biochem J*, **343 Pt 2**, 335-340.
180. Marsden PA, Heng HH, Scherer SW, Stewart RJ, Hall AV, Shi XM, Tsui LC, and Schappert KT (1993) Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene. *J Biol Chem*, **268**, 17478-17488.
181. Matsumoto T, Bohman S, Dixelius J, Berge T, Dimberg A, Magnusson P, Wang L, Wikner C, Qi JH, Wernstedt C, Wu J, Bruheim S, Mugishima H, Mukhopadhyay D, Spurkland A, and Claesson-Welsh L (2005) VEGF receptor-2 Y951 signaling and a role for the adapter molecule TSA1 in tumor angiogenesis. *EMBO J*, **24**, 2342-2353.
182. Matsumoto T and Mugishima H (2006) Signal transduction via vascular endothelial growth factor (VEGF) receptors and their roles in atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb*, **13**, 130-135.
183. Meadows KN, Bryant P, and Pumiglia K (2001) Vascular endothelial growth factor induction of the angiogenic phenotype requires Ras activation
2. *J Biol Chem*, **276**, 49289-49298.
184. Melder M, Reinders ME, Sho M, Pal S, Geehan C, Denton MD, Mukhopadhyay D, and Briscoe DM (2000) Ligation of CD40 induces the expression of vascular endothelial growth factor by endothelial cells and monocytes and promotes angiogenesis in vivo. *Blood*, **96**, 3801-3808.

185. Meyer RD, Dayanir V, Majnoun F, and 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.
186. Meyer RD, Latz C, and Rahimi N (2003) Recruitment and activation of phospholipase Cgamma1 by vascular endothelial growth factor receptor-2 are required for tubulogenesis and differentiation of endothelial cells. *J Biol Chem*, **278**, 16347-16355.
187. Michel JB, Feron O, Sacks D, and Michel T (1997a) Reciprocal regulation of endothelial nitric-oxide synthase by Ca²⁺-calmodulin and caveolin 1. *J Biol Chem*, **272**, 15583-15586.
188. Michel JB, Feron O, Sase K, Prabhakar P, and Michel T (1997b) Caveolin versus calmodulin. Counterbalancing allosteric modulators of endothelial nitric oxide synthase
2. *J Biol Chem*, **272**, 25907-25912.
189. Michell BJ, Griffiths JE, Mitchelhill KI, Rodriguez-Crespo I, Tiganis T, Bozinovski S, de Montellano PR, Kemp BE, and Pearson RB (1999) The Akt kinase signals directly to endothelial nitric oxide synthase
1. *Curr Biol*, **9**, 845-848.
190. Michell BJ, Harris MB, Chen ZP, Ju H, Venema VJ, Blackstone MA, Huang W, Venema RC, and Kemp BE (2002) Identification of regulatory sites of phosphorylation of the bovine endothelial nitric-oxide synthase at serine 617 and serine 635
1. *J Biol Chem*, **277**, 42344-42351.
191. Moncada S, Palmer RM, and Higgs EA (1991) Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev*, **43**, 109-142.
192. Morales-Ruiz M, Fulton D, Sowa G, Languino LR, Fujio Y, Walsh K, and Sessa WC (2000) Vascular endothelial growth factor-stimulated actin reorganization and migration of endothelial cells is regulated via the serine/threonine kinase Akt
1. *Circ Res*, **86**, 892-896.
193. Morbidelli L, Chang CH, Douglas JG, Granger HJ, Ledda F, and Ziche M (1996) Nitric oxide mediates mitogenic effect of VEGF on coronary venular endothelium
1. *Am J Physiol*, **270**, H411-H415.

194. Muller YA, Christinger HW, Keyt BA, and de Vos AM (1997) The crystal structure of vascular endothelial growth factor (VEGF) refined to 1.93 Å resolution: multiple copy flexibility and receptor binding. *Structure*, **5**, 1325-1338.
195. Munoz-Chapuli R, Quesada AR, and Angel MM (2004) Angiogenesis and signal transduction in endothelial cells
2. *Cell Mol Life Sci*, **61**, 2224-2243.
196. Murohara T, Horowitz JR, Silver M, Tsurumi Y, Chen D, Sullivan A, and Isner JM (1998) Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor enhances vascular permeability via nitric oxide and prostacyclin
1. *Circulation*, **97**, 99-107.
197. Navarro-Antolin J, Rey-Campos J, and Lamas S (2000) Transcriptional induction of endothelial nitric oxide gene by cyclosporine A. A role for activator protein-1. *J Biol Chem*, **275**, 3075-3080.
198. Neufeld G, Cohen T, Shraga N, Lange T, Kessler O, and Herzog Y (2002) The neuropilins: multifunctional semaphorin and VEGF receptors that modulate axon guidance and angiogenesis
3. *Trends Cardiovasc Med*, **12**, 13-19.
199. Ng YS, Kralleke D, and Shima DT (2006) VEGF function in vascular pathogenesis
2. *Exp Cell Res*, **312**, 527-537.
200. Nishida CR and Ortiz de Montellano PR (1999) Autoinhibition of endothelial nitric-oxide synthase. Identification of an electron transfer control element. *J Biol Chem*, **274**, 14692-14698.
201. Nishida K, Harrison DG, Navas JP, Fisher AA, Dockery SP, Uematsu M, Nerem RM, Alexander RW, and Murphy TJ (1992) Molecular cloning and characterization of the constitutive bovine aortic endothelial cell nitric oxide synthase
4. *J Clin Invest*, **90**, 2092-2096.
202. Noiri E, Lee E, Testa J, Quigley J, Colflesh D, Keese CR, Giaever I, and Goligorsky MS (1998) Podokinesis in endothelial cell migration: role of nitric oxide
1. *Am J Physiol*, **274**, C236-C244.
203. O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, Fukai N, Vasios G, Lane WS, Flynn E, Birkhead JR, Olsen BR, and Folkman J (1997) Endostatin: an

- endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth
4. *Cell*, **88**, 277-285.
204. Ogawa S, Oku A, Sawano A, Yamaguchi S, Yazaki Y, and Shibuya M (1998) A novel type of vascular endothelial growth factor, VEGF-E (NZ-7 VEGF), preferentially utilizes KDR/Flk-1 receptor and carries a potent mitotic activity without heparin-binding domain. *J Biol Chem*, **273**, 31273-31282.
205. Okada F, Rak JW, Croix BS, Lieubeau B, Kaya M, Roncari L, Shirasawa S, Sasazuki T, and Kerbel RS (1998) Impact of oncogenes in tumor angiogenesis: mutant K-ras up-regulation of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor is necessary, but not sufficient for tumorigenicity of human colorectal carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 3609-3614.
206. Palmer RM, Ashton DS, and Moncada S (1988) Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature*, **333**, 664-666.
207. Papapetropoulos A, Garcia-Cardena G, Madri JA, and Sessa WC (1997) Nitric oxide production contributes to the angiogenic properties of vascular endothelial growth factor in human endothelial cells
5. *J Clin Invest*, **100**, 3131-3139.
208. Parenti A, Morbidelli L, Cui XL, Douglas JG, Hood JD, Granger HJ, Ledda F, and Ziche M (1998) Nitric oxide is an upstream signal of vascular endothelial growth factor-induced extracellular signal-regulated kinase1/2 activation in postcapillary endothelium
8. *J Biol Chem*, **273**, 4220-4226.
209. Park JE, Chen HH, Winer J, Houck KA, and Ferrara N (1994) Placenta growth factor. Potentiation of vascular endothelial growth factor bioactivity, in vitro and in vivo, and high affinity binding to Flt-1 but not to Flk-1/KDR. *J Biol Chem*, **269**, 25646-25654.
210. Park JE, Keller GA, and 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.
211. Pelicci G, Lanfrancone L, Grignani F, McGlade J, Cavallo F, Forni G, Nicoletti I, Grignani F, Pawson T, and Pelicci PG (1992) A novel transforming protein (SHC) with an SH2 domain is implicated in

- mitogenic signal transduction
3. *Cell*, **70**, 93-104.
212. Pepper MS, Ferrara N, Orci L, and Montesano R (1992) Potent synergism between vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in the induction of angiogenesis in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*, **189**, 824-831.
213. Pepper MS, Wasi S, Ferrara N, Orci L, and Montesano R (1994) In vitro angiogenic and proteolytic properties of bovine lymphatic endothelial cells. *Exp Cell Res*, **210**, 298-305.
214. Pertovaara L, Kaipainen A, Mustonen T, Orpana A, Ferrara N, Saksela O, and Alitalo K (1994) Vascular endothelial growth factor is induced in response to transforming growth factor-beta in fibroblastic and epithelial cells. *J Biol Chem*, **269**, 6271-6274.
215. Pike SE, Yao L, Jones KD, Cherney B, Appella E, Sakaguchi K, Nakhasi H, Teruya-Feldstein J, Wirth P, Gupta G, and Tosato G (1998) Vasostatin, a calreticulin fragment, inhibits angiogenesis and suppresses tumor growth
2. *J Exp Med*, **188**, 2349-2356.
216. Plouet J, Moro F, Bertagnoli S, Coldeboeuf N, Mazarguil H, Clamens S, and Bayard F (1997) Extracellular cleavage of the vascular endothelial growth factor 189-amino acid form by urokinase is required for its mitogenic effect
1. *J Biol Chem*, **272**, 13390-13396.
217. Prior BM, Lloyd PG, Yang HT, and Terjung RL (2003) Exercise-induced vascular remodeling
4. *Exerc Sport Sci Rev*, **31**, 26-33.
218. Radomski MW, Palmer RM, and Moncada S (1987a) The role of nitric oxide and cGMP in platelet adhesion to vascular endothelium. *Biochem Biophys Res Commun*, **148**, 1482-1489.
219. Radomski MW, Palmer RM, and Moncada S (1987b) Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium. *Lancet*, **2**, 1057-1058.
220. Radomski MW, Palmer RM, and Moncada S (1987c) The anti-aggregating properties of vascular endothelium: interactions between prostacyclin and nitric oxide. *Br J Pharmacol*, **92**, 639-646.

221. Rajfer J, Aronson WJ, Bush PA, Dorey FJ, and Ignarro LJ (1992) Nitric oxide as a mediator of relaxation of the corpus cavernosum in response to nonadrenergic, noncholinergic neurotransmission. *N Engl J Med*, **326**, 90-94.
222. Raman CS, Li H, Martasek P, Kral V, Masters BS, and 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.
223. Rapoport RM and Murad F (1983) Agonist-induced endothelium-dependent relaxation in rat thoracic aorta may be mediated through cGMP. *Circ Res*, **52**, 352-357.
224. Ratcliffe KE, Tao Q, Yavuz B, Stoletov KV, Spring SC, and Terman BI (2002) Sck is expressed in endothelial cells and participates in vascular endothelial growth factor-induced signaling
1. *Oncogene*, **21**, 6307-6316.
225. Reynolds LP, Grazul-Bilska AT, and Redmer DA (2002) Angiogenesis in the female reproductive organs: pathological implications. *Int J Exp Pathol*, **83**, 151-163.
226. Risau W (1997) Mechanisms of angiogenesis
1. *Nature*, **386**, 671-674.
227. Roberts WG and Palade GE (1995) Increased microvascular permeability and endothelial fenestration induced by vascular endothelial growth factor. *J Cell Sci*, **108 (Pt 6)**, 2369-2379.
228. Robinson CJ and Stringer SE (2001) The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors
3. *J Cell Sci*, **114**, 853-865.
229. Roman LJ, Martasek P, Miller RT, Harris DE, de La Garza MA, Shea TM, Kim JJ, and Masters BS (2000) The C termini of constitutive nitric-oxide synthases control electron flow through the flavin and heme domains and affect modulation by calmodulin. *J Biol Chem*, **275**, 29225-29232.
230. Romashkova JA and Makarov SS (1999) NF-kappaB is a target of AKT in anti-apoptotic PDGF signalling. *Nature*, **401**, 86-90.
231. Rossig L, Fichtlscherer B, Breitschopf K, Haendeler J, Zeiher AM, Mulsch A, and Dimmeler S (1999) Nitric oxide inhibits caspase-3 by S-nitrosation in vivo. *J Biol Chem*, **274**, 6823-6826.

232. 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.
233. Russell KS, Haynes MP, Caulin-Glaser T, Rosneck J, Sessa WC, and 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
6. *J Biol Chem*, **275**, 5026-5030.
234. Ryan AM, Eppler DB, Hagler KE, Bruner RH, Thomford PJ, Hall RL, Shopp GM, and O'Neill CA (1999) Preclinical safety evaluation of rhuMAbVEGF, an antiangiogenic humanized monoclonal antibody. *Toxicol Pathol*, **27**, 78-86.
235. Saitoh F, Tian QB, Okano A, Sakagami H, Kondo H, and Suzuki T (2004) NIDD, a novel DHHC-containing protein, targets neuronal nitric-oxide synthase (nNOS) to the synaptic membrane through a PDZ-dependent interaction and regulates nNOS activity
3. *J Biol Chem*, **279**, 29461-29468.
236. Sakurai Y, Ohgimoto K, Kataoka Y, Yoshida N, and Shibuya M (2005) Essential role of Flk-1 (VEGF receptor 2) tyrosine residue 1173 in vasculogenesis in mice
1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 1076-1081.
237. 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, and Gross SS (1997) An autoinhibitory control element defines calcium-regulated isoforms of nitric oxide synthase. *J Biol Chem*, **272**, 29769-29777.
238. Sawano A, Iwai S, Sakurai Y, Ito M, Shitara K, Nakahata T, and Shibuya M (2001) Flt-1, vascular endothelial growth factor receptor 1, is a novel cell surface marker for the lineage of monocyte-macrophages in humans
1. *Blood*, **97**, 785-791.
239. Schuman EM and Madison DV (1994) Nitric oxide and synaptic function
6. *Annu Rev Neurosci*, **17**, 153-183.

240. Sessa WC, Harrison JK, Barber CM, Zeng D, Durieux ME, D'Angelo DD, Lynch KR, and Peach MJ (1992) Molecular cloning and expression of a cDNA encoding endothelial cell nitric oxide synthase
1. *J Biol Chem*, **267**, 15274-15276.
241. Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, Gertsenstein M, Wu XF, Breitman ML, and Schuh AC (1995) Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice
2. *Nature*, **376**, 62-66.
242. Shaul PW, Smart EJ, Robinson LJ, German Z, Yuhanna IS, Ying Y, Anderson RG, and Michel T (1996) Acylation targets endothelial nitric-oxide synthase to plasmalemmal caveolae. *J Biol Chem*, **271**, 6518-6522.
243. Shibuki K and Okada D (1991) Endogenous nitric oxide release required for long-term synaptic depression in the cerebellum
2. *Nature*, **349**, 326-328.
244. Shibuya M, Yamaguchi S, Yamane A, Ikeda T, Tojo A, Matsushime H, and Sato M (1990) Nucleotide sequence and expression of a novel human receptor-type tyrosine kinase gene (flt) closely related to the fms family. *Oncogene*, **5**, 519-524.
245. Shifren JL, Mesiano S, Taylor RN, Ferrara N, and Jaffe RB (1998) Corticotropin regulates vascular endothelial growth factor expression in human fetal adrenal cortical cells. *J Clin Endocrinol Metab*, **83**, 1342-1347.
246. Shiojima I and Walsh K (2002) Role of Akt signaling in vascular homeostasis and angiogenesis. *Circ Res*, **90**, 1243-1250.
247. Shizukuda Y, Tang S, Yokota R, and 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
1. *Circ Res*, **85**, 247-256.
248. Siddhanta U, Wu C, bu-Soud HM, Zhang J, Ghosh DK, and Stuehr DJ (1996) Heme iron reduction and catalysis by a nitric oxide synthase heterodimer containing one reductase and two oxygenase domains. *J Biol Chem*, **271**, 7309-7312.
249. Sierra-Honigmann MR, Nath AK, Murakami C, Garcia-Cardena G, Papapetropoulos A, Sessa WC, Madge LA, Schechner JS, Schwabb MB,

- Polverini PJ, and Flores-Riveros JR (1998) Biological action of leptin as an angiogenic factor. *Science*, **281**, 1683-1686.
250. Soga N, Connolly JO, Chellaiah M, Kawamura J, and Hruska KA (2001) Rac regulates vascular endothelial growth factor stimulated motility
1. *Cell Commun Adhes*, **8**, 1-13.
251. Soh EY, Sobhi SA, Wong MG, Meng YG, Siperstein AE, Clark OH, and Duh QY (1996) Thyroid-stimulating hormone promotes the secretion of vascular endothelial growth factor in thyroid cancer cell lines. *Surgery*, **120**, 944-947.
252. Soker S, Takashima S, Miao HQ, Neufeld G, and 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.
253. Song G, Ouyang G, and Bao S (2005) The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival
3. *J Cell Mol Med*, **9**, 59-71.
254. Songyang Z, Shoelson SE, Chaudhuri M, Gish G, Pawson T, Haser WG, King F, Roberts T, Ratnofsky S, Lechleider RJ, and . (1993) SH2 domains recognize specific phosphopeptide sequences
4. *Cell*, **72**, 767-778.
255. Stoletov KV, Ratcliffe KE, Spring SC, and Terman BI (2001) NCK and PAK participate in the signaling pathway by which vascular endothelial growth factor stimulates the assembly of focal adhesions
1. *J Biol Chem*, **276**, 22748-22755.
256. Stuehr DJ and Marletta MA (1985) Mammalian nitrate biosynthesis: mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to *Escherichia coli* lipopolysaccharide
7. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **82**, 7738-7742.
257. Sun J and Liao JK (2002) Functional interaction of endothelial nitric oxide synthase with a voltage-dependent anion channel. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 13108-13113.
258. Sund M, Hamano Y, Sugimoto H, Sudhakar A, Soubasakos M, Yerramalla U, Benjamin LE, Lawler J, Kieran M, Shah A, and Kalluri R (2005) Function of endogenous inhibitors of angiogenesis as endothelium-specific tumor suppressors
5. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 2934-2939.

259. Tachibana K, Hirota S, Iizasa H, Yoshida H, Kawabata K, Kataoka Y, Kitamura Y, Matsushima K, Yoshida N, Nishikawa S, Kishimoto T, and Nagasawa T (1998) The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract
12. *Nature*, **393**, 591-594.
260. Takahashi H and Shibuya M (2005) The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions
2. *Clin Sci (Lond)*, **109**, 227-241.
261. Takahashi S and Mendelsohn ME (2003) Calmodulin-dependent and -independent activation of endothelial nitric-oxide synthase by heat shock protein 90. *J Biol Chem*, **278**, 9339-9344.
262. Takahashi T, Ueno H, and Shibuya M (1999) VEGF activates protein kinase C-dependent, but Ras-independent Raf-MEK-MAP kinase pathway for DNA synthesis in primary endothelial cells. *Oncogene*, **18**, 2221-2230.
263. 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
4. *EMBO J*, **20**, 2768-2778.
264. Tan E, Gurjar MV, Sharma RV, and Bhalla RC (1999) Estrogen receptor-alpha gene transfer into bovine aortic endothelial cells induces eNOS gene expression and inhibits cell migration
1. *Cardiovasc Res*, **43**, 788-797.
265. Tannock IF (1968) The relation between cell proliferation and the vascular system in a transplanted mouse mammary tumour
1. *Br J Cancer*, **22**, 258-273.
266. Teichert AM, Miller TL, Tai SC, Wang Y, Bei X, Robb GB, Phillips MJ, and Marsden PA (2000) In vivo expression profile of an endothelial nitric oxide synthase promoter-reporter transgene. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **278**, H1352-H1361.
267. Terman BI, Carrion ME, Kovacs E, Rasmussen BA, Eddy RL, and Shows TB (1991) Identification of a new endothelial cell growth factor receptor tyrosine kinase. *Oncogene*, **6**, 1677-1683.

268. Thakker GD, Hajjar DP, Muller WA, and Rosengart TK (1999) The role of phosphatidylinositol 3-kinase in vascular endothelial growth factor signaling. *J Biol Chem*, **274**, 10002-10007.
269. Thors B, Halldorsson H, and Thorgeirsson G (2004) Thrombin and histamine stimulate endothelial nitric-oxide synthase phosphorylation at Ser1177 via an AMPK mediated pathway independent of PI3K-Akt 1. *FEBS Lett*, **573**, 175-180.
270. Tischer E, Mitchell R, Hartman T, Silva M, Gospodarowicz D, Fiddes JC, and Abraham JA (1991) The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J Biol Chem*, **266**, 11947-11954.
271. Vaandrager AB and de Jonge HR (1996) Signalling by cGMP-dependent protein kinases. *Mol Cell Biochem*, **157**, 23-30.
272. Van Der Zee R, Murohara T, Luo Z, Zollmann F, Passeri J, Lekutat C, and Isner JM (1997) Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor augments nitric oxide release from quiescent rabbit and human vascular endothelium. *Circulation*, **95**, 1030-1037.
273. Venema RC, Ju H, Zou R, Ryan JW, and Venema VJ (1997) Subunit interactions of endothelial nitric-oxide synthase. Comparisons to the neuronal and inducible nitric-oxide synthase isoforms. *J Biol Chem*, **272**, 1276-1282.
274. Venema RC, Venema VJ, Ju H, Harris MB, Snead C, Jilling T, Dimitropoulou C, Maragoudakis ME, and Catravas JD (2003) Novel complexes of guanylate cyclase with heat shock protein 90 and nitric oxide synthase. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **285**, H669-H678.
275. Vincenti V, Cassano C, Rocchi M, and Persico G (1996) Assignment of the vascular endothelial growth factor gene to human chromosome 6p21.3. *Circulation*, **93**, 1493-1495.
276. Waltenberger J, Claesson-Welsh L, Siegbahn A, Shibuya M, and Heldin CH (1994) Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem*, **269**, 26988-26995.
277. Wang XQ and Vaziri ND (1999) Erythropoietin depresses nitric oxide synthase expression by human endothelial cells 11. *Hypertension*, **33**, 894-899.

278. Warner AJ, Lopez-Dee J, Knight EL, Feramisco JR, and Prigent SA (2000) The Shc-related adaptor protein, Sck, forms a complex with the vascular-endothelial-growth-factor receptor KDR in transfected cells 1. *Biochem J*, **347**, 501-509.
279. Warren RS, Yuan H, Matli MR, Ferrara N, and Donner DB (1996) Induction of vascular endothelial growth factor by insulin-like growth factor 1 in colorectal carcinoma. *J Biol Chem*, **271**, 29483-29488.
280. Watanabe K, Hasegawa Y, Yamashita H, Shimizu K, Ding Y, Abe M, Ohta H, Imagawa K, Hojo K, Maki H, Sonoda H, and Sato Y (2004) Vasohibin as an endothelium-derived negative feedback regulator of angiogenesis 83. *J Clin Invest*, **114**, 898-907.
281. Wellner M, Maasch C, Kupprion C, Lindschau C, Luft FC, and 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.
282. Wilden PA, Siddle K, Haring E, Backer JM, White MF, and Kahn CR (1992) The role of insulin receptor kinase domain autophosphorylation in receptor-mediated activities. Analysis with insulin and anti-receptor antibodies. *J Biol Chem*, **267**, 13719-13727.
283. Wise LM, Veikkola T, Mercer AA, Savory LJ, Fleming SB, Caesar C, Vitali A, Makinen T, Alitalo K, and Stacker SA (1999) Vascular endothelial growth factor (VEGF)-like protein from orf virus NZ2 binds to VEGFR2 and neuropilin-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 3071-3076.
284. Wu LW, Mayo LD, Dunbar JD, Kessler KM, Baerwald MR, Jaffe EA, Wang D, Warren RS, and Donner DB (2000a) Utilization of distinct signaling pathways by receptors for vascular endothelial cell growth factor and other mitogens in the induction of endothelial cell proliferation 5. *J Biol Chem*, **275**, 5096-5103.
285. Wu LW, Mayo LD, Dunbar JD, Kessler KM, Ozes ON, Warren RS, and Donner DB (2000b) VRAP is an adaptor protein that binds KDR, a receptor for vascular endothelial cell growth factor 2. *J Biol Chem*, **275**, 6059-6062.
286. Xia P, Aiello LP, Ishii H, Jiang ZY, Park DJ, Robinson GS, Takagi H, Newsome WP, Jirousek MR, and King GL (1996) Characterization of vascular endothelial growth factor's effect on the activation of protein

- kinase C, its isoforms, and endothelial cell growth. *J Clin Invest*, **98**, 2018-2026.
287. Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, and Holash J (2000) Vascular-specific growth factors and blood vessel formation
5. *Nature*, **407**, 242-248.
288. Zachary I and Gliki G (2001) Signaling transduction mechanisms mediating biological actions of the vascular endothelial growth factor family. *Cardiovasc Res*, **49**, 568-581.
289. Zech B, Kohl R, von KA, and Brune B (2003) Nitric oxide donors inhibit formation of the Apaf-1/caspase-9 apoptosome and activation of caspases. *Biochem J*, **371**, 1055-1064.
290. Zech B, Wilm M, van ER, and Brune B (1999) Mass spectrometric analysis of nitric oxide-modified caspase-3. *J Biol Chem*, **274**, 20931-20936.
291. Zembowicz A, Tang JL, and Wu KK (1995) Transcriptional induction of endothelial nitric oxide synthase type III by lysophosphatidylcholine 3. *J Biol Chem*, **270**, 17006-17010.
292. Zeng H, Sanyal S, and Mukhopadhyay D (2001) Tyrosine residues 951 and 1059 of vascular endothelial growth factor receptor-2 (KDR) are essential for vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor-induced endothelium migration and proliferation, respectively. *J Biol Chem*, **276**, 32714-32719.
293. Zheng J, Bird IM, Melsaether AN, and Magness RR (1999) Activation of the mitogen-activated protein kinase cascade is necessary but not sufficient for basic fibroblast growth factor- and epidermal growth factor-stimulated expression of endothelial nitric oxide synthase in ovine fetoplacental artery endothelial cells
12. *Endocrinology*, **140**, 1399-1407.
294. Zimmermann K, Opitz N, Dedio J, Renne C, Muller-Esterl W, and Oess S (2002) NOSTRIN: a protein modulating nitric oxide release and subcellular distribution of endothelial nitric oxide synthase
1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 17167-17172.
295. Zimmermann RC, Xiao E, Husami N, Sauer MV, Lobo R, Kitajewski J, and Ferin M (2001) Short-term administration of antivasular endothelial growth factor antibody in the late follicular phase delays follicular

development in the rhesus monkey. *J Clin Endocrinol Metab*, **86**, 768-772.

Annexe I :
Article publié

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*

Received for publication, September 25, 2006, and in revised form, January 10, 2007. Published, JBC Papers in Press, February 15, 2007, DOI 10.1074/jbc.M609048200

Mariela Garcia Blanes¹, Malika Oubaha, Yohann Rautureau, and Jean-Philippe Gratton²

From the Laboratory of Endothelial Cell Biology, Institut de Recherches Cliniques de Montréal (IRCM), Université de Montréal, Montreal, Quebec H2W 1R7, Canada

Vascular endothelial growth factor (VEGF)-stimulated nitric oxide (NO) release from endothelial cells is mediated through the activation of VEGF receptor-2 (VEGFR-2). Herein, we have attempted to determine which autophosphorylated tyrosine residue on the VEGFR-2 is essential for VEGF-mediated endothelial nitric-oxide synthase (eNOS) activation and NO production from endothelial cells. Tyrosine residues 801, 1175, and 1214 of the VEGFR-2 were mutated to phenylalanine, and the mutated receptors were analyzed for their ability to stimulate NO production. We show, both in COS-7 cells cotransfected with the VEGFR-2 mutants and eNOS and in bovine aortic endothelial cells, that the Y801F-VEGFR-2 mutant is unable to stimulate NO synthesis and eNOS activation in contrast to the wild type, Y1175F-VEGFR-2, and Y1214F-VEGFR-2. However, the Y801F mutant retains the capacity to activate phospholipase C- γ in contrast to the Y1175F-VEGFR-2. Interestingly, the Y801F-VEGFR-2, in contrast to the wild type receptor, does not fully activate phosphatidylinositol 3-kinase or recruit the p85 subunit upon receptor activation. This results in a complete incapacity of the Y801F-VEGFR-2 to stimulate Akt activation and eNOS phosphorylation on serine 1179 in endothelial cells. In addition, constitutive activation of Akt or a phosphomimetic mutant of eNOS (S1179D) fully rescues the inability of the Y801F-VEGFR-2 to induce NO release. Finally, we generated an antibody that specifically recognizes the phosphorylated form of tyrosine 801 of the VEGFR-2 and demonstrate that this residue is actively phosphorylated in response to VEGF stimulation of endothelial cells. We thus conclude that autophosphorylation of tyrosine residue 801 of the VEGFR-2 is essential for VEGF-stimulated NO production from endothelial cells, and this is primarily accomplished via the activation of phosphatidylinositol 3-kinase and Akt signaling to eNOS.

Vascular endothelial growth factor receptor-2 (VEGFR³-2/Flk-1/KDR) is mainly responsible for the biological effects of VEGF in endothelial cells (1–4). Other transmembrane tyrosine kinase receptors, such as VEGFR-1 and -3, have also been shown to transduce the intracellular signals of VEGF (1, 5). The role of VEGFR-1 appears, however, to be mostly evident during embryonic angiogenesis, and VEGFR-3 signaling is restricted to lymphatic endothelial cells (5). Gene inactivation studies in mice have revealed an essential role for VEGFR-2 in vasculogenesis, since VEGFR-2^{-/-} animals die between embryonic day 8.5 and 9.5 due to a lack of vascular development similar to the phenotype observed in VEGF null mice (6, 7).

Signal transduction of the VEGFR-2 in endothelial cells leads to the endothelial responses that are characteristic of proangiogenic factors. VEGF-dependent DNA synthesis and proliferation of endothelial cells are strongly dependent on the activation of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 by VEGFR-2 (2, 8–10). Endothelial cell migration stimulated by VEGF involves both the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) and the p38 mitogen-activated protein kinase pathways (11–14). Activation of endothelial cell survival or antiapoptotic signaling by VEGF participates in the formation of new blood vessels and in the maintenance of their integrity; VEGF inhibits endothelial cell apoptosis via the PI3K/Akt pathway (15).

VEGF-stimulated nitric oxide (NO) release from endothelial cells also depends on the activation of VEGFR-2. NO is an important endothelial mediator that intervenes at most stages of VEGF-initiated cellular responses: proliferation, survival, migration, and increase in vascular permeability (11, 16–20). Moreover, eNOS-deficient mice exhibit reduced responses to VEGF both in terms of new blood vessel formation and increase in vascular permeability (21). VEGF stimulation of endothelial cells activates at least two signaling pathways that converge toward NO production. VEGF stimulates intracellular calcium mobilization in endothelial cells through the activation of phospholipase C- γ (PLC- γ) (22). Simultaneously, the PI3K-dependent activation of Akt by VEGFR-2 is responsible for eNOS phosphorylation on serine 1179 (1177 in human eNOS), which

* This work was supported by Terry Fox Foundation Grant 15139 (to J. P. G.) through the National Cancer Institute of Canada. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¹ Recipient of a Masters studentship from the CIHR.

² Holder of a Tier II Canada Research Chair. To whom correspondence should be addressed: Institut de Recherches Cliniques de Montréal, 110 des Pins Ave. West, Montreal, Quebec H2W 1R7, Canada. Tel.: 514-987-5610; Fax: 514-987-5676; E-mail: [REDACTED]

³ The abbreviations used are: VEGFR, vascular endothelial growth factor receptor; BAEC, bovine aortic endothelial cell(s); eNOS, endothelial nitric-oxide synthase; HA, hemagglutinin; myr-Akt, myristoylated-Akt; NO, nitric oxide; PI3K, phosphatidylinositol 3-kinase; PLC- γ , phospholipase C- γ ; VEGF, vascular endothelial growth factor; WT, wild type.

leads to increased eNOS activity and NO release (23, 24). Interestingly, the relative contribution of each pathway in VEGFR-2-stimulated NO release has not been directly investigated.

As for other receptor tyrosine kinases, phosphorylation of several tyrosine residues in the intracellular domain of the VEGFR-2 has been shown to be essential for the recruitment and activation of Src homology 2-bearing proteins implicated in intracellular signal transmission. Many of these ligand-induced autophosphorylated tyrosines have been directly identified through systematic phosphomapping of activated receptors or have been proposed to be phosphorylated based on their essential role in the activation of the defined signaling pathway by VEGF. Some of the proposed phosphorylated tyrosines residues are 801, 951, 996, 1008, 1054, 1059, 1175, and 1214 (8, 25–28). Although some slight discrepancies are present in the literature on the implication of certain residues in VEGFR-2 signaling, a consensus emerged on the role of some. Tyrosine residues 1054 and 1059 in the kinase insert domain seem to be needed for maximal intrinsic VEGFR-2 kinase activity (29, 30). Other phosphorylated residues have been linked to the association and activation of Src homology 2-containing adaptors, as is the case for Tyr⁹⁵¹ and the VRAP/TSad adaptor and Tyr¹¹⁷⁵ for Shb and Sck adaptors (25, 31–34). Phosphorylation of Tyr¹¹⁷⁵ has been linked to PLC- γ activation, cell proliferation, and more recently to vasculogenesis in mice (8, 27, 35, 36). Phosphorylation of Tyr¹²¹⁴ is needed for p38 mitogen-activated protein kinase-dependent actin remodeling and cellular migration (37). Finally, phosphorylation of Tyr⁸⁰¹ has been linked to PI3K association to the VEGFR-2 and its activation (28).

Herein, we have attempted to determine which phosphorylated tyrosine on the VEGFR-2 is essential for VEGF-mediated NO production from endothelial cells. Since eNOS activation is the result of at least two converging intracellular signals (PLC- γ and PI3K), we also investigated which of these pathways, upstream of eNOS, are essential for its activation. Our results show, both in a reconstituted COS-7 cell system and in bovine aortic endothelial cells (BAEC), that NO synthesis induced by the mutant Y1175F and Y1214F-VEGFR-2 is similar to that of the wild type receptor. In contrast, mutation of tyrosine 801 results in a complete inhibition of VEGFR-2-induced NO synthesis. Furthermore, the Y801F-VEGFR-2, in contrast to the wild type receptor, cannot activate the PI3K/Akt signaling pathway and induce eNOS phosphorylation on serine 1179. However, the Y801F mutant can still activate PLC- γ in contrast to the Y1175F-VEGFR-2. Finally, we demonstrate, using a phosphospecific antibody, that tyrosine 801 of the VEGFR-2 is actively phosphorylated in response to VEGF stimulation of endothelial cells. We thus conclude that autophosphorylation of the tyrosine residue 801 of the VEGFR-2 is essential for VEGF-stimulated NO production from endothelial cells, and this is primarily accomplished via the activation of PI3K and Akt signaling to eNOS.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Cell Culture—COS-7 cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal bovine serum (Invitrogen), 2.0 mM L-glutamine, 100 units/ml penicillin, and 100 μ g/ml streptomycin. Bovine aortic endothelial cells

(BAEC) were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal bovine serum (HyClone), 2.0 mM L-glutamine, 100 units/ml penicillin, and 100 μ g/ml streptomycin. Endothelial cells were used at passage 7 or 8. For VEGF stimulations, cells were starved, 6 h or overnight, in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 2.0 mM L-glutamine, 100 units/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.

Plasmids and Transfections—Single point mutations resulting in codon change from tyrosine to phenylalanine for residues Tyr⁸⁰¹, Tyr¹¹⁷⁵, and Tyr¹²¹⁴ and lysine to arginine for residue Lys⁸⁶⁸ were achieved using the QuikChange site-directed mutagenesis kit (Stratagene) on human VEGFR-2 (in pRK7). The mutagenic primers (Invitrogen) used were 5'-GGAAGT-GAAGACAGGCTTCTTGCCATCGTCATGG-3' (Y801F), 5'-GCAGGATGGCAAAGACTTCATTGTTCTTCCGATATCA-3' (Y1175F), 5'-GACCCCAAATTCATTTTGACAACTGAGGAATCAGTC-3' (Y1214F), and 5'-AGGACAGTAGCAGTCAGAATGTTGAAAGAAGGAGC-3' (K868R). All mutations were verified by DNA sequencing. Plasmid cDNA coding for human VEGFR-2, bovine eNOS, HA-Akt, and HA-myr-Akt were previously described (24, 38, 39). Mutant bovine eNOS plasmids (S1179A and S1179D) and p85-FLAG were generously provided by Dr. William C. Sessa (Yale University School of Medicine, New Haven, CT) and Dr. Charalabos Pothoulakis (Harvard Medical School, Boston, MA), respectively. For transfections, COS-7 and BAEC were cultured in either 6-well plates or in 60- or 100-mm dishes and were transfected at 80% confluence using Lipofectamine 2000 according to the manufacturer's protocol (Invitrogen).

Nitric Oxide Release—To measure the amount of NO released from cells, samples of culture medium were taken and processed for the measurement of nitrite (NO₂⁻), the stable breakdown product of NO in aqueous solution, by NO-specific chemiluminescence using a NO analyzer (Ionics Instruments) as described previously (40). For the measurement of accumulated NO production in transfected COS-7 and BAEC, cell medium was taken 48 h post-transfection and first subjected to ethanol precipitation of proteins. VEGF-stimulated NO production from BAEC was performed 48 h post-transfection on serum-starved cells. The medium was processed for the measurement of nitrite following a 30-min VEGF (40 ng/ml) stimulation.

Antibodies—Mouse anti-VEGFR-2 antibody was from Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA); rabbit anti-phospho-Ser¹¹⁷⁷-eNOS, anti-Akt, anti-phospho-Ser⁴⁷³-Akt, anti-PLC- γ 1, and anti-phospho-Tyr⁷⁸³-PLC- γ 1 and mouse anti-HA tag (6E2) antibodies were purchased from Cell Signaling; mouse anti-eNOS antibody was from BD Transduction Laboratories; rabbit anti-HA antibody was from Rockland; mouse anti-phosphotyrosine (4G10) antibody was from Upstate Biotechnology; and mouse anti-FLAG tag (M2) antibody was from Sigma.

The rabbit anti-phospho-Tyr⁸⁰¹-VEGFR-2 antibody was raised against a keyhole limpet hemocyanin-conjugated syn-

Tyrosine 801 Signaling of the VEGFR-2

thetic phosphopeptide (GpYLSIVMDPDELPLDEC, where pY represents phosphotyrosine; Sigma), and the obtained serum was affinity-purified using the SulfoLink kit (Pierce). The rabbit antiserum was first passed through a column linked to the corresponding unphosphorylated peptide (GYLSIVMDPDELPLDEC), and the flow-through of this step passed through a second column linked to the above phosphorylated peptide. Antibody specificity was verified following the purification steps of the serum using dot blot against the phosphorylated and unphosphorylated peptides.

Immunoprecipitations and Immunoblotting—Cells were solubilized with a lysis buffer containing 1% Nonidet P-40, 50 mM Tris-HCl, 125 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 0.1% SDS, 0.1% deoxycholic acid, 20 mM sodium fluoride, 1 mM sodium pyrophosphate, 1 mM sodium orthovanadate, and protease inhibitor mixture (Roche Applied Science). Soluble proteins were quantified by DC protein assay (Bio-Rad), and equal protein amounts were boiled in SDS sample buffer, separated by SDS-PAGE, and transferred onto a nitrocellulose membrane (Hybond ECL; GE Healthcare). For immunoprecipitations, soluble proteins were incubated with the primary antibody (2 μ g) at 4 °C for 2 h. Protein A-Sepharose (Sigma) (50 μ l of a 50% slurry) was then added and incubated for an additional 1 h. The immune complexes were precipitated by centrifugation, washed three times with lysis buffer, boiled in SDS sample buffer, separated by SDS-PAGE, and transferred to nitrocellulose membranes. For Western blotting, antibody detection was performed by a chemiluminescence-based detection system (ECL; GE Healthcare) or by a LI-COR Odyssey infrared imaging system (LI-COR Biosciences) using Alexa 680- or Alexa 800-labeled secondary antibodies (Invitrogen).

Immunofluorescence—BAEC were cultured on 0.1% gelatin-coated coverslips. Serum-starved cells were stimulated for 5 min with VEGF (20 ng/ml). Cells were fixed for 20 min in phosphate-buffered saline containing 3.5% paraformaldehyde. Cells were rinsed with phosphate-buffered saline and permeabilized with 0.1% Triton in phosphate-buffered saline for 5 min. Fixed cells were blocked with 1% bovine serum albumin and then incubated for 1 h with the primary antibody (4.4 μ g/ml) in 0.1% bovine serum albumin in PBS (rabbit anti-PO₄⁻-Tyr⁸⁰¹-VEGFR-2). Bound primary antibody was visualized following 1 h of incubation using Alexa Fluor 568-labeled goat anti-rabbit antibody (1:500) (Molecular Probes). Mounted coverslips were observed using a Zeiss LSM 510 imaging system.

Statistical Analysis—Data were analyzed by analysis of variance, followed by Bonferroni's *post hoc* test. A *p* value less than 0.05 was considered as statistically significant.

RESULTS

VEGFR-2 Tyrosine Mutants—VEGF-stimulated NO release from endothelial cells requires the autophosphorylation on tyrosine residues of the VEGFR-2. In order to identify the phosphorylated tyrosine residues of the VEGFR-2, essential for the activation of intracellular signaling pathways leading to eNOS activation and NO production, we generated punctual substitutions on the receptor. Tyrosine residues 801, 1175, and 1214, proposed in the literature as being potential autophosphorylation sites of the VEGFR-2 receptor, were changed to phenylala-

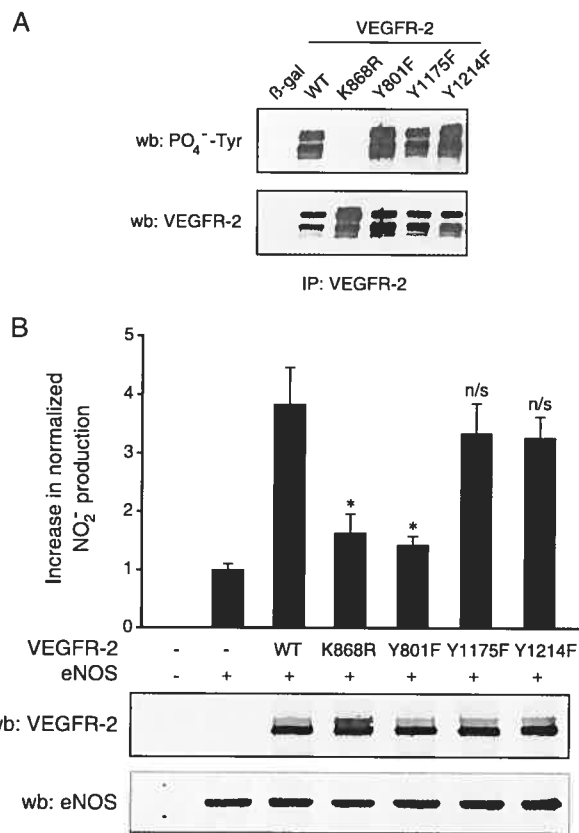


FIGURE 1. Stimulation of NO release by the VEGFR-2 mutants. A, COS-7 cells were transfected with the expression vectors coding for β -galactosidase (β -gal) as a control and the WT and mutant VEGFR-2 as indicated. 48 h post-transfection, cells were lysed, and equal amounts of soluble protein were subjected to VEGFR-2 immunoprecipitation (IP). The total tyrosine phosphorylation levels of these receptors were detected by Western blotting (wb), using the anti-PO₄⁻-Tyr antibody, and the same membrane was then stripped and reprobed with anti-VEGFR-2 antibody to confirm protein levels. B, COS-7 cells were transfected with eNOS in the absence or in presence of the WT or mutant VEGFR-2 as indicated. Following a 24-h incubation, samples of culture medium were subjected to NO quantification as described under "Experimental Procedures." Expression levels of the transfected proteins were monitored by Western blotting using anti-VEGFR-2 and anti-eNOS antibodies. To allow statistical analysis and for comparison of multiple experiments, the relative increase in nitrite compared with eNOS alone is expressed. These results represent the mean of four experiments performed in triplicates. *, *p* < 0.01 and not significant (n/s) versus WT VEGFR-2-expressing cells.

nine (8, 27, 28, 35–37, 41). In addition, a kinase-inactive receptor that has a lysine to arginine mutation at residue 868 in the ATP binding site of the tyrosine kinase domain was generated as a negative control. To confirm that the substitution did not alter the intrinsic kinase ability of the receptor, the level of total tyrosine phosphorylation of mutants versus wild type (WT) receptors was monitored. Cell lysates from COS-7 cells expressing either the wild type or mutant receptors (K868R, Y801F, Y1175F, Y1214F) were immunoprecipitated using an anti-VEGFR-2 antibody, and levels of tyrosine phosphorylation were evaluated by Western blot with a pan-anti-phosphotyrosine antibody (4G10). All VEGFR-2 constructs were expressed, and autophosphorylation on tyrosine was detected for all of the tyrosine substitution mutants and wild type receptors in contrast to the tyrosine kinase-dead receptor K868R (Fig. 1A). This indicates that the overall tyrosine kinase activity of the tyrosine-mutated receptor was not affected by the mutations.

Tyrosine 801 of the VEGFR-2 Is Essential for Stimulation of NO Release—We then sought to identify the tyrosine residues of the VEGFR-2 whose phosphorylation is essential for the activation of eNOS. First, we used a transfected COS-7 cells system to compare summarily the capacity of the various VEGFR-2 mutants (K868R, Y801F, Y1175F, or Y1214F) to stimulate NO release. Following a 24-h incubation, samples of culture medium from COS-7 cells, transfected with either eNOS alone or eNOS in combination with the wild type or the mutated receptors, were quantified for the amounts of accumulated NO_2^- . Nitrites are the major nitric oxide oxidation by-product in aqueous solution (42). First, higher levels of NO_2^- were detected in the medium of COS-7 cells expressing eNOS than in the medium of untransfected cells (Fig. 1B, columns 1 and 2). Moreover, the cotransfection of wild type VEGFR-2 receptor with eNOS induced a significant augmentation in the production of NO compared with the production of cells expressing the enzyme alone (Fig. 1B, columns 2 and 3). In contrast, expression of the kinase-inactive receptor (K868R) did not produce this effect (Fig. 1B, column 4). These results are consistent with the fact that the VEGFR-2 receptor has the capacity of inducing NO production (43) and show that this COS-7 heterologous expression system is suitable for monitoring of eNOS activation by the VEGFR-2. Interestingly, mutation of the VEGFR-2 tyrosine 801 to phenylalanine resulted in decreased NO production compared with the wild type VEGFR-2. The extent of NO synthesis induced by the Y801F mutant was similar to the NO released from cells transfected with the kinase-inactive receptor K868R or eNOS alone, meaning that the Y801F mutation totally abolished the VEGFR-2-stimulated NO production. In contrast, mutation of tyrosines 1175 and 1214 did not significantly affect the amounts of NO released by the transfected cells when compared with the amounts released from the wild type VEGFR-2-transfected cells. Thus, these results suggest an essential role for tyrosine 801 of the VEGFR-2 in the stimulation of eNOS-dependent NO release. The slight, but not significant, reduction in NO release by the 1175 and 1214 mutants compared with wild type receptor may point toward a secondary role for these residues in eNOS signaling, in sharp contrast to Tyr⁸⁰¹, which is shown to be essential. In addition, we cotransfected with eNOS a Y1059F-VEGFR-2 mutant that has been previously shown to have altered overall tyrosine kinase activity (results not shown) (29, 30), and the amounts of NO released from these transfected cells were similar to the kinase-dead K868R and Y801F mutants (results not shown).

To confirm the involvement of Tyr⁸⁰¹ in signal transduction leading to eNOS activation, we characterized the impact of this mutation on VEGF-induced NO generation in an endothelial cell model. BAEC were transiently transfected with either an empty vector (pcDNA3.1), wild type, or Y801F or Y1175F mutated VEGFR-2. Transfected BAEC were serum-starved for 6 h and stimulated for 30 min with VEGF (40 ng/ml), and medium samples were collected for the quantification of the amount of nitrite present. Fig. 2 shows the VEGF-stimulated increase in NO levels from the transfected BAEC. As expected, stimulation of the endogenous VEGFR-2 receptor in untransfected cells (mock) resulted in increased basal NO production.

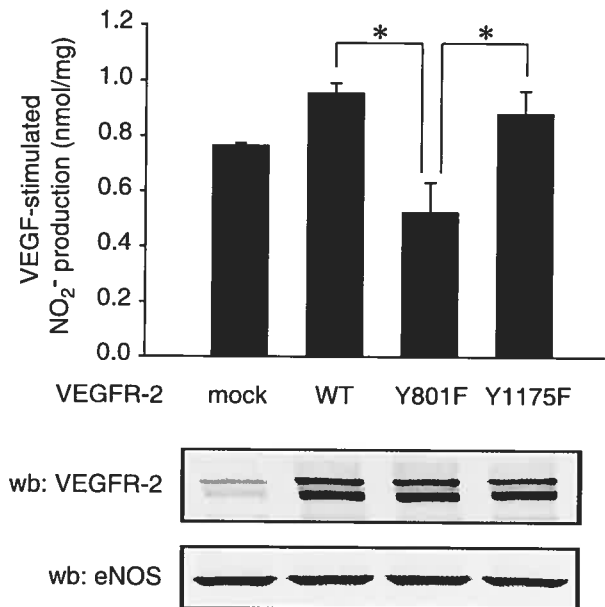


FIGURE 2. Implication of tyrosine 801 of the VEGFR-2 in VEGF-stimulated NO production from endothelial cells. BAEC were transfected with either empty vector (control), WT VEGFR-2, or Y801F or Y1175F mutants as indicated. Transfected BAEC were serum-starved for 6 h, and duplicates were stimulated or not with VEGF (40 ng/ml) for 30 min. Samples of culture medium were taken for nitrite quantification as described under "Experimental Procedures." The increase in NO_2^- production was calculated by subtracting the amounts of NO produced by the non-VEGF-stimulated cells from the amounts produced by VEGF-stimulated BAEC in each duplicate. These results represent the mean of three experiments. *, $p < 0.05$. The bottom panels show a representative VEGFR-2 and eNOS protein expression levels in transfected BAEC detected by Western blotting (wb).

Transfection of the WT VEGFR-2 induced a marked increase in VEGFR-2 protein levels, as revealed by Western blotting, and no change was observed on eNOS protein levels (Fig. 2, bottom). The overexpression of the VEGFR-2 resulted in a slight increase, following VEGF stimulation, in the amounts of nitrite accumulated in the culture medium compared with untransfected cells (Fig. 2). Similarly, the mutation of tyrosine 1175 did not affect the VEGF-stimulated increase in NO production when compared with cells overexpressing the wild type receptor (Fig. 2, columns 2 and 4). In contrast, VEGF stimulation of BAEC overexpressing the mutant Y801F receptor led to a significant decrease in NO production compared with cells overexpressing the wild type and Y1175F receptors (Fig. 2, column 3). Interestingly, NO released from cells expressing the Y801F mutant was less than from cells only expressing endogenous VEGFR-2 (Fig. 2, compare columns 1 and 3). Based on this result, it seems that the mutant Y801F receptor possesses the ability to act as a dominant negative on the endogenous VEGFR-2 receptor and thus reduce eNOS activation by VEGF. Overall, these results allow us to confirm the tyrosine 801 residue of the VEGFR-2 as being essential for VEGF-dependent eNOS activation and NO synthesis from endothelial cells.

Phosphorylation of PLC- γ by the VEGFR-2 Mutants—As previously mentioned, the activation of eNOS by the VEGFR-2 is regulated mainly by two intracellular signaling cascades: the PI3K/Akt pathway and the increase in intracellular free calcium initiated by the activation of PLC- γ . We first analyzed the activation of PLC- γ by the VEGFR-2 by monitoring the phospho-

Tyrosine 801 Signaling of the VEGFR-2

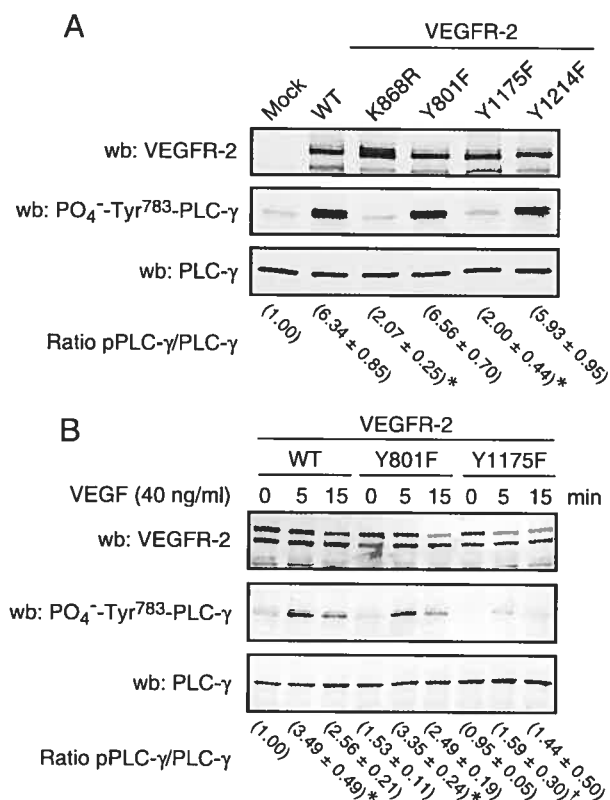


FIGURE 3. Activation of PLC- γ requires tyrosine 1175 of the VEGFR-2 but not tyrosine 801. *A*, COS-7 cells were transfected with either empty vector (*mock*), WT, or VEGFR-2 mutants as indicated. 48 h following transfection, serum-starved cells were stimulated with VEGF (40 ng/ml; 10 min) and lysed. Cell lysates were separated by SDS-PAGE, and the levels of PLC- γ tyrosine phosphorylation was analyzed by Western blot (*wb*) with an antibody recognizing the phosphorylated form of PLC- γ at tyrosine 783 (PO₄⁻-Tyr⁷⁸³-PLC- γ). The same membrane was stripped and reprobed with anti-VEGFR-2 and anti-PLC- γ antibodies. *, $p < 0.01$ versus WT VEGFR-2-expressing cells. *B*, BAEC were transfected with expression vectors coding for the WT or mutant VEGFR-2, as indicated. 48 h following transfection, serum-starved BAEC were stimulated or not with VEGF (40 ng/ml; 5 or 15 min) and lysed, and cell lysates were treated as in *A*. *, $p < 0.001$ versus nonstimulated WT VEGFR-2-expressing cells. †, $p < 0.01$ versus 5-min-stimulated WT VEGFR-2-expressing cells. These results represent the mean of four and three experiments, respectively.

rylation level of PLC- γ by Western blotting COS-7 cell lysates expressing the wild type or mutant Y801F, Y1175F, or Y1214F receptors. As expected, expression of a wild type VEGFR-2 receptor in COS-7 cells results in endogenous PLC- γ phosphorylation (Fig. 3*A*, *middle*). In contrast, the expression of the kinase-inactive receptor K868R did not induce PLC- γ phosphorylation. Expression of the mutant Y801F and Y1214F receptors increased PLC- γ tyrosine phosphorylation to levels similar to those induced by the wild type VEGFR-2. Conversely, the Y1175F mutation prevented the VEGFR-2-dependent PLC- γ phosphorylation, since COS-7 cells expressing this mutant displayed levels of PLC- γ phosphorylation similar to those induced by the K868R inactive kinase mutant and that were significantly different from the wild type receptor. These results were confirmed by the assessment of the VEGFR-2-dependent phosphorylation of PLC- γ in endothelial cells. BAEC overexpressing the WT VEGFR-2 receptor or the mutants Y801F and Y1175F were stimulated with VEGF (40 ng/ml; 5–15 min), and PLC- γ activation was monitored via the levels of tyrosine 783 phosphorylation. Fig. 3*B* shows that VEGF stimulation

of transfected BAEC, overexpressing the wild type VEGFR-2 receptor, resulted in a significant increase in PLC- γ phosphorylation. As seen above for the transfected COS-7 cells (Fig. 3*A*), the Y801F mutant was still able to mediate a significant VEGF-dependent increase in PLC- γ phosphorylation at 5 and 15 min of stimulation similarly to the increase induced by the wild type receptor. In contrast, similar increases in the phosphorylation of PLC- γ in response to VEGF stimulation were not observed in BAEC overexpressing the Y1175F-VEGFR-2. The residual PLC- γ phosphorylation in these Y1175F-VEGFR-2-transfected BAEC comes from the endogenous wild type VEGFR-2, since this phosphorylation level of PLC- γ is identical to the levels observed in VEGF-stimulated control untransfected BAEC (not shown). These results confirm the previously published data demonstrating the essential role of tyrosine 1175 phosphorylation in the activation of PLC- γ by VEGF (8, 27, 35). In addition, our results also demonstrate that phosphorylation on tyrosine 801 of the VEGFR-2 is dispensable for the activating phosphorylation of PLC- γ .

Tyrosine 801 Is a Mediator for VEGFR-2-stimulated PI3K, Akt, and eNOS Phosphorylation—First, we monitored if the Y801F mutant could induce tyrosine phosphorylation of the regulatory subunit of PI3K, p85. COS-7 cells were cotransfected with FLAG-tagged p85 in the absence or in presence of WT or Y801F-VEGFR-2. Cell lysates were immunoprecipitated for the FLAG epitope, and tyrosine phosphorylation of p85 was monitored by Western blotting. Fig. 4*A* shows that expression of the WT VEGFR-2 induced a marked increase in the tyrosine phosphorylation levels of p85 when compared with cells expressing FLAG-p85 alone. In contrast, the Y801F mutant only induced 40% of the phosphorylation of p85 when compared with the WT VEGFR-2 ($p < 0.05$), indicating that tyrosine 801 is necessary for the full activation of PI3K by the VEGFR-2. We also monitored the phosphorylation-dependent association between p85 and the VEGFR-2. FLAG-p85 was thus immunoprecipitated from lysates of COS-7 cells expressing either the WT, Y801F, or K868R-VEGFR-2. Fig. 4*B* shows that the WT VEGFR-2 was present in the FLAG immunoprecipitate only if FLAG-p85 was cotransfected with the receptor, indicating a specific association between the two proteins (Fig. 4*B*, *lanes 1* and *2*). Interestingly, when compared with the WT receptor, the Y801F-VEGFR-2 displayed a significantly reduced association with p85 (Fig. 4*B*, *lanes 2* and *3*). As expected, no association between the kinase-inactive receptor, K868R-VEGFR-2, and p85 was observed. Overall, these results are in agreement with the previously proposed participation of tyrosine 801 phosphorylation (799 in mouse) in the activation and docking of p85 to the VEGFR-2 (28) but suggest, however, that other tyrosine residues may also partially participate in the full activation of PI3K by the VEGFR-2.

The VEGF-dependent activation of Akt was then monitored in BAEC. As above, the WT and Y801F-VEGFR-2 were overexpressed in BAEC, and the activation of Akt, following VEGF stimulation, was monitored via serine 473 phosphorylation (Fig. 5*A*). As expected, VEGF stimulation of the endogenous VEGFR-2 receptor in untransfected cells resulted in Akt phosphorylation. This phosphorylation was significantly increased in BAEC overexpressing the wild type VEGFR-2 (Fig. 5*A*).

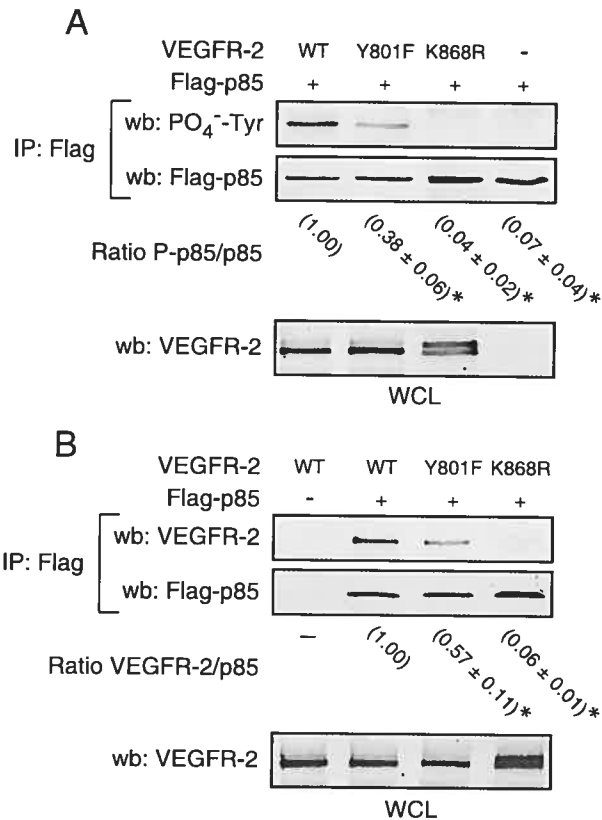


FIGURE 4. Tyrosine 801 of the VEGFR-2 is required for maximal PI3K phosphorylation and recruitment. COS-7 cells were transfected with the indicated VEGFR-2 expression vectors in combination with FLAG-p85. 48 h following transfection, serum-starved cells were lysed and subjected to FLAG immunoprecipitation (IP). *A*, the levels of p85 phosphorylation were analyzed by Western blot using the anti-PO₄⁻-Tyr antibody. *, $p < 0.001$ versus WT VEGFR-2/FLAG-p85-expressing cells. In *B*, the amounts of VEGFR-2 present in the FLAG immunoprecipitate were monitored by Western blotting using an anti-VEGFR-2 antibody. *, $p < 0.05$ versus WT VEGFR-2/FLAG-p85-expressing cells. Protein expression levels were verified by Western blot (wb) with the anti-FLAG antibody on the immunoprecipitate and the anti-VEGFR-2 antibody on whole cell lysates (WCL).

However, the levels of VEGF-dependent Akt phosphorylation in BAEC overexpressing the Y801F mutant were similar to those observed in cells expressing only the endogenous receptor and significantly reduced when compared with cells overexpressing the WT VEGFR-2. This shows that the Y801F mutant is incapable of inducing Akt phosphorylation, since its overexpression does not result in an increase in Akt activation over the levels observed in untransfected cells.

We then monitored, by Western blotting, the Akt phosphorylation site on eNOS, serine 1179, in response to VEGF stimulation of BAEC (Fig. 5*B*). BAEC, either transfected with an empty vector or overexpressing the wild type and the mutant Y801F-VEGFR-2, were stimulated with VEGF (40 ng/ml; 5 min). Stimulation of control untransfected BAEC resulted, as expected, in eNOS phosphorylation on Ser¹¹⁷⁹, and this phosphorylation was significantly increased in cells overexpressing the WT VEGFR-2. BAEC overexpressing the Y801F mutant displayed eNOS phosphorylation levels, in response to VEGF stimulation, that were identical to those seen in mock-transfected cells and significantly different from levels observed in WT VEGFR-2 overexpressing. We can thus conclude that, as

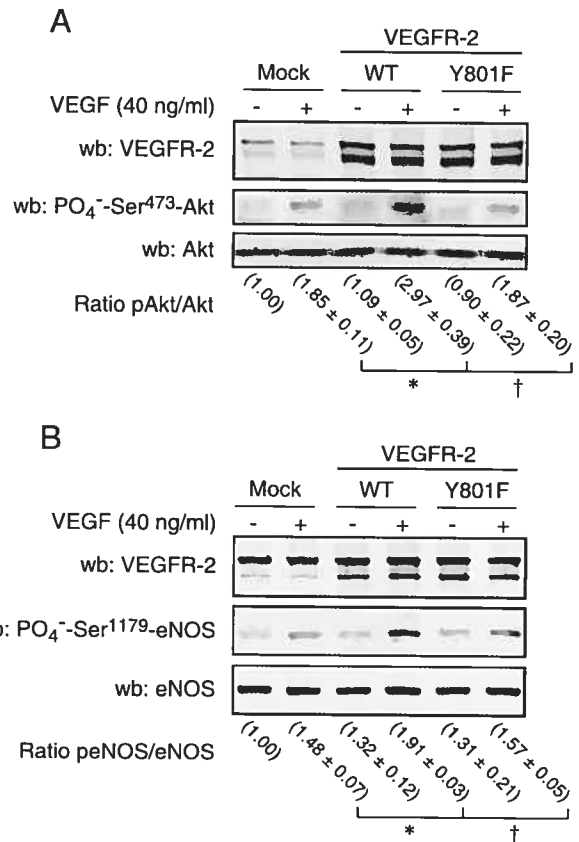


FIGURE 5. Tyrosine 801 of the VEGFR-2 is essential for Akt and eNOS phosphorylation. BAEC were transfected with either an empty vector (Mock), WT VEGFR-2, or Y801F expression plasmids. Serum-starved cells were stimulated or not with VEGF (40 ng/ml; 5 min) and lysed. Levels of Akt (*A*) and eNOS (*B*) phosphorylation were analyzed by Western blotting with antibodies recognizing the phosphorylated form of Akt at serine 473 or eNOS at serine 1179, respectively. Total protein levels were verified by Western blot with anti-VEGFR-2 antibody followed by anti-Akt or anti-eNOS antibody. *A*, *, $p < 0.05$; †, $p < 0.05$. *B*, *, $p < 0.01$; †, $p < 0.05$. These results represent the mean of three experiments.

for Akt phosphorylation, the Y801F mutant is incapable of inducing eNOS phosphorylation on Ser¹¹⁷⁹, since its overexpression does not result in increased eNOS phosphorylation to levels above those seen in untransfected cells expressing only the endogenous receptor. Phosphorylation of the VEGFR-2 on tyrosine 801 is essential for the VEGF-dependent phosphorylation/activation of Akt and its substrate eNOS in endothelial cells.

eNOS Phosphorylation by Akt Restores NO Release—To further demonstrate that the inability of the Y801F mutant to stimulate NO release is due to its incapacity to induce eNOS phosphorylation by Akt, we verified if artificial activation of 1) Akt and 2) eNOS would rescue the phenotype induced by the mutation of tyrosine 801 of the VEGFR-2. Fig. 6*A* shows that the cotransfection of eNOS and the wild type VEGFR-2 in COS-7 cells resulted in increased NO production compared with eNOS expressed alone (white columns). As previously shown, the Y801F-VEGFR-2 mutant did not increase eNOS-dependent NO production. Transfection of a constitutively activated form of Akt, myristoylated-Akt (myr-Akt), along with eNOS markedly increased NO production over eNOS expressed alone (Fig. 6*A*, black columns). Cotransfection of the

Tyrosine 801 Signaling of the VEGFR-2

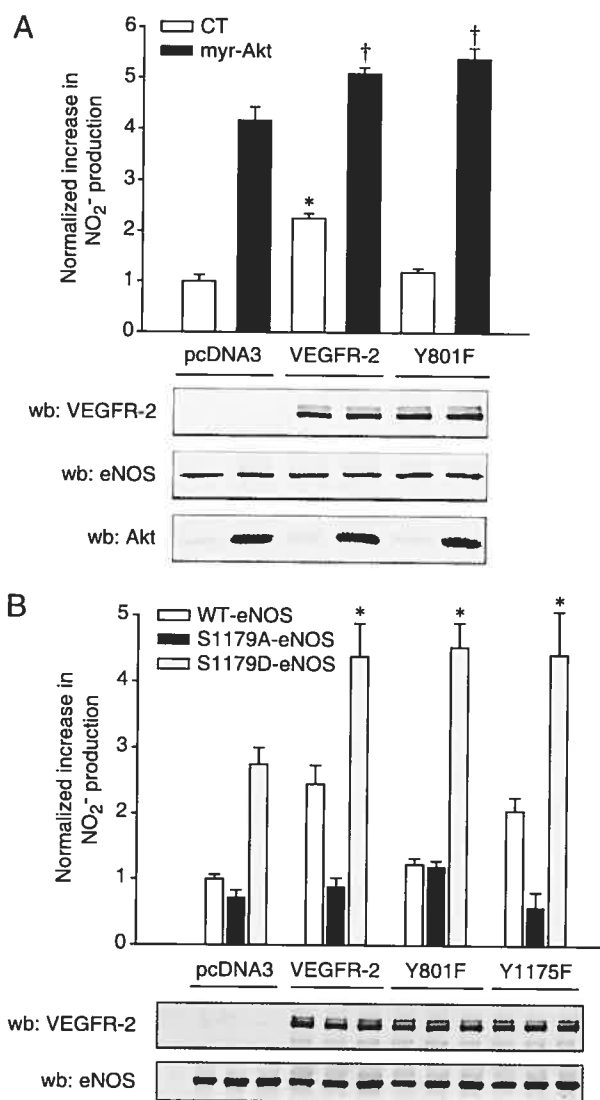


FIGURE 6. Constitutive phosphorylation of eNOS by Akt restores NO release stimulated by Y801F-VEGFR-2. A, COS-7 cells were transfected with either eNOS alone or in the presence of the various VEGFR-2 constructs (white bars). eNOS was also transfected with myr-Akt in the absence or presence of the indicated VEGFR-2 constructs (black bars). Samples of culture medium from the transfected cells were taken following a 24-h accumulation and were then subjected to nitrite quantification as described under "Experimental Procedures." Protein expression was verified by Western blot (wb) of cellular lysates using anti-VEGFR-2, anti-eNOS, and anti-Akt antibodies. For comparison between experiments, NO levels were normalized over the mean production of cells transfected with eNOS alone. *, $p < 0.05$ versus eNOS alone; †, $p < 0.05$ versus eNOS and myr-Akt-transfected cells. These results are the mean of at least three different experiments in triplicate. B, WT eNOS (white bars), S1179A eNOS (black bars), or S1179D eNOS (gray bars) were transfected in COS-7 cells either alone or in combination with the different VEGFR-2 constructs, as indicated. Following a 24-h accumulation, samples of culture medium were subjected to nitrite quantification, and protein expression levels were verified by Western blotting as in A. *, $p < 0.05$ versus S1179D eNOS-transfected cells. These results are the average of at least three experiments.

WT VEGFR-2 with eNOS and myr-Akt further increased NO release when compared with the levels of NO detected in eNOS- and myr-Akt-transfected cells. Interestingly, although the Y801F mutant did not potentiate NO release from eNOS-expressing cells, cotransfection of this mutant with eNOS and myr-Akt significantly increased NO production to levels seen

in cells expressing the wild type VEGFR-2, eNOS, and myr-Akt. This suggests that the VEGFR-2-independent activation of Akt signaling reestablishes the capacity of the Y801F mutant to induce eNOS activation.

In a similar manner, we investigated if constitutively activated eNOS, using an aspartate substitution at residue Ser¹¹⁷⁹, which acts as a phosphomimetic, could rescue the Y801F-VEGFR-2 NO release defect (23, 24, 44). Transfection of COS-7 cells with wild type eNOS and the wild type or mutant (Y801F or Y1175F) VEGFR-2 gave similar results as previously (Fig. 1B); the wild type and Y1175F-VEGFR-2 both induced an increase in NO production when compared with cells expressing eNOS alone, whereas the Y801F mutation abolished this VEGFR-2-stimulated increase in NO synthesis (Fig. 6B, white columns). However, when the different forms of the receptor (WT, Y801F, and Y1175F) were transfected in combination with the nonphosphorylatable S1179A mutant of eNOS, the increases in NO synthesis induced by the VEGFR-2 were not observable (Fig. 6B, black columns). As previously reported, elimination of the Akt phosphorylation site on eNOS has the ability to abolish the VEGFR-2-dependent stimulation of NO production (23, 24). Furthermore, when the constitutively active S1179D-eNOS was transfected alone into COS-7 cells, the amount of NO released was, as expected, greater than that released by WT eNOS (Fig. 6B, gray columns) (23, 24, 44). Moreover, cotransfection of S1179D-eNOS with the WT VEGFR-2 resulted in a further increase in NO release, indicating that signaling events other than serine 1179 phosphorylation on eNOS contribute to VEGFR-2-dependent NO release. Cotransfection of the Y1175F-VEGFR-2 with S1179D-eNOS yielded similar amounts of NO when compared with the WT VEGFR-2. Interestingly, the Y801F-VEGFR-2 was able to stimulate NO production from S1179D-eNOS to levels identical to those of the wild type receptor. This clearly suggests that restoration of the phosphorylation of eNOS on the Ser¹¹⁷⁹ Akt site allows for a complete rescue of the capacity of the Y801F-VEGFR-2 to stimulate NO release. This also confirms that the incapacity of the Y801F mutant to stimulate eNOS activation is solely due to its inability to induce eNOS phosphorylation on Ser¹¹⁷⁹.

Tyrosine 801 Is Actively Phosphorylated in Response to VEGF Stimulation—Finally, to demonstrate that tyrosine 801 of the VEGFR-2 is phosphorylated following activation of the receptor by VEGF and confirm that it plays a role in VEGF signaling, we have generated an antibody that recognizes the phosphorylated form of the receptor at tyrosine 801. Tyrosine residues 956, 1175, and 1214 of the VEGFR-2 have been directly identified as major autophosphorylation sites following VEGF stimulation (8, 25). Although tyrosine 801 has been proposed as a VEGFR-2 activation site for the PI3K signaling pathway (28) and now eNOS activation, direct demonstration of its phosphorylation has never been achieved. To verify the specificity of our antibody for the phosphorylation status of Tyr⁸⁰¹, we first performed dot blot analysis using the phosphorylated (GpYLSIVM-DPDELPLDEC) immunogenic peptides and nonphosphorylated (GYLSIVMDPDELPLDEC) version. The affinity-purified serum clearly recognized the phosphorylated version of the peptide with higher affinity than the nonphosphorylated version (Fig.

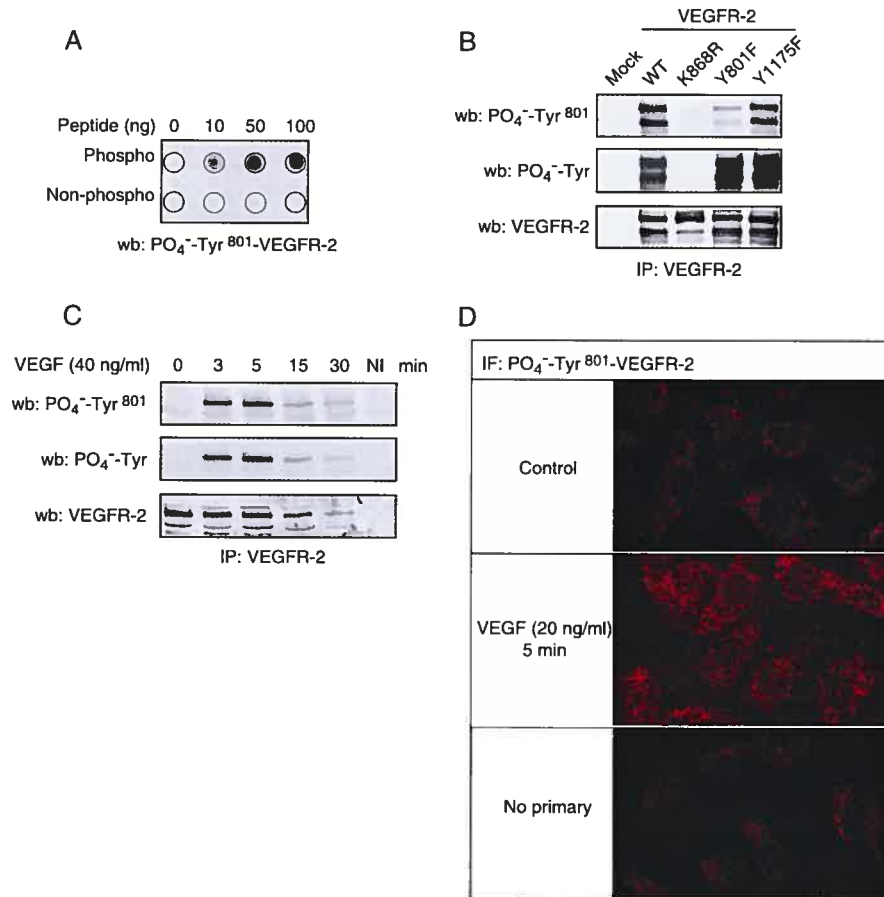


FIGURE 7. Tyrosine residue 801 of the VEGFR-2 is phosphorylated following VEGF stimulation. *A*, the purified tyrosine 801 phosphospecific antibody (1:1000 dilution; 0.2 μ g/ml) was used for dot blot analysis of increasing amounts (0–100 ng) of the phosphorylated immunogenic peptides and the nonphosphorylated version used for affinity purification of the serum. *B*, the tyrosine 801-phosphospecific antibody was used for the Western blotting of VEGFR-2 immunoprecipitated from COS-7 cell lysates transfected with either an empty vector, the WT VEGFR-2, or the mutant receptors (K868R, Y801F, or Y1175F). The membrane was subsequently stripped and reprobbed with the pan-anti- PO_4^- -Tyr antibody followed by the anti-VEGFR-2 antibody. *C*, serum-starved BAEC were stimulated with 40 ng/ml VEGF for 0, 3, 5, 15, and 30 min, and cell lysates were subjected to immunoprecipitation using anti-VEGFR-2 or nonimmune (NI) antibodies. Immunoprecipitates were then subjected to Western blot using the tyrosine 801-phosphospecific antibody followed by the pan-anti- PO_4^- -Tyr and anti-VEGFR-2 antibodies. *D*, BAEC were stimulated with 20 ng/ml VEGF for 0 (control) or 5 min, fixed, permeabilized, and incubated in the presence or absence of the tyrosine 801-phosphospecific antibody. Immuno-complexes were detected using a secondary antibody labeled with Alexa-568 and were visualized by confocal laser microscopy. These results are representative of three independent experiments.

7A). Next, we transfected COS-7 cells with the wild type and mutant VEGFR-2 receptors (K868R, Y801F, Y1175F). Cell lysates were immunoprecipitated for the VEGFR-2 and Western blotted with the tyrosine 801-phosphospecific antibody. The antibody specifically detected phosphorylation in the wild type and the mutant Y1175F-VEGFR-2 but failed to recognize the kinase-inactive receptor K868R and minimally detected the Y801F-VEGFR-2 (Fig. 7B). In addition, we controlled for the levels of total tyrosine phosphorylation using the pan-phosphotyrosine antibody (4G10) and found, as shown in Fig. 1A, that the overall phosphorylation of the mutant receptor Y801F was similar to that of the mutant Y1175F and wild type receptors (Fig. 7B). The minimal phosphorylation detected by this antibody in the Y801F mutant is possibly due to residual nonspecific detection of other highly phosphorylated tyrosine residues on overexpressed receptor. It is, however, clear that this anti-

body displays a marked specificity for the phosphorylated form of Tyr⁸⁰¹.

To demonstrate that this residue on the VEGFR-2 is phosphorylated in endothelial cells in response to VEGF stimulation, BAEC were stimulated with VEGF (40 ng/ml) for 0, 3, 5, 15, or 30 min, and the receptor was immunoprecipitated and subjected to a Western blot using the phosphospecific Tyr⁸⁰¹ antibody. Fig. 7C shows an increase in Tyr⁸⁰¹ phosphorylation in response to VEGF in endothelial cells that reached maximal phosphorylation at 5 min of stimulation (Fig. 7C, top). The kinetics of tyrosine 801 phosphorylation followed the overall autophosphorylation of the VEGFR-2 as revealed by reprobbed the membrane with the panphosphotyrosine antibody (4G10) (Fig. 7C, middle). As previously reported, VEGF stimulation of endothelial cells induced the down-regulation of the VEGFR-2, as revealed by reprobbed of the immunoprecipitate with an anti-VEGFR-2 antibody (Fig. 7C, bottom) (38). Finally, we wanted to determine if this antibody could detect Tyr⁸⁰¹ phosphorylation *in vivo* in endothelial cells. Thus, we performed immunofluorescence studies on VEGF-stimulated and fixed BAEC. Phosphorylation of Tyr⁸⁰¹ of the VEGFR-2 was visualized by confocal microscopy. Fig. 7D shows that, in control serum-starved BAEC, the cellular levels of Tyr⁸⁰¹ phosphorylation are low,

since the detected fluorescence is slightly above the levels seen in cells incubated with the secondary antibody alone. This is consistent with the results presented in Fig. 7C, where Tyr⁸⁰¹ and overall phosphorylation of the VEGFR-2 is undetectable in unstimulated cells. VEGF stimulation of BAEC for 5 min induced a marked increase in the fluorescence signal, revealing a punctate distribution of the signal. This intracellular phosphorylation of tyrosine 801 of the VEGFR-2 is in line with the recent reports of an important contribution of the intracellular endosomal compartment in VEGFR-2 signaling (45, 46). The Tyr⁸⁰¹ phosphorylation staining is very similar to Tyr¹¹⁷⁵ phosphorylation recently reported by Lampugnani *et al.* (46). This phosphospecific antibody allows us to clearly demonstrate that the tyrosine residue 801 of the VEGFR-2 is an important autophosphorylation site of this receptor following VEGF stimulation and, thus, can potentially participate in the VEGFR-2-in-

Tyrosine 801 Signaling of the VEGFR-2

duced cellular response, leading to eNOS activation and NO release from endothelial cells.

DISCUSSION

The results presented herein show that 1) tyrosine 801 of the VEGFR-2 is necessary for VEGF-stimulated NO release, 2) Tyr⁸⁰¹ is required for maximal phosphorylation and recruitment of the p85 subunit of PI3K to the VEGFR-2, 3) both Akt and eNOS phosphorylation, following VEGFR-2 activation, require Tyr⁸⁰¹, 4) the incapacity of the Y801F-VEGFR-2 to stimulate NO release can be rescued solely by the artificial phosphorylation of eNOS on the Akt site, Ser¹¹⁷⁹, and finally 5) tyrosine 801 on the VEGFR-2 is dynamically phosphorylated in endothelial cells in response to VEGF stimulation. Overall, we demonstrate that Akt-mediated phosphorylation of eNOS on Ser¹¹⁷⁹ following VEGFR-2 activation is an essential event for NO release, and this is dependent on the phosphorylation of tyrosine 801 of the VEGFR-2.

Our results identify eNOS phosphorylation on serine 1179 by Akt as an obligatory event for eNOS activation and NO production in response to VEGF and suggest that other VEGF signaling pathways, such as PLC- γ activation, are not primary events for eNOS activation. Mutation of Tyr⁸⁰¹ to phenylalanine completely abrogates VEGFR-2-stimulated NO release, both in a reconstituted COS-7 cell system and in endothelial cells. Furthermore, we show that the Y801F mutant is incapable of inducing Akt phosphorylation on Ser⁴⁷³ and eNOS phosphorylation on Ser¹¹⁷⁹, suggesting that the incapacity of the mutated receptor to induce NO release is due to these incomplete signaling events. Interestingly, the Y801F VEGFR-2 mutant is fully capable of promoting PLC- γ phosphorylation in contrast to the Y1175F mutant further, indicating that eNOS phosphorylation by Akt is a prerequisite for NO release. Other signaling pathways are indisputably involved in VEGF-stimulated NO production, highlighted here by the fact that the VEGFR-2 is still capable of potentiating NO release from the constitutively activated S1179D-eNOS (Fig. 6B). Increases in intracellular calcium and PLC- γ activation have clearly been involved in VEGF-stimulated NO release (22). However, our results now allow us to uncouple these two pathways and demonstrate that, even in the context of an activated PLC- γ , VEGFR-2-stimulated NO release does not occur if phosphorylation of eNOS on Ser¹¹⁷⁹ by Akt following Tyr⁸⁰¹ phosphorylation of the receptor is not fulfilled. One could imagine that in the absence of an elevation of the intracellular levels of calcium by PLC- γ , VEGF-induced phosphorylation of Ser¹¹⁷⁹ of eNOS is sufficient to promote NO release similarly to fluid shear stress. Our results may also indicate that the late ("calcium-independent") phase of eNOS activation by VEGF predominates, in contrast to the early phase (calcium-dependent), in the overall amounts of NO released by endothelial cells following VEGF stimulation (47, 48).

While this manuscript was in review, an interesting study by Ahmad *et al.* (49) reported that mutation of tyrosine 951 of the VEGFR-2 results in reduced stimulated NO release. Using the chimeric EGF-VEGF receptor, they demonstrate that phosphorylation of tyrosine 951 of the VEGFR-2 is involved in eNOS regulation through indirect activation of Akt by PLC- γ . This

mutation results in a reduction by about 60% of the VEGFR-2-stimulated NO release. Because of this incomplete inhibition of the stimulated NO release, the authors conclude that other tyrosine residues are involved in eNOS activation by the VEGFR-2. Indeed, our study now demonstrates that phosphorylation of Tyr⁸⁰¹ is a major player for this signaling pathway via direct Akt phosphorylation, since its mutation results in a complete inhibition of eNOS phosphorylation and activation. Interestingly, the same study by Ahmad *et al.* (49) reveals that the tyrosine 794 residue of the VEGFR-1 is essential for eNOS activation by this receptor, which they demonstrate for the first time capable of promoting NO release by VEGF. Moreover, they demonstrate that Tyr⁷⁹⁴ of the VEGFR-1 mediates eNOS activation through Akt phosphorylation. This is interesting, because tyrosine 794 of the VEGFR-1 is analogous to tyrosine 801 of the VEGFR-2. Up to now, tyrosine 801 of the VEGFR-2 has not been investigated for its role in eNOS activation. Together, our two studies demonstrate that both VEGF receptors utilize a common signaling mechanism to stimulate NO production from endothelial cells and that eNOS phosphorylation by Akt is a central and mandatory event for eNOS-mediated NO release.

Phosphorylation of tyrosine 801 of the VEGFR-2 has previously been reported as being involved in PI3K activation (28). We show that the mutation of Tyr⁸⁰¹ to Phe of the VEGFR-2 markedly reduces p85 phosphorylation and recruitment; however, both phenomena are not completely abolished. This suggests that the phosphorylation of other tyrosine residues does participate in the recruitment and activation of p85 to the receptor perhaps through adaptor proteins, such as TSA, known to interact with phosphorylated Tyr⁹⁵¹, or the recently identified Gab1 (25, 31, 50). Nonetheless, our results show that a reduction in the activation levels of the p85 subunit of PI3K by the VEGFR-2 leads to a complete disruption of the downstream signaling events, namely Akt and eNOS, resulting in the inhibition of NO release.

Phosphorylation of tyrosine 1175 of the VEGFR-2 has been shown to be essential for embryonic vasculogenesis in mice. Indeed, mice carrying a phenylalanine substitution of this residue die *in utero* because of a failure of endothelial cell proliferation and differentiation similarly to the VEGFR-2 null mice (36). Our study reveals that phosphorylation of this residue is not essential for NO release, which is in line with a predominant role for NO in physiologic and pathologic VEGF-driven angiogenesis in adults, suggesting that the phosphorylation of the two residues (801 and 1175) might participate in different components of VEGF-mediated vessel formation.

In summary, we have identified phosphorylation of tyrosine 801 of the VEGFR-2 as the earliest intracellular event essential for VEGF signal transduction to eNOS via PI3K/Akt. We also reveal that eNOS phosphorylation on Ser¹¹⁷⁹ is a crucial event that is essential for VEGF-stimulated release of an important modulator of VEGF effects on endothelial cells, nitric oxide.

Acknowledgments—We thank Dr. Jean-Francois Côté for critical reading of the manuscript and Daniela Baggio for secretarial assistance.

REFERENCES

1. Takahashi, H., and Shibuya, M. (2005) *Clin. Sci. (Lond.)* **109**, 227–241
2. Munoz-Chapuli, R., Quesada, A. R., and Angel, M. M. (2004) *Cell Mol. Life Sci.* **61**, 2224–2243
3. Ferrara, N. (2004) *Endocr. Rev.* **25**, 581–611
4. Zachary, I., and Glikli, G. (2001) *Cardiovasc. Res.* **49**, 568–581
5. Shibuya, M., and Claesson-Welsh, L. (2006) *Exp. Cell Res.* **312**, 549–560
6. Shalaby, F., Rossant, J., Yamaguchi, T. P., Gertsenstein, M., Wu, X. F., Breitman, M. L., and Schuh, A. C. (1995) *Nature* **376**, 62–66
7. 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., and Nagy, A. (1996) *Nature* **380**, 435–439
8. Takahashi, T., Yamaguchi, S., Chida, K., and Shibuya, M. (2001) *EMBO J.* **20**, 2768–2778
9. Ng, Y. S., Krilleke, D., and Shima, D. T. (2006) *Exp. Cell Res.* **312**, 527–537
10. Takahashi, T., and Shibuya, M. (1997) *Oncogene* **14**, 2079–2089
11. Morales-Ruiz, M., Fulton, D., Sowa, G., Languino, L. R., Fujio, Y., Walsh, K., and Sessa, W. C. (2000) *Circ. Res.* **86**, 892–896
12. Rousseau, S., Houle, F., Landry, J., and Huot, J. (1997) *Oncogene* **15**, 2169–2177
13. Rousseau, S., Houle, F., Kotanides, H., Witte, L., Waltenberger, J., Landry, J., and Huot, J. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 10661–10672
14. Dimmeler, S., Dernbach, E., and Zeiher, A. M. (2000) *FEBS Lett.* **477**, 258–262
15. Gerber, H. P., McMurtrey, A., Kowalski, J., Yan, M., Keyt, B. A., Dixit, V., and Ferrara, N. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 30336–30343
16. Shizukuda, Y., Tang, S., Yokota, R., and Ware, J. A. (1999) *Circ. Res.* **85**, 247–256
17. Parenti, A., Morbidelli, L., Cui, X. L., Douglas, J. G., Hood, J. D., Granger, H. J., Ledda, F., and Ziche, M. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 4220–4226
18. Morbidelli, L., Chang, C. H., Douglas, J. G., Granger, H. J., Ledda, F., and Ziche, M. (1996) *Am. J. Physiol.* **270**, H411–H415
19. Papapetropoulos, A., Garcia-Cardena, G., Madri, J. A., and Sessa, W. C. (1997) *J. Clin. Invest.* **100**, 3131–3139
20. Murohara, T., Horowitz, J. R., Silver, M., Tsurumi, Y., Chen, D., Sullivan, A., and Isner, J. M. (1998) *Circulation* **97**, 99–107
21. 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
22. He, H., Venema, V. J., Gu, X., Venema, R. C., Marrero, M. B., and Caldwell, R. B. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 25130–25135
23. Dimmeler, S., Fleming, I., Fisslthaler, B., Hermann, C., Busse, R., and Zeiher, A. M. (1999) *Nature* **399**, 601–605
24. 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
25. Matsumoto, T., Bohman, S., Dixelius, J., Berge, T., Dimberg, A., Magnusson, P., Wang, L., Wikner, C., Qi, J. H., Wernstedt, C., Wu, J., Bruheim, S., Mugishima, H., Mukhopadhyay, D., Spurkland, A., and Claesson-Welsh, L. (2005) *EMBO J.* **24**, 2342–2353
26. Dougher-Vermazen, M., Hulmes, J. D., Bohlen, P., and Terman, B. I. (1994) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **205**, 728–738
27. Cunningham, S. A., Arrate, M. P., Brock, T. A., and Waxham, M. N. (1997) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **240**, 635–639
28. Dayanir, V., Meyer, R. D., Lashkari, K., and Rahimi, N. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 17686–17692
29. Dougher, M., and Terman, B. I. (1999) *Oncogene* **18**, 1619–1627
30. Kendall, R. L., Rutledge, R. Z., Mao, X., Tebben, A. J., Hungate, R. W., and Thomas, K. A. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 6453–6460
31. Wu, L. W., Mayo, L. D., Dunbar, J. D., Kessler, K. M., Ozes, O. N., Warren, R. S., and Donner, D. B. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 6059–6062
32. Warner, A. J., Lopez-Dee, J., Knight, E. L., Feramisco, J. R., and Prigent, S. A. (2000) *Biochem. J.* **347**, 501–509
33. Ratcliffe, K. E., Tao, Q., Yavuz, B., Stoleto, K. V., Spring, S. C., and Terman, B. I. (2002) *Oncogene* **21**, 6307–6316
34. Holmqvist, K., Cross, M. J., Rolny, C., Hagerkvist, R., Rahimi, N., Matsumoto, T., Claesson-Welsh, L., and Welsh, M. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 22267–22275
35. Knight, E. L., Warner, A. J., Maxwell, A., and Prigent, S. A. (2000) *Oncogene* **19**, 5398–5405
36. Sakurai, Y., Ohgimoto, K., Kataoka, Y., Yoshida, N., and Shibuya, M. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 1076–1081
37. Lamalice, L., Houle, F., Jourdan, G., and Huot, J. (2004) *Oncogene* **23**, 434–445
38. Duval, M., Bedard-Goulet, S., Delisle, C., and Gratton, J. P. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 20091–20097
39. 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
40. 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
41. Meyer, R. D., Dayanir, V., Majnoun, F., and Rahimi, N. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 27081–27087
42. Ignarro, L. J., Fukuto, J. M., Griscavage, J. M., Rogers, N. E., and Byrns, R. E. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 8103–8107
43. Kroll, J., and Waltenberger, J. (1999) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **265**, 636–639
44. McCabe, T. J., Fulton, D., Roman, L. J., and Sessa, W. C. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 6123–6128
45. Gampel, A., Moss, L., Jones, M. C., Brunton, V., Norman, J. C., and Mellor, H. (2006) *Blood* **108**, 2624–2631
46. Lampugnani, M. G., Orsenigo, F., Gagliani, M. C., Tacchetti, C., and Dejana, E. (2006) *J. Cell Biol.* **174**, 593–604
47. Brouet, A., Sonveaux, P., Dessy, C., Balligand, J. L., and Feron, O. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 32663–32669
48. Gelin, D. S., Bernatchez, P. N., Rollin, S., Bazan, N. G., and Sirois, M. G. (2002) *Br. J. Pharmacol.* **137**, 1021–1030
49. Ahmad, S., Hewett, P. W., Wang, P., Al-Ani, B., Cudmore, M., Fujisawa, T., Haigh, J. J., le Noble, F., Wang, L., Mukhopadhyay, D., and Ahmed, A. (2006) *Circ. Res.* **99**, 715–722
50. Dance, M., Montagner, A., Yart, A., Masri, B., Audigier, Y., Perret, B., Salles, J. P., and Raynal, P. (2006) *J. Biol. Chem.* **281**, 23285–23295

