

Université de Montréal

Rôle de la petite GTPase Rap1 dans les effets pro-angiogéniques de l'angiopoïétine-1 sur les cellules endothéliales

par Vanda Gaonac'h-Lovejoy

Département de pharmacologie et physiologie
Faculté de Médecine

Mémoire présenté
en vue de l'obtention du grade de maîtrise
en pharmacologie

Mai 2018

© Vanda Gaonac'h-Lovejoy, 2018

Résumé

L'Angiopoïétine-1 (Ang-1) est un facteur de croissance pro-angiogénique qui agit sur les cellules endothéliales (CEs) et qui promeut la stabilisation des jonctions intercellulaires entre les CEs. L'Ang-1 contrôle, via l'activation du récepteur Tie2, la stabilité des vaisseaux sanguins et inhibe la perméabilité vasculaire aux macromolécules. Ces effets de l'Ang-1 sur les CEs sont essentiels pour la maturation finale des vaisseaux durant le processus de l'angiogenèse. Rap1, une petite GTPase, est impliquée dans l'adhésion intercellulaire. Grâce à des sondes biochimiques, nous avons pu montrer que l'Ang-1 active la GTPase Rap1 dans des CEs. Nous avons transfecté des CEs d'aortes bovines avec un ARN interférant (siRNA) contre Rap1 et nous avons trouvé que Rap1 contribue à la stabilisation des jonctions intercellulaires stimulées par l'Ang-1 en diminuant la perméabilité des jonctions endothéliales aux macromolécules. De plus, la transfection de siRNA contre Rap1 inhibe fortement l'induction du bourgeonnement angiogénique des CE lors d'essais de sphéroïdes. Cependant, la diminution de l'expression de Rap1 n'affecte pas la migration des CEs lors d'essais de réparation de blessures stimulées par l'Ang-1. De façon intéressante, une diminution de l'expression de la VE-cadhérine, une autre protéine essentielle des jonctions d'encrage, inhibe complètement la migration des CEs stimulée par l'Ang-1 ainsi que le bourgeonnement angiogénique. Finalement, la diminution de l'expression de la VE-cadhérine provoque une augmentation de l'adhésion des CEs à la matrice extracellulaire tandis qu'aucun effet n'est observé suite à la diminution de l'expression de Rap1. Ces résultats suggèrent que la fonction de Rap1 stimulée par l'Ang-1, est principalement associée à son rôle au niveau de l'adhésion intercellulaire des CEs contrairement à la VE-cadhérine qui est en plus impliquée dans leur adhésion à la matrice extracellulaire.

Mots-clés : Angiogenèse, angiopoïétine-1, Rap1, VE-cadhérine, migration, bourgeonnement, adhésion, endothéliale

Abstract

Angiopoietin-1 (Ang-1), an important angiogenic factor, plays a key role in blood vessel formation. Ang-1 controls, via its Tie-2 receptor, the stability of blood vessels and inhibits vascular permeability to macromolecules. These effects of Ang-1 on endothelial cells (ECs) are essential for the maturation of blood vessel during the angiogenic process. Studies have shown that the small GTPase Ras-associated protein-1 (Rap1) is involved in promoting cell adhesion, such as cadherin-mediated adhesion and vessel stability. While many studies establish Rap1 activation as an important signaling event leading to adherens junctions (AJ) reinforcement, Rap1 has never been reported as a signaling target of Tie-2. We determine the contribution of Rap1 to Ang-1/Tie-2 stimulated angiogenic effect on ECs. Using a pull-down assay, we were able to show that Ang-1 rapidly activates Rap1 in ECs. We transfected bovine aortic endothelial cells (BAECs) with siRNA against Rap1 and we found that downregulation of Rap1 attenuated the anti-permeability effects of Ang-1 on ECs. Our results also reveal that Rap1 is necessary for EC sprouting stimulated by Ang-1 in our angiogenic *in vitro* model, but had no visible effect on EC migration. Although Rap1 and VE-cadherin are both essential in promoting the integrity of the endothelial barrier and cell sprouting, downregulation of VE-cadherin in BAECs transfected with siRNA against VE-cadherin abolished Ang-1 stimulated migration and promoted adhesion of ECs in contrast to Rap1. These results suggest that Ang-1 mostly activates Rap1 at the level of intercellular adhesions in EC whereas Ang-1 also induces VE-cadherin cell adhesion of ECs with the extracellular matrix.

Keywords : Angiopoietin-1; angiogenesis, Rap1, VE-cadherin, sprouting, migration, adhesion, endothelial cells

Table des matières

Liste des abréviations	vii
Chapitre 1	xiii
INTRODUCTION	xiii
1.1 Les vaisseaux sanguins	14
1.1.1 Les cellules endothéliales	14
1.1.2 L'endothélium	15
1.1.3 Les jonctions intercellulaires endothéliales	16
1.2 L'angiogenèse	23
1.2.1 L'angiogenèse physiologique	23
1.2.2 L'angiogenèse pathologique	26
1.3 Les récepteurs Tie et les angiopoïétines	29
1.3.1 Les récepteurs Tie	29
1.3.2 Les angiopoïétines	32
1.4 Fonctions biologiques de l'axe Ang-1/Tie-2	34
1.4.1 Rôle de Tie2 et Ang-1 dans la régulation des interactions CE-CE	34
1.4.2 Rôle de Tie2 et Ang-1 dans la régulation des interactions CE-matrice extracellulaire (MEC)	35
1.4.3 Migration cellulaire	37
1.5 Les GTPases	42
1.5.1 Régulation du « switch » GDP/GTP	42
1.5.2 Les GTPases Rho	44
1.5.3 La petite GTPase RhoA	45
1.5.4 La petite GTPase Rac1	47
1.5.5 La petite GTPase Cdc42	48
1.6 La petite GTPase Rap1	49
1.6.1 Découverte de Rap1	49
1.6.2 Rap1a et Rap1b	51
1.6.3 Le rôle de Rap1 dans les cellules endothéliales	52
1.6.4 La structure protéique de Rap1	52
1.6.5 L'hydrolyse du GTP	52
1.6.6 Dissociation du GDP	55
1.6.7 Régulation de l'activité de Rap1	55
1.6.8 Les effecteurs de Rap1	59
1.7 Objectifs de recherche	65
Chapitre 2	66
Article: Role of Rap1 in angiopoietin-1–induced pro-angiogenic effects on endothelial cells	66
2.1 Abstract	69
2.2 Introduction	70
2.3 Methods	70
2.4 Results	71
2.6 Figure Legends	83
2.8 Figures	88

Chapitre 3	93
DISCUSSION, PERSPECTIVE et CONCLUSIONS.....	93
3.1 DISCUSSION	94
3.3 CONCLUSION.....	103
Bibliographie	104

FIGURES

Figure 1.1 Régulation dynamique de la perméabilité vasculaire.....	15
Figure 1.2 Représentation schématique des jonctions intercellulaires chez des CEs.....	18
Figure 1.3 Les principales étapes cellulaires de l'angiogenèse	26
Figure 1.4 Structure moléculaire des récepteurs Tie et des ligands de l'angiopoïétine.....	31
Figure 1.5 Modèle pour la signalisation Tie-2/Ang-1 dans un endothélium au repos.....	37
Figure 1.6 Le switch GDP/GTP de base. La régulation du switch GDP/GTP par GEFs, GAPs et les GDIs	43
Figure 1.7 Comparaison des acides aminés entre Rap1a et Rap1b,.....	51
Figure 1.8 Éléments de la structure secondaire et la boucle P autour des sites actifs	54
Figure 1.9 Réseau de signalisation Rap1	57
Figure 1.10 Signalisation par les effecteurs Rap1 dans le contrôle de la barrière endothéliale et dans l'adhésion cellule MEC.	63
Figure 3.1 Modèle d'activation de Rap1 et de VE-cadhérine en aval de la signalisation Ang-1.	95

Liste des abréviations

AMPc : AMP cyclique

Ang : Angiopoïétine

BBB : Barrière hémato-encéphalique

Cdc42 : Cell division cycle 42

CEs : Cellules Endothéliales

CLM : Chaîne Légère de la Myosine trimère

CMLV : Cellules Musculaires Lisses Vasculaires

DAG : Diacylglycocol

DCC : Domaine coiled-coil

DEP : Dishevelled, Egal-10, Pleckstrine

DHR : DOCK Homology Region

DLL4 : Delta-like protein 4 precursor

Dock4: Dedicator of cytokinesis 4

DPT : Domaines de liaison Phosphotyrosine

DSC : Domaine de superclustering

EGF : Epidermal Growth Factor

eNOS: Oxyde nitrique synthétase endothéliale

FAK : Focal adhesion kinase

FGF : Fibroblast Growth Factor

FreD : Fibrinogen-related Domain

GAP : GTPase-Activating Protein

GDI : Guanine nucleotide Dissociation Inhibitor

GDP: Guanosine Diphosphate
GEF : Guanine nucleotide Exchange Factor
GRD : GAP Related Domain
GTP : Guanosine Triphosphate
GTPase : Guanosine Triphosphatases
HD : Homologie Dbl
HIF : Hypoxia-inducible factors
Ig : Immunoglobuline
JA : Jonctions D'ancrage
JS : Jonctions Serrées
Krev-1 : Kirsten-ras-revertant-1
Krit : Krev Interaction Trapped 1
LPS : Lipopolysaccharide
MAGUK : Membrane-Associated Guanylate Kinases
MB : Membrane Basale
MEC : Matrice extracellulaire
MPM : MétalloProtéinases Matricielles
nmMHCII : nonmuscle Myosin Heavy Chain II
NO : Monoxyde d'azote
Pak : p21 activated kinases
PH domain : Pleckstrin Homology domain
PI3K : Phosphatidylinositol 3-kinase
PKC : Protéine kinase C atypique
RA : Ras-associated

Rap1 : Ras-related protein 1

Rasip1 : Ras-Interacting Protein 1

REM : Ras Exchange Domain

RHD : Région d'Homologie Dock

ROCK : Rho associated protein Kinase

Spa-1: Signal-induced Proliferation Associated gene-1

Tie : Récepteur tyrosine-protéine kinase

TNFs: tumor necrosis factor

VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

VE-PTP : Vascular Endothelial-Protein Tyrosine Phosphatase

ZO : Zonula Occludens

*À mon grand-père Derek Lovejoy,
qui a su me transmettre sa curiosité
et sa passion pour la science*

“Science goes where you imagine it.”- Judah Folkman

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier chaleureusement mon directeur de maîtrise, Dr Jean-Philippe Gratton, pour ses précieux conseils et le temps qu'il a consacré à ma formation. Il m'a encouragé et sa direction m'a permis d'aiguiser mon sens critique. Merci, Jean-Philippe, pour ton soutien et ta confiance !

Je ne pourrais passer sous silence la contribution de Chantal Delisle à cette thèse. Chantal m'a appris toutes les techniques du laboratoire de A à Z : de la culture de cellules aux Westerns Blots. Tu as su m'écouter dans les moments difficiles et me donner des conseils judicieux. Merci pour ton aide et ton amitié.

J'aimerais également remercier les différents étudiants que j'ai eu la chance de côtoyer pendant ma maîtrise : Rony, Cécile et Ying. Rony, tu as su répondre à mes millions de questions avec patience. Tu es devenu bien plus qu'un collègue de travail, tu es devenu un ami sur lequel je peux compter malgré la distance qui nous sépare. Cécile, tu as su me propager ta passion pour la biologie moléculaire et la microscopie. Ying, malgré que nos vies ne se soient croisées qu'un bref moment, je garde de bons souvenirs de nos discussions scientifiques. Que ce soit pour me reconforter pendant des moments difficiles ou encore pour m'encourager, vous avez tous été là pour m'apporter votre soutien. Je garderai de très bons souvenirs de mes années de maîtrise grâce à vous.

Je tiens également à remercier ma famille sans qui ce projet n'aurait jamais été possible. Je veux particulièrement remercier mes parents, Shaun et Hélène, pour m'avoir donné leurs soutiens et leurs amours inconditionnels ainsi que d'avoir pris le temps de lire mon mémoire. À mon frère Miro, merci d'avoir toujours été là pour moi.

Enfin à Sébastien, il n'y a pas de mots pour décrire tout l'amour, le soutien et la motivation que tu me donnes dans toutes les sphères de ma vie.

CHAPITRE 1
INTRODUCTION

1.1 Les vaisseaux sanguins

1.1.1 Les cellules endothéliales

Les cellules endothéliales (CEs) sont les cellules qui revêtent la paroi interne des vaisseaux sanguins. Elles sont les premières protagonistes de l'angiogenèse. Leurs plasticités cellulaires leur permettent de jouer un rôle critique dans de nombreux phénomènes physiologiques tels que dans le contrôle de la pression artérielle, la perméabilité vasculaire, l'angiogenèse, et l'immunité innée et adaptative ¹ en fonction des signaux qu'elles perçoivent. Ces cellules ont en moyenne une durée de vie cellulaire de l'ordre d'une année chez l'Homme², sont polarisées, avec une face apicale orientée vers la lumière du vaisseau et une face basale établie à la lame basale ce qui leur donne une résistance mécanique. Les CEs sont généralement inactives chez l'adulte, mais peuvent être activées afin de proliférer suite à une blessure traumatique, lors d'une inflammation, lors de la formation de tumeurs ou en réponse à des signaux physiologiques pendant la croissance des cheveux et le cycle ovarien³.

Les CEs nécessitent une régulation extrêmement précise afin de maintenir l'homéostasie du système vasculaire (Fig 1.1). Quand une inflammation se produit, des médiateurs inflammatoires tels que la thrombine ou le facteur de croissance endothéliale vasculaire (VEGF) augmentent la perméabilité vasculaire faisant passer les leucocytes. En outre, d'autres médiateurs tels que l'angiopoïétine-1 (Ang-1) diminuent cette perméabilité.

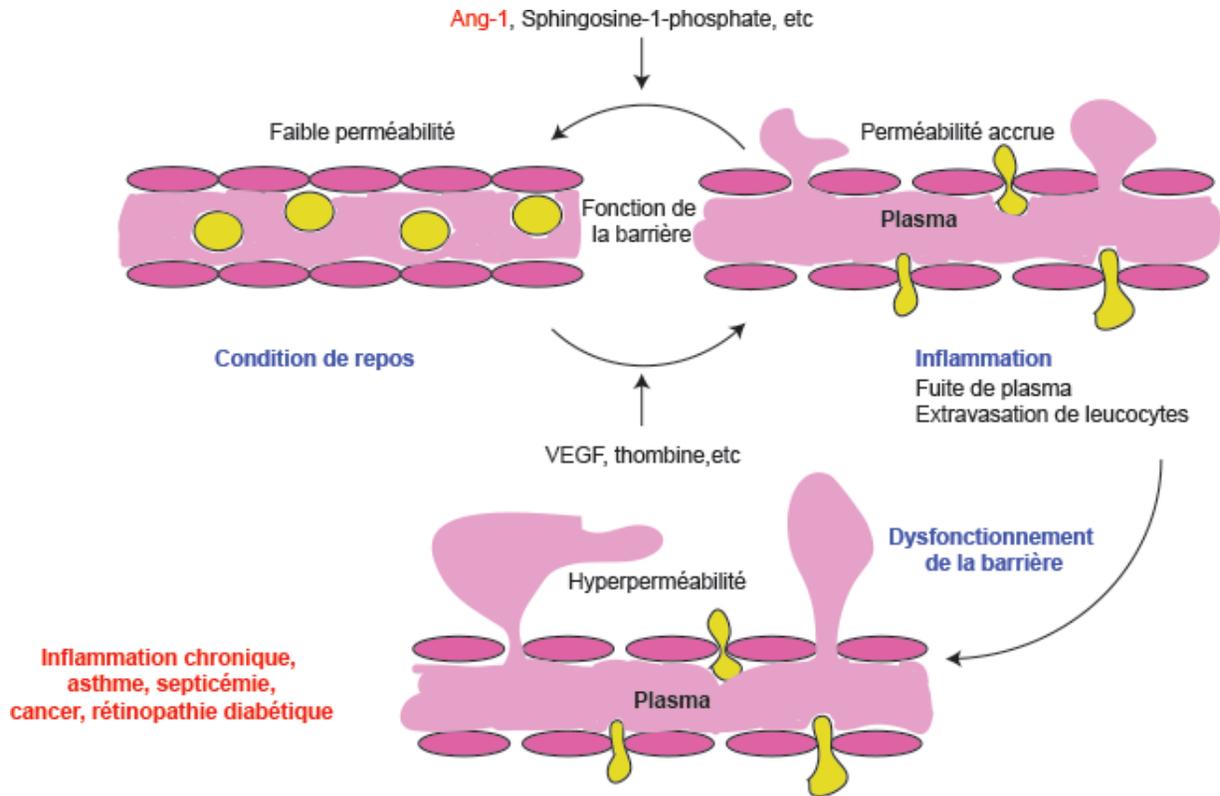


Figure 1.1 Régulation dynamique de la perméabilité vasculaire

La perméabilité endothéliale est dynamiquement contrôlée par un certain nombre de médiateurs qui augmente ou diminue l'étanchéité de la barrière endothéliale. Dans les tissus adultes normaux, les CEs maintiennent la perméabilité vasculaire basale à un faible niveau. Lorsque l'inflammation est induite, les médiateurs inflammatoires augmentent la perméabilité vasculaire. Une dérégulation de la perméabilité facilite le développement et la progression de diverses maladies associées à l'hyperperméabilité vasculaire. Modifié à partir de référence ⁴.

1.1.2 L'endothélium

Les CEs forment l'endothélium vasculaire, la paroi interne des vaisseaux sanguins qui est en contact immédiat avec le flux sanguin. Le revêtement de la barrière endothéliale est formé d'une grande surface, estimé à environ 350 m² chez l'humain. Ce tissu est donc présent en grande quantité dans l'organisme et forme le réseau microvasculaire. Ce réseau dense et ramifié formé

de capillaires favorise l'échange de molécules et de protéines entre le sang et les tissus⁵. La perméabilité basale laisse passer des molécules comme l'eau, les gaz et les solutés. De plus, selon l'environnement tissulaire, l'endothélium vasculaire affiche une hétérogénéité histologique. En fait, il existe trois types d'endothélium en fonction du lit vasculaire : continu, fenêtré et discontinu.

L'endothélium continu se retrouve dans les gros vaisseaux tels que dans les artères et les veines qui approvisionnent le cœur, la peau, les muscles et les poumons. Les CEs qui forment cette monocouche continue sont jointives et ne permettent que le passage de l'eau et les sels à travers les jonctions intercellulaires, les macromolécules étant plutôt acheminées grâce à des canaux transendothéliaux par transcytose.

L'endothélium fenêtré est constitué de CEs fixées sur une lame basale et comportent des pores d'un diamètre de 60 à 80 nm qui laisse passer l'eau ainsi que les solutés, la diffusion de certaines protéines et macromolécules. L'endothélium fenêtré est une particularité des organes impliqués dans la filtration ou la sécrétion telle que la muqueuse intestinale, les glandes endocrines et le pancréas.

L'endothélium discontinu se différencie des deux autres types d'endothélium par l'absence de membrane basale. Ceci permet le contact direct entre les hépatocytes et le sang à travers des ouvertures de 30 à 40 μm . Cette membrane discontinue est retrouvée dans la rate, la moelle osseuse et le foie.

1.1.3 Les jonctions intercellulaires endothéliales

Il existe trois types différents de jonctions intercellulaires endothéliales : les jonctions serrées (JS), les jonctions d'ancrage (JA) et les jonctions gap (Fig 1.4). Les JA et les JS, chez les CEs,

sont comparables à celles retrouvées chez les cellules épithéliales. Contrairement aux cellules épithéliales, cependant, les CEs n'ont pas de desmosomes, une structure cellulaire spécialisée pour l'adhésion cellule-cellule qui ancrent la membrane plasmique aux filaments intermédiaires du cytosquelette. Les JA initient les contacts de cellule à cellule et favorisent leur maturation et leur maintenance. Les JS permettent le passage des ions et des solutés à travers la voie paracellulaire⁶. Les JS peuvent également servir de « barrière » pour limiter la libre circulation des lipides et des protéines entre les surfaces cellulaires apicale et basolatérale. L'organisation des jonctions intercellulaires à travers le groupement des protéines d'adhésion et de signalisation est un processus important par lequel les cellules détectent leur position, contrôlent la croissance et l'apoptose et forment des structures tubulaires^{6,7,8}.

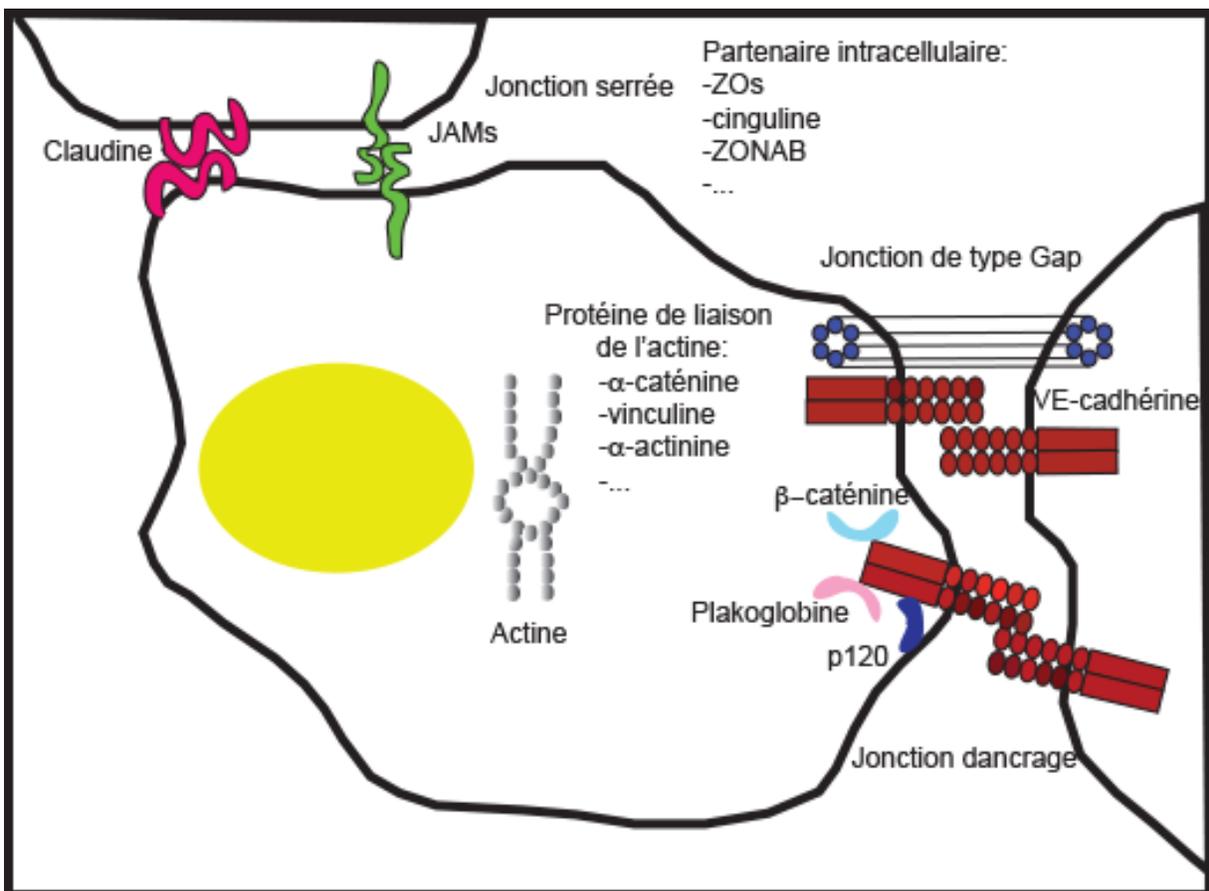


Figure 1.2 Représentation schématique des jonctions intercellulaires chez des CEs

Dans les CEs, l'adhésion aux jonctions serrées est favorisée par les claudines et les membres de la famille JAM. Les composants cytoplasmiques des jonctions serrées sont les protéines ZO, la cinguline, ZONAB et d'autres. Aux jonctions d'ancrages, l'adhérence est promue par les cadhérines qui se lient directement à p120, β -caténine et à la plakoglobine. Un grand ensemble de protéines se lient à l'actine et sont associés à des jonctions d'ancrage (JA) telles que l' α -caténine, la vinculine, l' α -actinine et d'autres. Les jonctions de type Gap forment des hémicanaux qui peuvent diffuser latéralement à la membrane de jonctions, des petites molécules. Modifié à partir de référence ⁴.

1.1.3.1 Les jonctions serrées (JS)

Les composants de base des JS sont des protéines de la famille des claudines et occludines ^{9, 10} (Fig 1.4). La famille des claudines compte plus de vingt membres, dont seulement quelques-uns sont exprimés par les CEs. Claudine-5 est plutôt omniprésente le long de l'arbre vasculaire. D'autres claudines non spécifiques à un type cellulaire particulier sont également présentes dans les CEs et leur combinaison varie pour répondre aux différents besoins de l'organe perfusé. Il existe d'autres variétés de protéines transmembranaires d'adhésion qui peuvent être retrouvées au niveau des JS (JAMs, ESAM, occludine, etc)¹¹. Parmi les partenaires intracellulaires des claudines sont les membres de la famille des Zonula Occludens (ZO; ZO-1 et 2 dans l'endothélium). Les protéines ZO font partie d'un sous-groupe de la famille Guanylate Kinase (MAGUK) qui est associée à la membrane et qui se trouve aux JS dans la plupart des tissus, y compris l'endothélium. D'autres protéines des JS intercellulaires comprennent des protéines de signalisation et de liaison de l'actine.

Les grandes artères qui sont exposées à des débits élevés présentent un système bien développé de JS. Au sein de la microvascularisation, les JS sont moins complexes dans les capillaires que dans les artérioles et encore moins dans les veinules. Les veinules post-capillaires sont le site primaire de l'extravasation des leucocytes, le mouvement des leucocytes hors du système

circulatoire et vers le site de lésion tissulaire et en conséquence, elles présentent une teneur élevée en récepteurs médiateurs de perméabilité tels que ceux pour l'histamine, la sérotonine et la bradykinine. Les JS sont particulièrement abondantes et complexes dans la microcirculation cérébrale où il est nécessaire de contrôler avec précision la perméabilité alors que les jonctions sont relativement mal organisées dans les veinules postcapillaires où l'échange entre le sang et les tissus est dynamique^{8,12}.

Les propriétés de la barrière hémato-encéphalique (BBB) sont déterminées par des complexes jonctionnels endothéliaux composés de JS et JA. Les JS entre les CEs de la BBB ont une résistance électrique endothéliale élevée et ont une faible perméabilité paracellulaire. La fonction des claudines dans le complexe des JS est de limiter de façon sélective le mouvement des ions et de ce fait, génère la résistance électrique de la barrière. Les JS du cerveau sont constituées des claudine-5 et claudine-12. Ces claudines forment des pores qui sont impliqués dans le mouvement transjonctionnel de l'eau¹³.

1.1.3.2 Les jonctions de type gap

Les jonctions de type gap sont des structures de communication qui permettent le passage d'ions et de molécules de faible poids moléculaire (<1000 Da) entre cellules voisines⁶. Les protéines composantes de ces canaux, les connexines, appartiennent à une famille multigénique dont six molécules s'assemblent pour former un assemblage hexamérique de connexines. Deux hexamères de cellules adjacentes sont reliées en formant un pont cytoplasmique étroitement scellé afin d'empêcher l'échange de substances avec le milieu extracellulaire¹⁴. Parmi les 16 membres identifiés dans les cellules de mammifères, Connexin37 (Cx37), Cx40 et Cx43 sont connus pour être exprimés par différents types de CEs^{15, 16, 17}. Ces canaux se regroupent en

plaque polymorphe contenant de quelques-uns à des milliers de canaux¹⁸. L'apposition de membranes étroites requises pour permettre l'accostage entre les connexions encombre stériquement la plupart des autres protéines membranaires, laissant un « espace » extracellulaire étroit d'environ 2 nm pour lequel la jonction est nommée¹⁸.

Des études *in vitro* indiquent que les propriétés des canaux jonctionnels gap sont déterminées par leurs constitutions en connexines. L'expression protéique spécifique des connexines peut également être affectée par des facteurs physiques et chimiques, tels que la charge mécanique, le taux de sucre dans le sang, les facteurs de croissance et les cytokines¹⁹. Les jonctions de type gap sont impliquées dans une variété d'activité endothéliale, notamment dans le maintien de la barrière endothéliale, la coordination des réponses vasomotrices, la régulation de l'angiogenèse et dans la croissance endothéliale^{15, 20}. Ces jonctions peuvent également propager des signaux électriques entre des cellules voisines et il a été montré que la stimulation électrique induit des réponses angiogéniques dans les CEs en activant VEGFR²¹. En effet, les cellules musculaires lisses vasculaires (CMLVs) et les CEs sont connectées par des jonctions gap situées entre les deux types cellulaires à la jonction myoendothéliale. La communication entre les deux types cellulaires joue un rôle essentiel dans les réponses médiées par le Ca^{2+} induites par des vasodilatateurs dépendants de l'endothélium tels que l'acétylcholine. Une augmentation du Ca^{2+} intracellulaire activerait le canal ionique K^+ - Ca^{2+} dépendant induisant l'hyperpolarisation des CMLVs par des jonctions gaps situés à la jonction myoendothéliale²².

1.1.3.3 Les jonctions d'ancrages (JA) et leurs rôles dans la perméabilité vasculaire

Les JA sont omniprésentes le long de l'arbre vasculaire et sont exprimées à la fois dans les vaisseaux sanguins et lymphatiques. Entre les JA, l'adhésion est assurée par des membres de la

famille des cadhérines, des protéines d'adhésion transmembranaires²³. La VE-cadhérine est exprimée essentiellement dans tous les types d'endothélium. La N-cadhérine est également présente dans l'endothélium, mais elle est fréquemment localisée dans des structures cellulaires non-JA à la fois *in vitro* et *in vivo*. La VE-cadhérines se lie aux caténines intracellulaires, en particulier p120, la β -caténine et la plakoglobine. La β -caténine se lie également à l' α -caténine, qui lorsqu'elle est libérée par des jonctions dans le cytosol favorise le regroupement d'actine (Fig 1.4).

Les JA, via VE-cadhérine, jouent un rôle important dans le contrôle de la perméabilité et de l'intégrité vasculaire. Des données *in vivo* montrent qu'utiliser des anticorps bloquant la VE-cadhérine donne lieu à l'augmentation de la perméabilité vasculaire pulmonaire et cardiaque accompagnée d'une rétraction des CEs ainsi qu'un détachement partiel de la matrice sous-endothéliale, une fine couche de la MEC²⁴. Des stimuli tels que des concentrations élevées d'histamine, de thrombine ou des facteurs de croissance peuvent augmenter la perméabilité cellulaire endothéliale par un effet sur la contractilité cellulaire induite par la phosphorylation de la chaîne légère de myosine et l'activation de la kinase p21²⁵. Cependant, une augmentation de la perméabilité *in vitro* et *in vivo* pourrait également être observée en présence de changements plus subtils dans l'organisation des JA. L'histamine, le facteur de nécrose tumorale (TNFs), les facteurs d'activation plaquettaire et le VEGF induisent la phosphorylation de résidus tyrosine de la VE-cadhérine, de β -caténine et de p120. Cette phosphorylation des protéines JA est parallèle aux augmentations de la perméabilité dans les systèmes de culture cellulaire²⁴. La kinase Src est probablement impliquée dans la phosphorylation des JA car elle est directement associée au complexe VE-cadhérine/caténine et l'inactivation du gène Src ou le traitement avec des inhibiteurs pharmacologiques bloquent la phosphorylation de la VE-cadhérine induite par

le VEGF ²⁶. L'inhibition des phosphatases associées augmente les niveaux de phosphorylation de VE-cadhérine. La protéine-tyrosine phosphatase endothéliale vasculaire (VE-PTP) présente un intérêt particulier, car elle est spécifique à l'endothélium et s'associe à la VE-cadhérine. L'inactivation du gène VE-PTP conduit à un phénotype comparable à celui d'embryons ayant des niveaux de VE-cadhérine diminués. Ceci suggère que les vaisseaux ne peuvent pas se former correctement si la VE-cadhérine est constamment phosphorylée ²⁷. D'autres kinases que Src peuvent être associées au complexe VE-cadhérine/ caténine et moduler la perméabilité. Cela inclut Csk, qui se lie à la VE-cadhérine phosphorylée et inhibe Src ²⁸. La perméabilité peut également être régulée par l'internalisation de VE-cadhérine. La VE-cadhérine peut aussi être internalisée de manière clathrine dépendante. La liaison de p120 à VE-cadhérine empêche cette internalisation, suggérant que p120 peut agir comme un signal de rétention de la membrane plasmique. Par conséquent, toute condition qui réduit l'affinité de VE-cadhérine pour p120, telle que la phosphorylation de tyrosine, peut augmenter son internalisation. Le VEGF perturbe la fonction de la barrière endothéliale en activant Src, qui à son tour phosphoryle Vav2, un facteur d'échange de guanine pour Rac. Rac activé favorise la phosphorylation d'un motif de VE-cadhérine (Ser665) ²⁹ via l'activation de « p21 activated kinase » (PAK). Ce processus induit le recrutement de la β -arrestine2 ce qui induit l'internalisation de la VE-cadhérine dépendante de la clathrine. Dans ce scénario, la phosphorylation de VE-cadhérine sur les résidus tyrosine serait l'étape cruciale pour l'augmentation de la perméabilité.

1.2 L'angiogenèse

1.2.1 L'angiogenèse physiologique

L'angiogenèse est la formation de nouveaux capillaires à partir de vaisseaux pré-existants³⁰. Le système vasculaire est le premier système qui se développe chez l'embryon. Les premiers vaisseaux sont formés par la différenciation et le regroupement de cellules souches dérivées du mésoderme, les angioblastes. De façon subséquente, le bourgeonnement des vaisseaux ainsi que leurs divisions en différentes branches contribuent à l'élargissement du plexus primitif et créent un réseau d'artères, de capillaires et de veines³¹.

L'hypoxie est l'un des principaux moteurs de l'angiogenèse. En effet, lorsque les CEs sont trop éloignées des vaisseaux et se trouvent en hypoxie, elles commencent à sécréter des facteurs pro-angiogéniques, qui déclenchent l'invasion et la protrusion de cellules pionnières (dites tip-cells). Les CEs sont pourvues de senseurs d'O₂ et réagissent à l'hypoxie via des modifications importantes de leur profil transcriptionnel. L'angiogenèse inclut également la pénétration de vaisseaux dans des régions qui sont avasculaires et dépend des interactions entre les CEs, les péricytes, les cellules stromales mésenchymateuses ainsi que leurs associations avec la matrice extracellulaire (MEC) et la membrane basale vasculaire (MB). L'angiogenèse chez l'adulte est importante pour la régénération et la réparation des tissus, pour le maintien de l'homéostasie physiologique, pour l'inflammation, pour la croissance de l'endomètre lors du cycle menstruel et pour la régénération vasculaire suite à une ischémie³².

L'angiogenèse physiologique nécessite la coordination de plusieurs systèmes de signalisation afin que les CEs puissent se diviser et modifier le réseau vasculaire d'une manière contrôlée. Plusieurs étapes séquentielles sont nécessaires pour l'angiogenèse. Lorsqu'un vaisseau au repos

détecte des signaux angiogéniques tels que le VEGF, l'Ang-2 ou des chimiokines, les péricytes se détachent de la paroi vasculaire et se libèrent de la membrane basale par dégradation protéolytique, médiée par les métalloprotéinases matricielles (MPMs). Les CEs perdent leurs jonctions et le nouveau vaisseau se dilate. Le VEGF augmente la perméabilité de la couche de CEs, provoquant l'extravasation des protéines plasmatiques et l'établissement d'un échafaudage de la MEC provisoire. Les protéases libèrent les molécules angiogéniques qui étaient emmagasinées dans la MEC telles que le VEGF et les facteurs de croissance des fibroblastes (FGFs).

Les CEs situées à l'extrémité des capillaires dirigent le bourgeonnement et allongent leurs filopodes vers la source du signal angiogénique. Ces cellules-pionnières, émettant des filopodes, sont suivies par des cellules adoptant un phénotype différent, des « stalk cells » (cellule organisée en tige), qui prolifèrent afin d'allonger le bourgeon³³ (Fig. 1.2). La spécification des cellules-pionnières migratrices et la prolifération des stalk-cells sont dynamiques et les CEs sont constamment en compétition pour la position de tête³⁴. Finalement, les cellules-pionnières se lient avec d'autres cellules-pionnières, de bourgeons avoisinants afin d'établir de nouveaux circuits de vaisseau sanguin. Le bourgeonnement continue jusqu'à ce que l'approvisionnement de nutriment et d'O₂ réponde à la demande, que les facteurs proangiogéniques soient dissipés et que les CEs soient au repos. L'établissement d'une MEC, le recrutement de péricytes et l'apport d'un flux sanguin consolident le phénotype endothélial qui forme une monocouche serrée.

Un facteur principal du bourgeonnement angiogénique est le VEGF. Il induit l'expression du Delta-like protein 4 precursor (DLL4) dans les cellules qui se lient aux récepteurs NOTCH 1, NOTCH 4 et aux CEs des tiges adjacentes. La signalisation de DLL4-NOTCH sert de

mécanisme afin de diminuer l'angiogenèse excessive et de favoriser le développement ordonné de nouveaux vaisseaux. Cette phase de résolution entraîne une diminution de prolifération des CEs, du recrutement des péricytes et des CMLV dans des nouveaux vaisseaux sanguins qui fournissent des signaux de stabilisation, de remodelage et de maturation.

L'équilibre dynamique entre facteurs angiogéniques et angiostatiques permet le contrôle de l'état du réseau vasculaire, et la fluctuation de cet équilibre entraîne une induction de l'angiogenèse ou au contraire une stabilisation. Plusieurs facteurs de nature très variée interviennent à différents stages de l'angiogenèse : molécules signalisatrices, protéines de la MEC, ou protéases. Par exemple, le VEGF-A et l'Ang-1 sont parmi les inducteurs les plus importants de l'angiogenèse physiologique et pathologique. En effet, le VEGF-A augmente la perméabilité vasculaire et stimule la prolifération et la migration des cellules endothéliales via ses récepteurs VEGFR1 et VEGFR2. En outre, l'effet principal d'Ang-1 via son récepteur Tie-2 est de consolider les vaisseaux en modifiant les jonctions entre les cellules endothéliales et de recruter des péricytes.

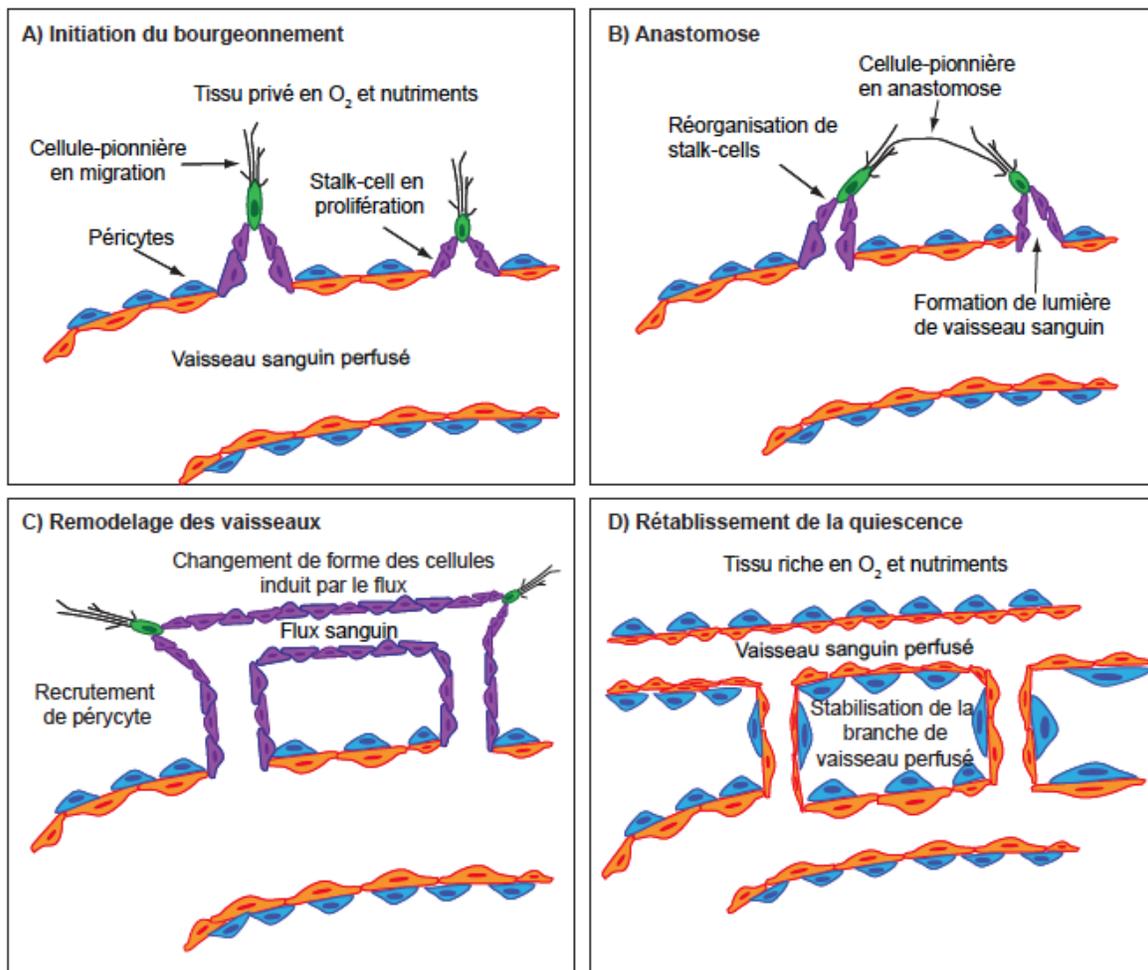


Figure 1.3 Les principales étapes cellulaires de l'angiogénèse

Étapes consécutives du bourgeonnement angiogénique : l'initiation du bourgeonnement, l'élongation des bourgeons, l'anastomose des bourgeons, le remodelage des vaisseaux et le rétablissement de l'équilibre vasculaire. Modifié à partir de référence ³⁵.

1.2.2 L'angiogénèse pathologique

De nombreuses pathologies dont l'inflammation, l'athérosclérose, divers types de vasculopathies ainsi que le cancer ³⁶ impliquent un dérèglement de l'angiogénèse. L'angiogénèse pathologique est structurellement et fonctionnellement anormale. Les cellules

tumorales peuvent induire leurs propres approvisionnements en sang à partir d'un système vasculaire préexistant par un processus qui imite l'angiogenèse normale. Malgré que ces nouveaux vaisseaux permettent la livraison des métabolites, ils présentent des anomalies structurales. En effet, ils sont souvent dilatés, alambiqués et perméables, dû à la présence de fenestra et d'absence de membrane basale. D'autre part, les murs des vaisseaux tumoraux peuvent être composés à la fois de CEs et de cellules tumorales³⁷. Les CEs tumorales ont des traits spécifiques. Elles perdent leurs polarités et pénètrent souvent la lumière et les tissus, leurs permettant de se détacher et d'acquérir des propriétés invasives à l'inverse des CEs quiescentes qui sont plutôt adhérentes. Ces irrégularités structurelles dans les vaisseaux tumoraux reflètent la nature pathologique de leurs inductions, et leur capacité à soutenir la croissance cellulaire repose sur l'utilisation de mécanismes physiologiques d'angiogenèse.

La néo-vascularisation tumorale est dépendante de son environnement. De fait, la principale différence entre l'angiogenèse physiologique et tumorale est que l'angiogenèse tumorale implique des processus inflammatoires. Des cellules tumorales de différents types, exprimant les récepteurs de VEGF, vont affecter l'angiogenèse tumorale. Ces cellules se déplacent vers le site de l'inflammation par le VEGF et produisent des facteurs pro-angiogéniques qui peuvent ensuite attirer les CEs, les CMLV et les fibroblastes.

La plupart des tumeurs solides primaires passent par un état prolongé de croissance avasculaire et inactif dans lequel la taille maximale atteignable est d'environ 1-2 mm de diamètre. Jusqu'à cette taille, les cellules tumorales peuvent obtenir les apports d'O₂ et de nutriments nécessaires à leur croissance par simple diffusion passive³⁸. Les signaux issus de la masse tumorale permettent d'attirer les macrophages associés à la tumeur. De plus, ces masses tumorales peuvent activer l'angiogenèse en recrutant des vaisseaux sanguins hôtes matures environnants

pour commencer à bourgeonner de nouveaux capillaires de vaisseaux sanguins, lorsque les cellules tumorales deviennent hypoxiques, ce qui déstabilise l'équilibre entre les molécules proangiogéniques et antiangiogéniques. L'angiogenèse pathologique est un processus moins finement régulé que le processus physiologique. En effet, des molécules proangiogéniques favorisant la transduction de signaux oncogéniques sont alors produites en excès par des cellules cancéreuses et des cellules stromales mésenchymateuses en réponse au stress métabolique, au stress mécanique, aux mutations génétiques, à la réponse immunitaire et à la stimulation de facteurs de croissance ³⁹.

L'activité transcriptionnelle des facteurs inductibles hypoxiques (HIFs) qui sont capables de promouvoir l'expression de médiateur proangiogénique dont VEGF-A enclenche le processus angiogénique. Les HIFs, des facteurs de transcriptions hétérodimériques, sont composés de sous unités α et β . La sous-unité HIF1- α est régulée par la quantité d'O₂ disponible et est maintenue à faible abondance en normoxie alors que lors de la promotion de l'angiogenèse, ces niveaux deviennent stables grâce à la suppression de la fonction du gène suppresseur de tumeur von Hippel-Lindau. De plus, l'activation d'oncogène mène à l'activation de facteurs de croissance, augmentant l'activité de l'HIF1- α ce qui permet aux tumeurs d'activer l'expression de VEGF-A et d'adopter un phénotype pro-angiogénique ⁴⁰. Des cellules souches embryonnaires ayant le gène HIF1- α inactivé furent injectées chez des souris, induisant une réduction des niveaux de HIF1- α . Ces souris avaient une revascularisation des tissus ischémiques perturbée ⁴¹.

1.3 Les récepteurs Tie et les angiopoïétines

1.3.1 Les récepteurs Tie

Au début des années 1990, la recherche de protéines tyrosine kinases exprimées par des CEs a permis d'identifier les récepteurs tyrosine kinase Tie-1 et Tie-2^{42, 43, 44}. L'acronyme « Tie » réfère au fait que ce récepteur est une tyrosine kinase avec des domaines d'homologie d'immunoglobuline (Ig) et des domaines d'homologie du facteur de croissance épidermique (EGF). Tie-1 et Tie-2 sont des molécules transmembranaires simples qui possèdent un domaine extracellulaire unique pour la liaison du ligand, un domaine transmembranaire à un seul passage, un domaine à activité tyrosine kinase cytoplasmique à deux parties, et une queue C-terminal. Les domaines extracellulaires sont constitués de séquences Ig, d'un facteur EGF et de trois domaines de fibronectine de type III⁴⁵ (Fig.1.3). Tie-1 et Tie-2 ont 76% d'homologie au niveau des séquences d'acides aminés dans les domaines intracellulaires, et 33% dans les domaines extracellulaires ayant ainsi une structure protéique globale similaire⁴⁶.

Les récepteurs Tie ont été identifiés à l'origine comme des récepteurs orphelins, pour lesquels aucun ligand n'avait été identifié. Quelques années plus tard, l'Ang-1 a été isolée comme ligand pour Tie-2⁴⁷. Par la suite, le clonage par homologie d'ADN a identifié Ang-2 et les orthologues de souris et d'humains, Ang-3 et Ang-4^{48, 49}. Tie-1 est encore aujourd'hui un récepteur orphelin sans aucun ligand spécifique, mais il a été récemment démontré qu'il s'hétérodimérise avec Tie-2 et régule son activité⁵⁰.

Les récepteurs Tie-1 et Tie-2 sont essentiels à la maturation des vaisseaux sanguins. Chez des embryons de souris n'ayant plus de Tie-1, les étapes initiales de l'angiogenèse ne sont pas affectées, cependant lors de la maturation, les vaisseaux perdent leurs intégrités, ce qui cause

des oedèmes et des hémorragies répandus et mène à la mort entre E13.5 et la naissance⁵¹. Tie-1 n'est pas nécessaire pour la différenciation des angioblastes dans la croissance des vaisseaux prématurés⁴⁴. Tie-1 joue cependant un rôle important dans la prolifération des CEs à des stades ultérieurs dans le développement de l'angiogenèse⁵².

Chez des souris knock-out Tie-2, les embryons meurent entre E9.5 et E12.5^{53,54}. Ces embryons réussissent à évoluer au cours des premiers stades du développement vasculaire, mais, la vascularisation ne se développe pas au-delà du plexus capillaire qui n'est pas organisé avec un nombre réduit de CEs, de branches vasculaires et avec un manque important de péricytes et de CMLV. L'hématopoïèse et le développement de l'endocarde cardiaque sont altérés chez les embryons déficients en Tie-2. Ainsi, il a été proposé que Tie-2 n'est pas nécessaire à la différenciation des CEs mais plutôt pour leur prolifération et leur maintien⁵³.

Les embryons de souris dépourvus à la fois de Tie-1 et Tie-2, présentent un phénotype plus sévère par rapport aux embryons n'ayant uniquement que Tie-2 excipé⁵⁵. À E10.5, les deux récepteurs ne semblent pas être nécessaires pour l'assemblage initial du système vasculaire, sauf pour la présence cruciale de Tie-2 dans l'endocarde vasculaire. Les deux récepteurs sont cependant importants pour la formation de la microvascularisation au cours de l'organogenèse tardive et dans les vaisseaux sanguins matures⁵⁶.

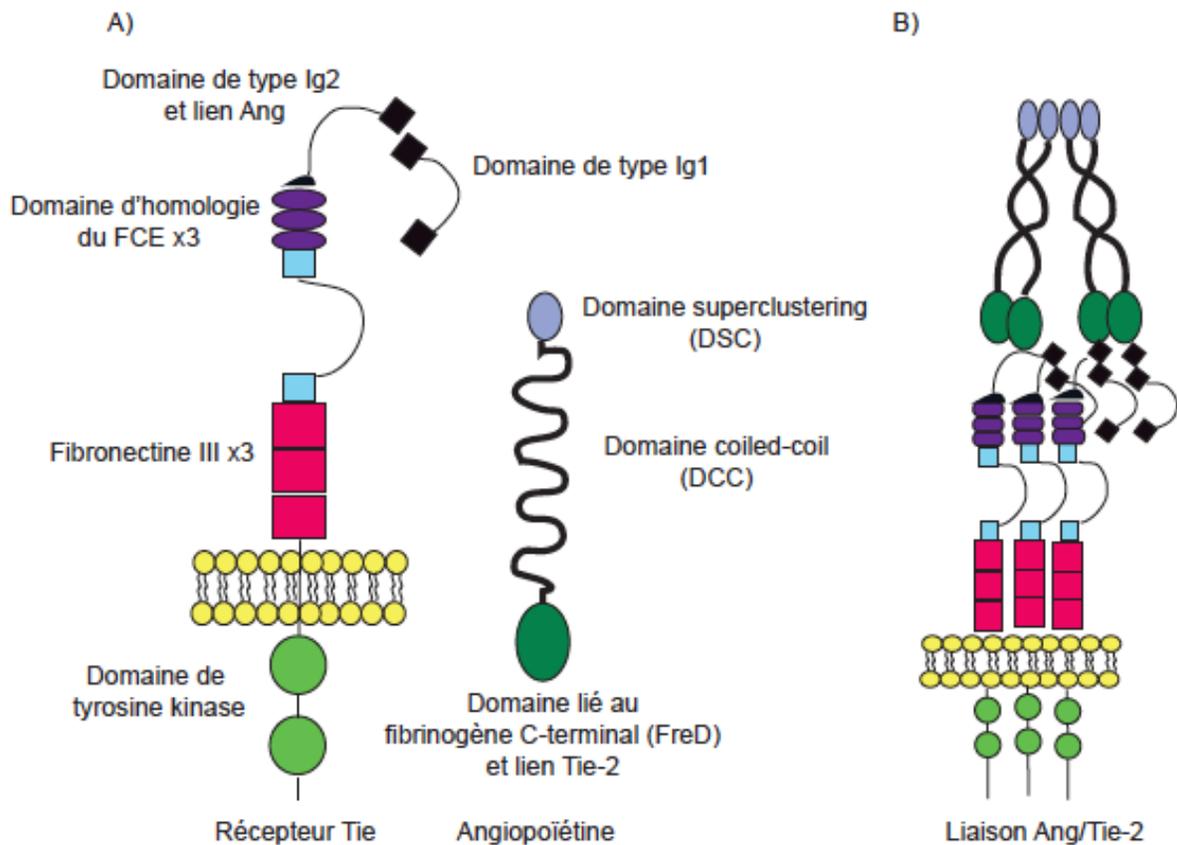


Figure 1.4 Structure moléculaire des récepteurs Tie et des ligands de l'angiopoïétine

A) La région extracellulaire consiste en deux domaines analogues à l'immunoglobuline (Ig), trois domaines EGF, d'un autre domaine de type Ig et de trois domaines de fibronectine de type III. Les angiopoïétines se lient au second domaine de type Ig. Les angiopoïétines sont composées d'un DSC qui permet aux homodimères de former des multimères. Le DCC est responsable de l'homo-oligomérisation du ligand. Enfin, la liaison des angiopoïétines à Tie-2 est médiée par un domaine lié-fibrinogène. B) Les angiopoïétines lient le récepteur Tie-2 en tant que multimères. Le regroupement de molécules liant le récepteur cause le rapprochement des domaines kinases ce qui permet une phosphorylation en trans et active ainsi le récepteur. Modifié à partir de référence⁵⁷.

1.3.2 Les angiopoïétines

Les angiopoïétines, les ligands du récepteur Tie-2, forment une famille de glycoprotéines sécrétées d'environ 70 kDa agissant principalement sur le système vasculaire pour contrôler le développement et la stabilité des vaisseaux sanguins ⁵⁸. Les angiopoïétines se lient au second motif d'Ig de Tie-2 par lequel elles activent Tie-2 et indirectement Tie-1 dans les hétérodimères Tie-1/Tie-2 ^{45, 59} (Fig 1.3).

La structure des angiopoïétines est constituée d'un domaine de similitude au fibrinogène en C-terminal qui est responsable de lier le récepteur, d'un domaine central « coiled-coil » (DCC) qui est responsable de l'homo-oligomérisation de ligand, et d'un domaine « super clustering » (DSC) en N-terminal qui regroupe les complexes homo-oligomères. Ang-1 et Ang-2 forment des dimères, des trimères et des tétramères ^{60, 61} et Ang-1 peut également s'assembler en multimère d'ordre supérieur via son domaine de domaine de superclustering DSC ⁶⁰. Seules les formes tétramériques ou multimériques d'Ang-1 activent Tie-2, tandis que l'oligomère Ang-2 est un agoniste faible dépendant du contexte de Tie-2 et peut même antagoniser l'activation de Tie-2 induit par Ang-1. Lors de la liaison à Ang-1, les molécules du récepteur Tie-2 se regroupent pour rapprocher leurs domaines kinases et permettre la phosphorylation en trans et l'initiation de la transduction du signal en aval.

Les souris déficientes en Ang-1 meurent entre E11.5 et E12.5 avec des phénotypes comparables à ceux d'embryons déficients en Tie-2, c'est à dire avec des vaisseaux dilatés et une diminution de la complexité du réseau vasculaire ⁵⁴. En outre, les cellules périvasculaires et la membrane basale sont à peine associées aux vaisseaux sanguins. Inversement l'expression transgénique d'Ang-1 dans la peau entraîne une augmentation du diamètre des vaisseaux, principalement dans

les capillaires. Ces vaisseaux contiennent un nombre accru de CEs et sont couverts de façon excessive par des péricytes ⁶². Ainsi, l'Ang-1 est un agoniste unique non redondant de Tie-2 requis pour la survie, la prolifération des CEs, et pour la maturation des vaisseaux. Les souris doubles-transgéniques exprimant Ang-1 et VEGF contrôlent l'angiogenèse à des niveaux distincts, VEGF induit le bourgeonnement et la croissance vasculaire tandis que Ang-1 induit le remodelage et la maturation des vaisseaux ⁶². De ce fait, l'expression combinée de VEGF avec l'Ang-1 induit la formation de vaisseaux hautement différenciés, couverts de péricytes ⁶².

Les souris déficientes en Ang-2 sont viables, mais développent de l'ascite chyleuse, la présence de liquide dans la cavité péritonéale due à une fuite lymphatique, quelques jours après la naissance. En fonction des lignées de souris, les souris déficientes en Ang-2 meurent dans les quatorze premiers jours après leur naissance ou se développent normalement jusqu'à l'âge adulte avec peu de létalité postnatale ^{63,64}. Elles ont cependant des défauts vasculaires persistants à l'âge adulte. Il a été montré que les niveaux d'Ang-2 sont élevés dans un certain nombre de maladies associées à un dysfonctionnement vasculaire dont les troubles inflammatoires telle que la septicémie ⁶⁵. Les souris déficientes en Ang-2 montrent en effet, une réponse diminuée aux insultes inflammatoires ⁶³. De plus, l'expression d'Ang-2 dans l'endothélium favorise la mobilisation des cellules myéloïdes dans la moelle osseuse et leur adhésion par la signalisation de l'intégrine $\beta 2$ ⁶⁶. Plusieurs études ont révélé que l'expression systémique et spécifique d'Ang-2 dans des tissus du derme entraîne une létalité embryonnaire à E9.5-10.5 ^{67,68}.

Les angiopoïétines les moins bien étudiés de la famille sont Ang-3 et Ang-4. Ils ont différentes distributions tissulaires : Ang-3 est exprimé dans plusieurs tissus de souris tandis que Ang-4 est spécifiquement présent dans les poumons chez l'Homme. Ang-4 phosphoryle Tie-2, alors que Ang-3 ne phosphoryle pas Tie-2 et inhibe la phosphorylation induite par Ang-1 de Tie-2 dans

les CEs humaines⁴⁸. Des études ultérieures ont démontré que Ang-3 et Ang-4 sont des agonistes de la signalisation des récepteurs Tie-2, Ang-3 étant un ligand spécifique chez la souris pour les récepteurs Tie-2⁶⁹. Conformément à cette notion, Ang-3 et Ang-4 sont tous les deux capables d'induire l'angiogenèse *in vivo*⁶⁹.

1.4 Fonctions biologiques de l'axe Ang-1/Tie-2

1.4.1 Rôle de Tie2 et Ang-1 dans la régulation des interactions CE-CE

Ang-1 induit la survie des CEs, inhibe la perméabilité vasculaire et réduit l'inflammation vasculaire. Afin de promouvoir la survie des CEs, Ang-1 active la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) et induit ensuite la phosphorylation d'Akt qui joue un rôle essentiel dans la survie cellulaire^{70, 71}. Les activités proapoptotiques des substrats Akt sont inhibées par la phosphorylation par Akt, ce qui entraîne la survie cellulaire⁷². Ang-1 réduit la perméabilité vasculaire en renforçant l'adhésion interendothéliale régulée par PECAM-1 et VE-cadhérine⁷³. Le monoxyde d'azote (NO) est un vasodilatateur contribuant à l'induction des propriétés proangiogéniques du VEGF. Le NO est libéré par les CEs après une activation de l'oxyde nitrique synthétase endothéliale (eNOS), une isoforme spécifique aux CEs de l'enzyme productrice de NO. Nous avons montré que Ang-1 diminue la perméabilité vasculaire induite par le VEGF. En effet, nous avons observé que l'Ang-1 interfère avec la libération de NO-stimulée par VEGFR-2 et que cet effet est induit par Tie-2⁷⁴. Ceci suggère que le blocage de la production de NO par Ang-1 cause l'inhibition de la perméabilité endothéliale. Nos résultats

montrent que l'Ang-1 induit l'augmentation, via la kinase PKC, de la phosphorylation de Thr⁴⁹⁶ dans la eNOS, ce qui inhibe son activité.

Ang-1 protège également les CEs de l'inflammation induite par le VEGF en inhibant l'expression de ICAM-1 et VCAM-1 sur les CEs, contrôlant la migration des cellules inflammatoires⁷⁵. De nombreuses études indiquent que l'adhérence cellule-cellule endothéliale et la signalisation Ang-1-Tie-2 régulent de manière coopérative la survie des CEs et l'intégrité vasculaire pour maintenir le système vasculaire établi. Ang-1 est produit à partir de cellules murales qui supportent les CEs. Ainsi, l'adhérence intercellulaire et l'adhérence des CEs-murales sont importantes pour le maintien de l'intégrité vasculaire. En revanche, il est à noter que l'Ang-2 produit dans les CEs et stockés dans les corps Weibel-Palade est libéré pour induire une inflammation, entraînant une déstabilisation de l'adhésion des CEs⁷⁶. L'Ang-1 fournit un signal basal pour promouvoir et maintenir la quiescence et l'intégrité de l'endothélium tandis que l'Ang-2 supprime ces effets.

1.4.2 Rôle de Tie2 et Ang-1 dans la régulation des interactions CE-matrice extracellulaire (MEC)

Les CEs des embryons déficients en Ang-1 sont arrondies et faiblement associées à la matrice sous-jacente, ce qui suggère que l'Ang-1 régule les interactions entre les CEs et la MEC^{54, 77}.

Dans des cellules confluentes, Tie-2 est recruté au niveau des frontières intercellulaires, alors qu'il est plutôt localisé aux sites de contacts cellule-MEC en l'absence de contacts cellule-cellule. Au niveau des contacts cellule-cellule, des ponts Ang-1 oligomérisés Tie-2 dans des cellules adjacentes entraînent la formation d'une association *trans* Tie-2 homophile. En

revanche, en l'absence d'adhérences cellule-cellule, Tie-2 est ancré à l'interface cellule-MEC via la liaison Ang-1 à l'MEC ⁷⁸.

Akt est préférentiellement activé par Ang-1 en présence de contacts cellule-cellule. L'activité de la eNOS est induite par Ang-1 qui est un substrat d'Akt. En revanche ERK1/2 est activé en l'absence de contacts cellule-cellule ⁷⁹. Dans la cellule dépourvue d'adhérences cellule-cellule, Ang-1 induit la formation de complexes focaux dépendants de l'intégrine, conduisant à l'activation de la kinase d'adhésion focale (FAK). FAK est impliqué dans l'activation d'ERK1/2 par l'intermédiaire des intégrines. Les complexes *trans*-Tie-2 qui se trouvent aux contacts cellule-cellule induisent une activation préférentielle des voies Akt tandis que Tie-2 ancré à l'MEC la voie ERK1/2.

Chez des embryons n'ayant pas d'Ang-1, leurs MBs ne sont pas complètement formées ⁷⁷. *In vitro*, l'Ang-1 stimule l'expression du collagène de IV qui est un constituant majeur des MBs. Cette stimulation se fait principalement via le signal Ang-1/Tie-2 qui potentialise le signal Notch basal contrôlant l'équilibre vasculaire en régulant à la hausse Dll4 par activation de la β -caténine induit par Akt ⁸⁰. Un manque en Ang-1 engendre une fibrose tissulaire excessive dans les pathologies chez la souris adulte, suggérant que Ang-1 limite la fibrose périvasculaire, en neutralisant la signalisation de TGF β ⁷⁷.

Tie-2 est connu pour interagir avec la VE-PTP, qui joue un rôle important dans le maintien de la stabilité vasculaire ⁸¹. Le VE-PTP s'associe également à la VE-cadhérine par la tyrosine, limitant ainsi la perméabilité vasculaire ⁸². Le VE-PTP co-localise avec Tie-2 aux contacts cellule-cellule, mais non aux contacts cellule-MEC ⁵⁹. En outre, il a été suggéré que Tie-2 et VE-PTP réduisent de manière coopérative la monocouche de CEs ⁵⁹. Ainsi, le complexe *trans*-

Tie-2 peut former un groupe avec VE-PTP aux contacts cellule-cellule, maintenant de cette manière l'équilibre vasculaire (Fig 1.5).

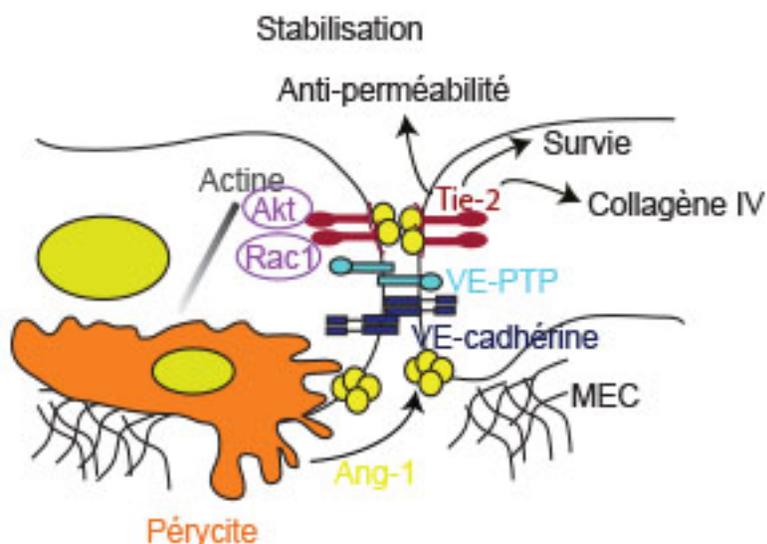


Figure 1.5 Modèle pour la signalisation Tie-2/Ang-1 dans un endothélium au repos

Ang-1 stabilise le système vasculaire en supprimant les réponses des CE pendant le stress vasculaire ⁷⁷. Les complexes Ang-1/Tie-2 s'assemblent en *trans* aux jonctions CE-CE, favorisant l'adhésion CE-CE et la survie des CE via l'activation d'Akt^{79, 83}. La VE-PTP fait partie du complexe Ang-1-Tie-2 qui améliore la fonction de la barrière CE avec VE-cadhérine^{83, 84}. Modifié à partir de référence ⁸⁵.

1.4.3 Migration cellulaire

1.4.3.1 Ang-1 et la migration des CE

Ang-1 stimule la migration des CE ^{86, 87, 88} et cela nécessite Tie-2 comme le montrent les expériences faites sur des souris déficientes en Tie-2 ⁸⁹. Les voies de signalisation par lesquelles Ang-1 stimule la migration endothéliale impliquent à la fois PI3K et la protéine adaptatrice Dok-R. Après l'activation de Tie-2, Dok-R est recruté sur le récepteur et devient phosphorylé en créant des sites d'interaction pour la kinase activatrice Nck et Pak1 ⁹⁰. Le recrutement de Dok-

R sur Tie-2 activé est essentiel pour la migration ⁹⁰. Cette liaison à Tie-2 nécessite à la fois des domaines de liaison phosphotyrosine (DPT domain) et des domaines homologues de la pleckstrine (PH domain) de l'adaptateur, le DPT interagissant avec Y¹¹⁰⁸ phosphorylée sur Tie-2 et le domaine DP étant impliqué dans la localisation de la membrane PI3K-dépendante ⁸⁹. La protéine adaptatrice ShcA est également recrutée par Tie-2 après une stimulation d'Ang-1 et semble jouer un rôle dans la migration et l'organisation ⁹¹. L'augmentation de la motilité endothéliale en réponse à Ang-1 implique également les GTPase RhoA et Rac1 comme indiqué par leur activation en réponse à l'Ang-1 ainsi que la capacité des formes dominantes négatives des GTPases à supprimer la capacité des CEs à se déplacer, lors d'une stimulation par Ang-1 ⁸⁸.

92 .

Notre laboratoire a élucidé un des mécanismes favorisant la migration collective et directionnelle. L'Ang-1 induit la formation d'un complexe formé de protéine kinase C atypique (PKC ζ) et β -caténine aux JA ainsi qu'au front de migration des CEs. Ce complexe rassemble les protéines Par3, Par6 et des protéines de JA au front de migration ce qui induit la migration cellulaire dirigée et active localement Rac1 en réponse à l'Ang-1. En effet, la VE-cadhérine permet de maintenir via ses attachements intercellulaires, une migration collective. Cela suggère que la VE-cadhérine peut agir en tant qu'échafaud au front de migration pour le complexe de polarité et que les protéines de polarité et de JA agissent de façon coopérative lors de la migration collective. Nos résultats ont montré que lors de la migration collective, Ang-1 active Rac1 qui est un effecteur de PKC ζ . D'autres GTPases que Rho seraient cependant activées lors de migration unicellulaire après une stimulation par Ang-1 ⁹³.

1.4.3.2 Migration collective

Le développement d'organismes multicellulaires implique des mouvements morphogénétiques, dans lesquels de grands groupes de cellules migrent de manière coordonnée pour contribuer à la formation des tissus et des organes^{94, 95}. La migration collective se produit également chez l'adulte pendant la cicatrisation, le renouvellement tissulaire, l'angiogenèse et a été impliquée dans la propagation de la tumeur⁹⁶. Lors de la migration collective, plusieurs cellules migrent dans la même direction à une vitesse similaire. De plus, ces cellules coordonnent leur réponse à l'environnement, assurant que les cellules qui seraient autrement immobiles ou qui migreraient dans une direction différente suivent le mouvement global. Ainsi, la principale caractéristique d'un groupe de cellules migrant collectivement est qu'il migre plus efficacement que si les cellules étaient isolées. Bien que les cellules individuelles aient une vitesse instantanée plus élevée, elles subissent une migration moins persistante, changent rapidement et fréquemment de direction. Un tel comportement collectif implique une diaphonie physique ou chimique entre des cellules migrantes individuelles.

In vivo, la migration collective est fréquemment favorisée par des facteurs solubles tels que les chimiokines ou les facteurs de croissance. Par exemple, la migration collective des CEs est essentiellement induite par VEGF, mais peut également être soutenue par Ang-1 et d'autres cytokines, ainsi que par le NO qui initie la migration directionnelle des cellules-pionnières et la formation des vaisseaux sanguins. Les cellules dirigeantes sont essentielles dans la détection des facteurs solubles environnementaux pour favoriser la chimiotaxie de l'ensemble du groupe de cellules migrantes.

Les facteurs solubles favorisent le comportement collectif des cellules de deux manières différentes. Premièrement, la signalisation à travers des récepteurs de facteurs de croissance ou

des chimiokines comme la signalisation par des intégrines, induit une polarisation et des protrusions cellulaires. La signalisation par des facteurs de croissance ou des récepteurs de chimiokines se produit fréquemment par le recrutement polarisé et l'action d'une boucle de rétroaction positive PI3K et Rac conduisant à des réarrangements d'actine et à une protrusion membranaire. De plus, certaines intégrines s'associent aux récepteurs de la tyrosine kinase ou aux récepteurs couplés aux protéines G pour activer les voies de signalisation nécessaires à l'invasion tumorale ⁹⁷. Le VEGF affecte la signalisation de l'intégrine en régulant l'expression de l'intégrine ou la phosphorylation de FAK ^{98, 99}. Cette interaction entre l'intégrine et les récepteurs chimiotactiques est mise en évidence par le fait que la chimiotaxie collective nécessite une adhérence des cellules à la MEC. Deuxièmement, les facteurs chimiotactiques induisent une signalisation intracellulaire qui contrôle en fin de compte l'expression des gènes et définit les caractéristiques des cellules au front. La cellule la plus sensible à ces facteurs de croissance devient le leader de son groupe.

1.4.3.3 Rôle et dynamique des jonctions adhérentes dans la migration collective

Lorsque des cellules migrent, celles au front sont reliées entre elles par des structures adhésives, y compris des JA, pour former une ligne de front. Les cadhérines sont les principales composantes transmembranaires des JA. Elles interagissent avec les réseaux d'actine et de microtubules et les contrôlent via des caténines telles que p120, α -et β -caténine. En raison de leur association étroite avec le cytosquelette d'actine, les JA sont essentielles au maintien de l'intégrité du groupe cellulaire migrant.

Des JA induites par les cadhérines sont requises pour la chimiotaxie cellulaire, suggérant qu'aucune cellule individuelle, même une cellule-pionnière, ne peut interpréter le gradient

chimiotactique sans interagir avec ses voisines. Plusieurs études ont montré une relation antagoniste entre les jonctions composées de cadhérines et l'adhérence des CEs à la MEC via les intégrines^{100, 101}. Des contacts induits par des cadhérines sont nécessaires pour la polarisation des cellules et pour le mouvement dirigé. En fait, la distribution anisotrope des JA est suffisante pour favoriser la polarisation cellulaire¹⁰¹. En l'absence de JA, les intégrines interagissent de manière constitutive avec la MEC le long de la périphérie cellulaire¹⁰². Lors des bourgeonnements vasculaires, seules une ou deux cellules de tête dirigent le mouvement, et leurs contacts cellule-cellule sont pour la plupart situés à l'arrière. Ces contacts limités contribuent à la polarisation cellulaire en limitant la formation de protrusion et en favorisant la contractilité cellulaire à l'arrière de la cellule par l'intermédiaire de l'inhibition de la locomotion par contact.

Le maintien et le contrôle dynamique des contacts cellule-cellule sont cruciaux pour éviter des changements trop fréquents de direction et pour préserver la cohésion des leaders migrants. Les JA subissent un flux rétrograde continu dirigé par l'actomyosine le long des côtés latéraux des cellules migrantes adjacentes dans les essais de cicatrisation des plaies¹⁰³. La cadhérine est principalement intériorisée à l'arrière de la cellule puis recyclé au front de migration où elle s'accumule avant d'être incorporé dans la formation des JA lors des contacts latéraux cellule-cellule¹⁰³. Cette dynamique rend les contacts intercellulaires très malléables, tout en maintenant la résistance mécanique des jonctions d'ancrage entre les cellules adjacentes pendant la migration. Les JA situés entre les leaders sont connectés à des câbles d'actine épais et affichent une morphologie étirée, indiquant que les forces importantes sont exercées entre les cellules adjacentes¹⁰³. Le complexe de cadhérine qui est étroitement associé au cytosquelette par l'intermédiaire d'adaptateurs de caténine, peut synchroniser la dynamique du flux d'actine

rétrograde dans les cellules au front migratoire. L'interaction induite par la JA entre les câbles d'actine contractile des cellules adjacentes peut également participer à la formation d'un câble actomyosine reliant latéralement toutes les cellules de la plaie.

1.5 Les GTPases

1.5.1 Régulation du « switch » GDP/GTP

L'histoire des petites GTPases (guanosine triphosphatases) a commencé il y a plus de trois décennies avec la découverte de l'oncogène Ras qui fut suivi d'une vague de découvertes de protéines apparentées formant la superfamille des petites GTPases^{104, 105}. Les petites GTPases sont maintenant des régulateurs établis d'un nombre important de fonctions qui sont au cœur de la dynamique du cytoplasme cellulaire. La superfamille de Ras est composée de cinq sous-familles groupées selon leurs structures, séquences et fonctions : Ras, Rho, Ran, Rab et Arf. Les GTPases de la famille de Ras sont des protéines G qui ont un poids moléculaire entre 20 et 25 kDA. Chaque sous-famille s'associe à des familles de GEFs et des GAPs et pour certains d'entre eux, des GDI, chacun avec des domaines d'échange de nucléotides spécifiques aux sous-familles. Elles alternent entre des formes liées à la guanosine triphosphate (GTP), une coenzyme de transfert de groupements phosphate, et à la guanosine diphosphate (GDP), le produit de la déphosphorylation de la GTP qui diffèrent par la morphologie de leurs domaines de liaison au GTP « switch » 1 et « switch » 2¹⁰⁶ (Fig. 1.6). La forme liée au GDP est généralement considérée comme inactive, tandis que la forme liée au GTP active des voies de signalisation en aval en se liant aux effecteurs. Puisque le GDP est généralement lié de façon étroite, et que le GTP est hydrolysé très lentement, les petites GTPases nécessitent l'aide des facteurs d'échange de nucléotides guanyliques (GEF) qui facilitent la dissociation du GDP et la liaison du GTP ainsi

que des protéines activant les GTPases (GEF) qui stimulent l'hydrolyse du GTP ¹⁰⁷. Pour certaines petites GTPases portant un groupe farnésyle ou géranylgeranyle dans leur extrémité C-terminale, l'alternance GDP/GTP se combine avec l'alternance de localisation cytosol/membrane, qui est induit par les inhibiteurs de dissociation de la guanine (GDI) formant des complexes solubles avec de petites GTPases en protégeant leur lipide.

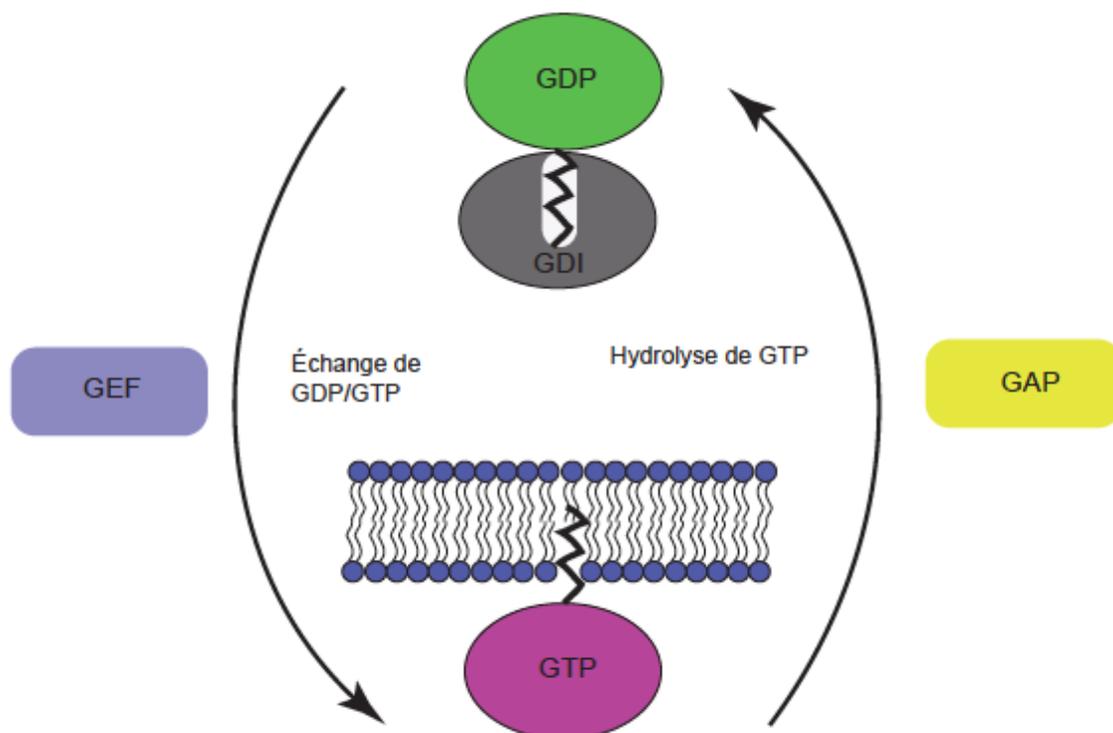


Figure 1.6 Le switch GDP/GTP de base. La régulation du switch GDP/GTP par GEFs, GAPs et les GDIs

Toutes les petites GTPases sont activées par un échange GEDP/GTP stimulé par des GEF et inactivé par une hydrolyse de GTP stimulée par des GAP. Plusieurs familles de GTPases combinent également leur switch GDP/GTP avec une alternance cytosol/membrane régulée par

des GDI. Chaque petite sous-famille de la GTPases est régulée par des sous-familles GEF et GAP spécifiques. Modifié à partir de référence ¹⁰⁸.

Toutes les petites GTPases sont constituées d'un domaine conservé composé de six feuillets β entourés de cinq hélices α . Ce domaine est composé du site de liaison du nucléotide guanine constituée de motifs conservés qui reconnaissent la base guanine, le phosphate, l'ion de magnésium ainsi que des motifs qui détectent la nature du nucléotide lié et qui sont impliqués dans l'hydrolyse du GTP (switch 1 et 2) ¹⁰⁶. Les contributions de « switch » 1 et « switch » 2 à la liaison nucléotidique varient parmi les petites GTPases. Chez les GTPases Ras, Rab et Rho, le « switch » 1 interagit avec la base guanine ou avec le sucre du GDP et GTP, tandis que chez les protéines Ran, Arf, il est éloigné du GDP et subit un grand changement conformationnel pour lier GTP. Pour toutes les GTPases activées, « switch » 1 apporte une thréonine invariante qui lie Mg^{2+} et le phosphate du GTP. Les petites GTPases régulent une grande variété de processus dans la cellule, y compris la croissance, la différenciation cellulaire, le mouvement cellulaire et le transport des vésicules lipidiques.

1.5.2 Les GTPases Rho

Les GTPases Rho (22 membres retrouvés chez les mammifères) signalent au cytosquelette et au transport vésiculaire, notamment en régulant la dynamique de l'actine. Les membres les mieux étudiés de la famille Rho GTPases sont RhoA, Rac1 et Cdc42. Ils contribuent à de nombreux aspects du comportement cellulaire, tels que la migration cellulaire, la division cellulaire et la contraction ¹⁰⁹. Ces petites GTPases sont donc importantes dans divers processus biologiques tels que la croissance axonale, l'infiltration leucocytaire dans les tissus et l'angiogenèse ¹¹⁰.

Par exemple, la régulation de l'intégrité de la barrière endothéliale est perturbée dans de nombreuses pathologies vasculaires et implique non seulement RhoA mais aussi Rac1 et Cdc42^{111, 112}.

Les GEFs et les GAPs agissant sur les membres de la famille Rho sont plus nombreux que leurs cibles. Les protéines de la famille Dbl sont la principale classe reconnue de GEF pour la famille Rho. L'appartenance à la famille Dbl de RhoGEF dépend uniquement de la possession d'un segment de 300 acides aminés contenant un domaine PH¹¹³. Alors que les domaines PH existent dans une multitude de protéines de signalisation, le domaine DH est unique à ces RhoGEF, et constitue donc la partie catalytique primaire d'une protéine Dbl en soutenant l'activité d'échange nucléotidique dans un substrat Rho GTPases *in vitro* et *in vivo*¹¹⁴. Les GTPases Rho sont régulées à la baisse par les GAP possédant un domaine catalytique RhoGAP unique¹¹⁵. Un lipide farnésyle ou un lipide géranylgeranyle à l'extrémité C-terminale des Rho GTPases déterminent leurs localisations dans la cellule. Ce sont les inhibiteurs de dissociation GDP Rho (RhoGDI; 3 membres chez les mammifères) qui agissent comme régulateurs positifs de la régulation des activités de Rho en contrôlant l'ajout de lipides géranylgeranyls qui restreint spatialement Rho dans la cellule¹¹⁶.

1.5.3 La petite GTPase RhoA

À la fin des années 1990, des données ont montré que la petite GTPase RhoA, joue un rôle essentiel dans de nombreuses pathologies vasculaires, notamment l'hypertension, les vasospasmes et dans les fuites vasculaires¹¹⁷. RhoA est connue pour contrôler de nombreux

processus cellulaires incluant la dynamique du cytosquelette et les microtubules, la régulation de l'expression des gènes ainsi que la progression du cycle cellulaire.

L'activation de RhoA contribue notamment à augmenter la perméabilité de la barrière endothéliale ¹¹¹. En effet, RhoA provoque l'apparition de fibres de stress et augmente la contractilité menant à une perméabilité vasculaire plus élevée en réponse à une variété de stimuli extracellulaires incluant la thrombine et l'histamine. Des expériences indiquent que l'inhibition de la Rho kinase réduit la perméabilité de base des veinules-capillaires *in vivo* ainsi que dans différentes CEs *in vitro* ^{118, 119}. Rho A active la sérine/thréonine kinase ROCK, qui phosphoryle la sous-unité MYTP1 de la phosphatase de la chaîne légère de la myosine trimère (CLM), inhibant ainsi son activité enzymatique ^{120, 121}. Une phosphorylation de CLM subséquente conduit à l'augmentation de la contractilité de l'actomyosine. Curieusement, l'activation de RhoA par l'Ang-1 entraîne la stabilisation des jonctions cellule-cellule et inhibe la perméabilité par le VEGF et cette réponse est dépendante de la formine mDia1, une effectrice de Rho, mais non de ROCK ²⁹. Ceci suggère que l'effet de RhoA sur les jonctions dépend de l'activation de ROCK, favorisant la contractilité de l'actomyosine ou de mDia1, qui stimule la polymérisation de l'actine ¹²².

L'augmentation de la perméabilité reflète souvent la perte de protéines des JS ce qui stimule la signalisation RhoA/ROCK. Par exemple, ROCK favorise la phosphorylation de claudine-5 et occludine ¹²³. Le TNF α augmente la perméabilité en induisant une diminution de la claudine-5 aux jonctions via ROCK1 et ROCK2 ¹²⁴. Le lipopolysaccharide (LPS), une endotoxine qui cause l'inflammation, induit une perte de protéines des JS et une augmentation de la perméabilité endothéliale via l'activation de RhoA par p115RhoGEF ¹²⁵. Dans le complexe des JS, ZO-1 est lié à la cinguline, une protéine qui joue le rôle d'adaptateur entre ZO-1 et le cytosquelette

d'actine. La cinguline favorise la stabilisation de la barrière endothéliale *in vitro* et *in vivo* en partie en interagissant avec RhoA GEF-H1. C'est donc le site d'activation de RhoA ou des cibles qu'elle stimule, qui déterminera si la jonction est en rupture ou stabilisée.

1.5.4 La petite GTPase Rac1

L'activité de Rac1, en tant que modulateur du cytosquelette, est critique pour un certain nombre d'activités cellulaires normales, notamment la phagocytose, la migration cellulaire mésoenchymateuse, l'adhésion et la différenciation de plusieurs types de cellules ¹²⁶. Rac1 joue également un rôle majeur dans le contrôle d'autres voies de signalisation impliquées dans la croissance cellulaire et la régulation du cycle cellulaire ¹²⁷, la formation de l'adhésion cellule-cellule ¹²⁸ et le processus d'inhibition de contact ¹²⁹. Ces activités induites par Rac1 sont centrales dans les processus telles que l'angiogenèse et la métastase.

Rac1 active principalement les kinases telles que Pak1, Pak2, Pak3. Les Paks kinases sérine/thréonine qui phosphorylent et activent les kinases LIM liant l'actine qui à leur tour phosphorylent et inactivent la cofiline. La cofiline lie les filaments d'actine, inversant le processus de polymérisation provoqué par l'activité Arp2/3 convertissant les filaments de F-actine en monomères de G-actine. En inactivant la cofiline, ces voies permettent la croissance des filaments d'actine ¹³⁰. Rac1 provoque également, avec la protéine adaptatrice Nck, la dissociation de Wave1, ce qui favorise la polymérisation de l'actine et favorise la stabilisation des jonctions intercellulaires.

Rac1 régule une panoplie de fonctions cellulaires impliquées dans la morphogénèse. Une diminution à la fois de Cdc42 et de Rac1 rend les CEs incapables de former des vaisseaux

sanguins et bloquent l'invasion des CEs dans la matrice de collagène ⁷⁹. La migration mésoenchymateuse induite par Rac1 est importante dans les étapes initiales de la néoangiogenèse et la séparation de la nouvelle vascularisation dans les vaisseaux sanguins. Des souris ayant des niveaux de Rac1 plus faible dans l'endothélium présentent une hémorragie et un œdème dû au fait que l'absence de Rac1 dans les CEs altère la transition entre les CEs sanguines et les CEs lymphatiques ¹³¹. Rac1 joue également un rôle important dans la coordination de la formation initiale des adhérences cellule-cellule ¹³², qui ont une fonction importante dans l'assemblage des CEs dans la structure des vaisseaux et la maturation du nouveau système vasculaire. Une micro-injection de plasmides contenant des constructions Rac dominantes négatives dans les CEs vasculaires humaines les rend incapable de subir des changements morphologiques qui entraînent la formation capillaires ¹³³.

1.5.5 La petite GTPase Cdc42

La protéine Cell division cycle 42 (Cdc42) a émergé comme un régulateur crucial de la formation des vaisseaux sanguins et de la tubulogenèse ^{134, 135}. Des études montraient déjà il y a dix ans que Cdc42 était essentiel pour la formation de l'endothélium vasculaire *in vitro* ¹³⁴ et *in vivo* ¹³⁶. De nombreuses fonctions ont depuis été attribuées à Cdc42, telles que la régulation de l'exocytose et l'excrétion de VEGFR2 induit par Adam17 ¹³⁷. Au cours du développement tissulaire des mammifères, Cdc42 est omniprésent au niveau transcriptionnel et est nécessaire au développement de nombreux tissus, y compris le système vasculaire embryonnaire ¹³⁸.

La protéine Cdc42 est particulièrement importante pour le contrôle du cytosquelette. En effet, de nombreuses études ultérieures faites sur des levures ont souligné le mécanisme par lequel

Cdc42 contrôle la contractilité du cytosquelette et de l'actomyosine. De plus, l'inhibition de Cdc42 dans les cellules souches embryonnaires, aboutit à une actine filamenteuse désorganisée et à une incapacité à polymériser l'actine induite par PIP2¹³⁹. Une diminution de Cdc42 aurait donc des répercussions sur de nombreux processus physiologiques, car l'actine est essentielle pour l'adhésion cellulaire, la migration et la formation de filopodes et le trafic endocytaire^{140, 141}. Cdc42 régule également une multitude de protéines connues pour contrôler l'actine y compris Pak2, Pak4, Par6, MLCK, MRCK, N-Wasp, IRSp53 et la cofiline^{142, 143}.

De plus, Cdc42 influence l'adhésion cellulaire. Les jonctions cellulaires, à la fois cellule-cellule et MEC, sont ancrées au cytosquelette et sont affaiblies en l'absence de Cdc42¹⁴⁴. La perte de Cdc42 dans les cellules souches hématopoïétiques adultes entraîne des anomalies au niveau du cytosquelette et de l'adhérence cellulaire¹⁴⁰. La Cdc42 peut également contrôler les jonctions intercellulaires, régulant la perméabilité des vaisseaux¹⁴⁵. Une étude a montré que l'activation de Cdc42 pourrait restaurer la fonction de la barrière des vaisseaux sanguins en rétablissant les JA après la rupture de celle-ci par la thrombine¹⁴⁶.

1.6 La petite GTPase Rap1

1.6.1 Découverte de Rap1

Ras-related protein 1 (Rap1), une protéine G monomérique impliquée dans un large éventail de voies de signalisation, a été découverte par Noda et *al.*¹⁴⁷ en 1989 lors de la recherche de protéines capables de supprimer l'effet oncogénique de K-Ras. Lors de leurs recherches, les chercheurs ont transfecté des cellules NIH 3T3 avec une banque d'ADNc développée à partir

de fibroblastes humains. Normalement les fibroblastes NIH 3T3 portant le virus du sarcome murin Kirsten qui contient le gène v-Ki-Ras, se transforment en cellules malignes. Cependant, les chercheurs ont trouvé qu'un petit nombre de colonies étaient devenues résistantes aux capacités de transformation de la protéine v-Ki-Ras après une transfection avec l'ADNc. Ils ont d'abord déterminé que ces lignées cellulaires avaient en abondance une protéine de type p21-Ras. Plus tard, cette protéine a été caractérisée comme étant Kirsten-ras-revertant-1 (Krev-1) et comme étant très similaires à d'autres protéines Ras¹⁴⁸. Depuis lors, de nombreux groupes ont rapporté que la protéine Rap1 pouvait supprimer les actions de Ras en capturant sa protéine effectrice, Raf et en formant un complexe inactif¹⁴⁹. Simultanément, le groupe de Pizen et *al.*^{150, 151} a trouvé deux nouvelles protéines dans leur recherche d'homologues à Ras. Ces protéines ont été caractérisées comme Rap1 et Rap2. Plus tard, la protéine caractérisée comme Krev-1 a été déterminée comme étant la même protéine que Rap1. Rap1 a été retrouvé dans l'appareil Golgi¹⁵², dans les vésicules de lysosome¹⁵³, dans des structures péri-nucléaires¹⁵⁴, dans le noyau¹⁵⁵, à la membrane plasmique¹⁵⁶ et aux jonctions cellule-cellule endothéliales¹⁵⁷ et épithéliales¹⁵⁸.

L'activation de Rap1 se produit en réponse à la stimulation de plusieurs récepteurs membranaires tels que les récepteurs couplés à la protéine G, les récepteurs de tyrosine, les récepteurs de cytokines et les molécules d'adhésion cellulaire. La stimulation de ces récepteurs entraîne l'activation de Rap1 par l'intermédiaire de seconds messagers tels que l'AMP cyclique (AMPC), le Ca²⁺ et le diacylglycocol (DAG).

1.6.2 Rap1a et Rap1b

La famille de Rap1 est composée de deux isoformes : Rap1a et Rap1b. Elles partagent 95% de séquences homologues, mais sont codées par deux gènes distincts ¹⁵⁰ (Fig 1.7). La principale différence réside dans leurs C-terminal. Des études *in vivo* chez des souris ayant des niveaux de Rap1 diminués spécifiques aux CEs ont montré que les deux isoformes Rap1 sont impliquées dans la formation de nouvelles jonctions. Lorsqu'une des deux isoformes est manquante chez des souris modifiées génétiquement, cette formation est retardée dans les CEs en raison de la liaison VE-cadhérine diminuée ce qui résulte en une perméabilité vasculaire accrue et en une augmentation des dommages aux organes ¹⁵⁹. Cependant, après la formation de la barrière endothéliale seulement Rap1a est requise pour le maintien de l'intégrité vasculaire normale ¹⁶⁰.

		50
Rap1a	MREYKLVVLG SGGVVGKSALT VQFVQGIFVE KYDPTIEDSY RKQVEVD	CQQ
Rap1b	MREYKLVVLG SGGVVGKSALT VQFVQGIFVE KYDPTIEDSY RKQVEVD	AQQ
		100
Rap1a	CMLEILD TAG TEQFTAMRDL YMKNQGQGFAL VYSIT AQSTF NDLQDLREQI	
Rap1b	CMLEILD TAG TEQFTAMRDL YMKNQGQGFAL VYSIT AQSTF NDLQDLREQI	
		150
Rap1a	LRVKDTE DVP MILVGNKCDL EDERVVGKEQ GQNLARQW	CN CAFLESSAKS
Rap1b	LRVKDTE DVP MILVGNKCDL EDERVVGKEQ GQNLARQW	NN CAFLESSAKS
		180
Rap1a	KINVNEIFYD LVRQINRKTP VEKKKPKKKS CLLL	
Rap1b	KINVNEIFYD LVRQINRKTP VPGKARKKSS CQLL	

Figure 1.7 Comparaison des acides aminés entre Rap1a et Rap1b,

Rap1a et Rap1b ne diffèrent que par 9 résidus d'acides aminés. La figure ci-dessus montre un alignement de la séquence protéique de Rap1a et Rap1b humains; les acides aminés qui sont différents sont surlignés en rouge.

1.6.3 Le rôle de Rap1 dans les cellules endothéliales

1.6.4 La structure protéique de Rap1

La protéine Rap1 se compose de plusieurs domaines distincts. Ces domaines sont impliqués dans la liaison du nucléotide guanine, l'hydrolyse du GTP, la liaison des GAPs, des GEFs, des protéines effectrices et de la localisation de Rap1. Les principaux domaines impliqués dans la liaison nucléotidiques, l'hydrolyse, GAP, GEF et la liaison effectrices sont la boucle P avec son motif GXXXXGK/S (trouvé dans toutes les protéines liant la guanine), et les domaines de switch I et II ¹⁶¹.

1.6.5 L'hydrolyse du GTP

La durée de liaison de GTP par Rap1 détermine la spécificité, le moment et l'intensité du processus cellulaire. Par conséquent, non seulement la liaison du GTP est importante, mais également la régulation de l'hydrolyse du GTP afin de déterminer l'issue de l'activation de Rap1. La poche de liaison GTP de Ras et Rap1 comprend la région de boucle-P et les régions switch I et II (Fig 1.8). Tout comme Ras, Rap1 lie les nucléotides de guanine dans un complexe avec un ion Mg^{2+} . Mg^{2+} augmente l'affinité de Rap1 pour les nucléotides de guanine par des interactions avec les phosphates γ et β du GTP et du GDP respectivement, et par des interactions avec Rap1 ¹⁶².

Afin de permettre l'hydrolyse du GTP, une molécule d'eau nucléophile doit entrer dans la poche de liaison au GTP et engager une interaction avec le γ -phosphate du GTP, induisant ainsi l'hydrolyse du GTP. Pendant l'hydrolyse, une charge négative se développe sur le nucléotide,

diminuant l'énergie d'activation. La poche de liaison du GTP contient plusieurs donneurs de liaison hydrogène et des charges positives qui stabilisent les γ et β phosphates du GTP, supportant et stabilisant ainsi l'état de transition du nucléotide et accélérant l'hydrolyse. Une stabilisation plus poussée de l'état de transition est obtenue par l'orientation correcte de la molécule d'eau par rapport au phosphate γ . L'activité catalytique intrinsèque des GTPase est très faible et les GAP sont nécessaires pour augmenter la vitesse de réaction et mettre fin à l'activation.

Bien que Ras et Rap1 soient hautement homologues, il existe certaines différences qui ont un effet majeur sur le mécanisme d'hydrolyse du GTP. Tout d'abord, contrairement à Ras, Rap1 a un acide aminé de thréonine à la position 61 et ne peut donc aligner la molécule d'eau avec le γ -phosphate (Fig 1.7-A). De plus, les GAPs pour Rap1 et Ras montrent peu d'homologie. Les GAPs pour Rap1 ne contiennent pas de « arginine finger ». Cependant, les Rap1GAP ont un résidu d'asparagine à la position 290. Les Rap-GAPs utilisent le « arginine thumb » afin de positionner la molécule d'eau. Cette différence entre Ras-GAP et Rap1-GAP est subtile mais rend la régulation de Rap1 plus spécifique.

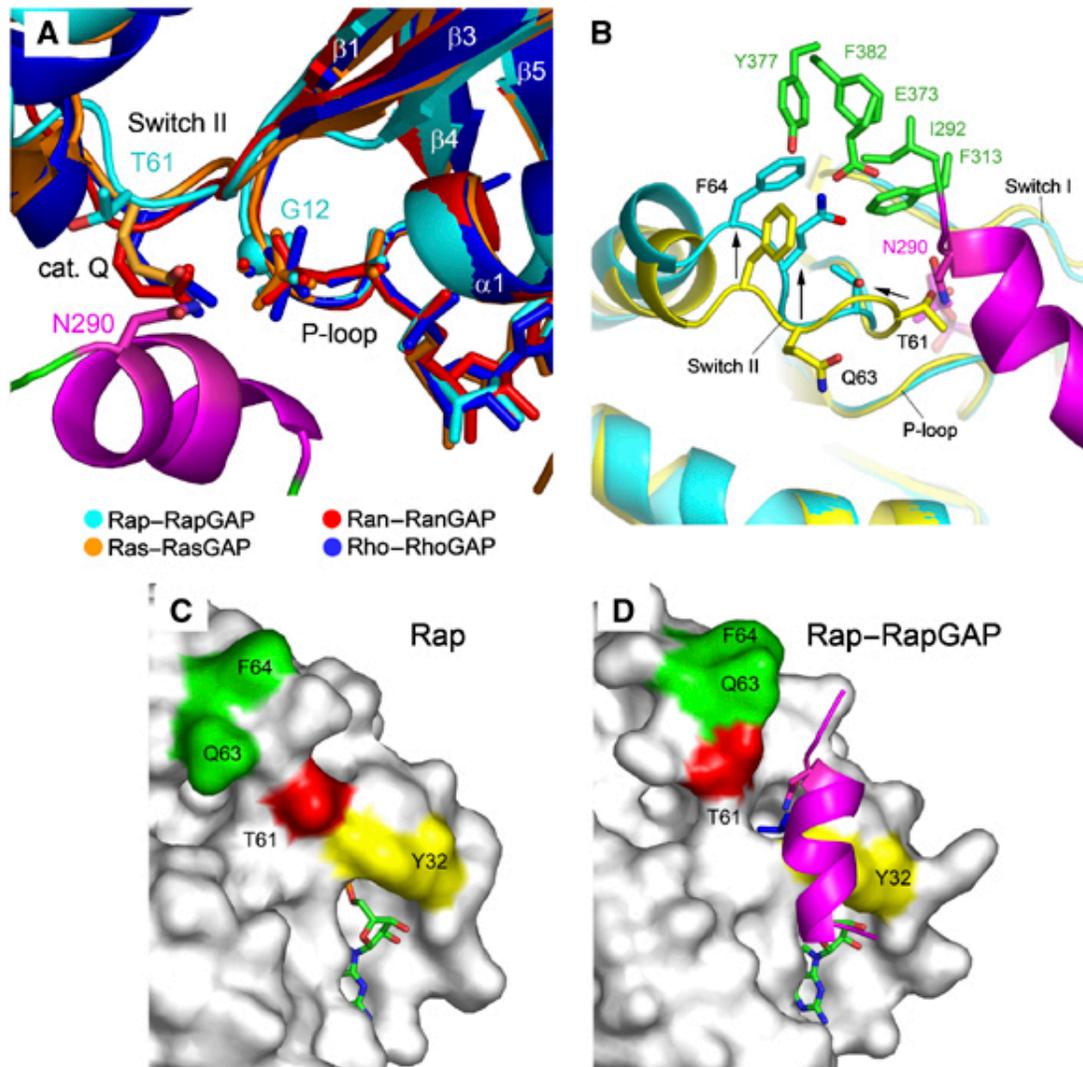


Figure 1.8 Éléments de la structure secondaire et la boucle P autour des sites actifs

Le site actif de Rap-Rap1GAP montré en superposition avec Ras, Ran et Rho dans le complexe avec leurs GAPs apparentés. B) Superposition de Rap1 non complexé (jaune) et le complexe Rap1-Rap1-GAP (vert/bleu). (C, D) Représentation en surface de Rap1 (C) et de Rap1 en complexe avec Rap1GAP (D). Les résidus du switch II T61 (rouge) et Q63/F64 (vert) subissent une modification conformationnelle drastique lors de la formation du complexe avec Rap1GAP pour permettre l'accès au résidu d'asparagine au site actif. Reproduit à partir de référence ¹⁶³.

1.6.6 Dissociation du GDP

Contrairement aux RapGAPs qui ne présentent pas d'homologie de séquence avec les RasGAPs, les RapGEFs sont homologues aux RasGEFs. Les deux GEF spécifiques à Rap1 et Ras contiennent un domaine REM (motif d'échange Ras) et un domaine d'homologie catalytique Cdc25. Le domaine catalytique des Rap1GEFs forme un « glutamic finger ». Lors de la formation du complexe de Rap1 avec son GEF, ce « glutamic finger » est projeté dans la région de liaison nucléotidique. L'insertion de cette structure provoque de déplacement du switch I et les chaînes du « glutamic finger » bloquant par conséquent les sites de liaison de l'ion Mg^{2+} et du α -phosphate du nucléotide, entraînant la dissociation du nucléotide lié ¹⁶⁴. Le domaine REM régule l'activité catalytique par des interactions avec le « glutamic finger ». L'analyse mutationnelle a montré que les régions de la protéine Rap1 sont importantes pour la reconnaissance et la liaison du GEF : la région switch I, la région switch II et la séquence des acides aminés 100-110 ^{161, 165}. Certains des résidus dans cette région ainsi qu'à l'extérieur de ces régions expliquent la spécificité des GEFs.

1.6.7 Régulation de l'activité de Rap1

1.6.7.1 Les GEFs (facteurs d'échange de nucléotides guanyliques)

La régulation de l'activité de Rap1 est principalement contrôlée par des GEFs et des GAPs. Plusieurs GEFs ont été identifiés pour Rap1, toutes composés du domaine d'homologie Cdc25 et d'un Ras exchange motif (REM). Le domaine d'homologie Cdc25 est le domaine catalytique des GEFs, catalysant la libération du GDP, permettant ainsi à la protéine G de lier le GTP de façon plus abondante (Fig 1.9). Le REM est répandu chez les facteurs d'échange de nucléotides pour les petites GTPases et est généralement trouvé proche du domaine Cdc25. Le REM se lie

à la GTPases et participe à l'activité catalytique du facteur d'échange. La GEF forme en premier un complexe d'amarrage avec la petite GTPase lié au GDP avec une faible affinité. Le GDP se dissocie ensuite de son complexe initial, ce qui résulte en la formation d'un complexe de haute affinité GEF-petite protéine de liaison au GTP. Ce complexe intermédiaire ne s'accumule jamais au sein de la cellule puisqu'il se dissout rapidement lors de la liaison avec le GTP. La protéine de liaison au GTP sans nucléotide est instable et n'existe pratiquement pas dans la cellule. Ainsi, les GEF ont une double activité biochimique : ils déstabilisent la forte interaction avec le GDP et stabilisent les petites protéines de liaison qui n'ont pas de nucléotide.

Il existe plusieurs membres de la famille des GEFs. C3G fut le premier facteur d'échange trouvé pour Rap1. Il intervient dans l'activation de Rap1 à travers une cascade de signalisation constituée de tyrosines kinases. Lors de la phosphorylation des récepteurs de tyrosines kinases, le complexe Crk-C3G est recruté sur la membrane et interagit avec les résidus de tyrosines phosphorylés sur le récepteur via le domaine SH3 de Crk. Cela se traduit par l'activation de C3G, ce qui lui permet d'activer Rap1¹⁶⁶. Le C3G activé s'accumule principalement dans l'appareil de Golgi, le cytosquelette et la membrane plasmique^{167, 168}. Epac est un autre activateur de Rap1. Cette protéine est activée directement par l'AMPc. La famille Epac est composée de trois membres : Epac1, Epac2 et Repac. Epac1 est largement exprimé dans l'ensemble du corps alors que l'expression de Epac2 est restreinte au cerveau, la glande pituitaire, la glande adrénale et le foie. L'activateur PDZ-GEF est trouvé en deux isoformes chez les mammifères : PDZ-GEF1 et PDZ-GEF2^{169, 170} (aussi appelés RA-GEF-1, RA-GEF-2). Les deux PDZ-GEFs sont spécifiques pour Rap1 et Rap2^{156, 169}. Curieusement, malgré que le mécanisme induisant PDZ-GEF n'est pas encore entièrement élucidé, Rap1 actif peut induire lui-même l'activité de PDZ-GEF, suggérant qu'il y a une boucle de rétroaction entre Rap1 et

PDZ-GEF ¹⁵⁴. PDZ-GEF1 est exprimé de façon ubiquitaire à travers le corps alors que PDZ-GEF2 est exprimé dans le cœur, le cerveau, les poumons et le foie ^{156, 169}.

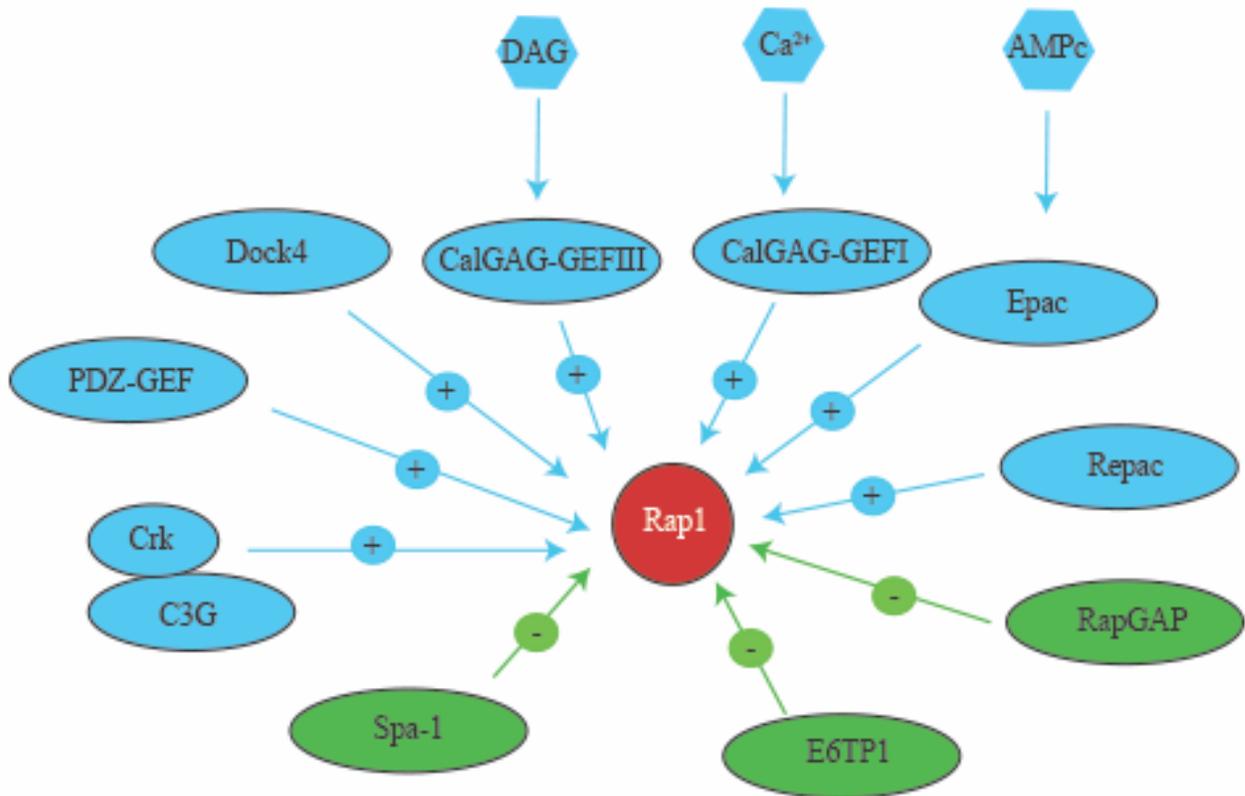


Figure 1.9 Réseau de signalisation Rap1

Plusieurs facteurs d'échange de nucléotides guanyliques (GEF; bleu) et des protéines activant les GTPase (GAP; vert) sont impliqués dans la régulation de Rap1. (C3G; protéine libérant des nucléotides de guanine qui se lie au domaine SH3 de CRK; AMPc : AMP cyclique; Crk: protéine adaptatrice composée de domaine SH2 et SH3; DAG: diacylglycérol). Modifié à partir de référence ¹⁷¹.

1.6.7.2 Les GAPs (protéines activant les GTPases)

Un autre groupe de régulateur de Rap1 sont les GAPs qui promeut l'inactivation de la GTPase en stimulant l'hydrolysée de GTP en GDP. La plupart de ces GAPs ont un résidu d'arginine qui stabilise la glutamine au sein de la GTPase qui coordonne l'attaque de l'eau pendant l'hydrolyse du GTP. Ce résidu est aussi appelé « arginine finger » et peut stabiliser une glutamine de la région switch II de Ras. Par contre, chez les protéines Rap1, le résidu de glutamine est remplacé par un résidu de thréonine qui est nécessaire pour la liaison Rap1-GAP. Rap1 possède une activité GTPases intrinsèque très faible, car il ne contient pas de résidu de glutamine en position 61, qui est conservée parmi les autres GTPases. Par conséquent, Rap1 a besoin de GAP pour induire l'hydrolyse du GTP. La régulation de Rap1-GAP établit la localisation et la durée d'activation de la signalisation Rap1 et peut renverser les processus dynamiques régulés par Rap1. Tout comme les GEFs, la pléthore de Rap-GAPs sont ciblés sur différents complexes moléculaires à divers endroits dans la cellule. Rap1GAP1 régule la signalisation locale au niveau de la membrane plasmique en interagissant avec la sous-unité G_{α} des protéines G trimériques couplés aux récepteurs. Les GAPs les plus connus qui interagissent avec Rap1 incluent Rap1GAP et Spa-1. Ces GAPs ont des domaines GAPs identiques. Rap1GAP1 a été le premier GAP identifié spécifique à Rap1. Rap1GAP1 est exprimé dans plusieurs tissus de fœtus, dans le placenta, et dans le cerveau adulte alors que Rap1GAPII est principalement exprimé dans le cerveau, le cœur, le foie et les reins ¹⁷². Spa-1 est situé dans la région péri-nucléaire. Il est principalement exprimé dans les tissus hématopoïétiques et il a été constaté que l'expression de Spa-1 et de Rap1GAP est ségréguée dans divers tissus ¹⁷³.

1.6.8 Les effecteurs de Rap1

En aval de Rap1, une pléthore de molécules effectrices a été proposée sur la base d'études biochimiques. Ces protéines incluent RapL, Riam, Afadin/AF-6, Krit1, Rasip. Ces effecteurs peuvent ensuite propager des signaux afin de contrôler la stabilisation des jonctions endothéliales vasculaires (Fig 1.10).

1.6.8.1 Les effecteurs régulant le remodelage de l'actine et la formation des JA

Afadine/AF-6 est une protéine cytosolique largement exprimée qui se retrouve aux jonctions et qui interagit avec les nectines, des molécules d'adhésion cellulaire analogues à l'immunoglobuline, grâce à leur domaine PDZ ainsi qu'avec un certain nombre de régulateurs du cytosquelette¹⁷⁴. Ainsi, AF-6 joue des rôles coopératifs importants dans la formation des JA¹⁷⁵. C'est avec ses domaines Ras-associated (RA), à l'extrémité N-terminale que l'AF-6 lie Rap1 et Ras avec une grande affinité¹⁷⁴. Bien que des études initiales aient montré que l'AF-6 pourrait participer à la rupture de la jonction induite par Ras¹⁷⁶, d'autres recherches ont montré que l'AF-6 lie la p120 caténine d'une manière Rap1 dépendante¹⁷⁷ pour empêcher l'internalisation de la cadhérine. La signalisation Rap1 par la surexpression de Rap1GAP redistribue l'AF-6 vers la région péri-nucléaire du cytosol¹⁷⁸. Une diminution d'AF-6 dans les CE entraîne une diminution des composants de la jonction aux contacts cellule-cellule. Une déplétion d'AF-6 est létale pour les embryons mais enlever AF-6 de façon endothéliale spécifique induit une létalité embryonnaire partielle, résultant de lymphoedème sous-cutané¹⁷⁹. Les animaux survivants à l'embryogenèse présentent une angiogenèse rétinienne aberrante et une VE-cadhérine jonctionnelle mal localisée, ainsi qu'un bourgeonnement angiogénique sur Matrigel défectueux¹⁷⁴. Ainsi, l'AF-6 est critique pour la fonction vasculaire appropriée à différents

stades de l'angiogenèse à la fois dans les vaisseaux sanguins et les vaisseaux lymphatiques. L'activation de l'AF-6 induit par Rap1 est cruciale pour le recrutement de la cadhérine.

La protéine Krev Interaction Trapped 1 (Krit) aussi connu sous l'acronyme de CCM1, est composée d'un domaine FERM responsable des interactions avec le cytosquelette d'actine et les protéines membranaires intégrales¹⁸⁰. Ce domaine adopte une structure analogue à l'ubiquitine, similaire aux domaines RA et RBD et qui peut se lier à la fois à Ras et à Rap1, bien que son affinité pour Rap1 soit plus élevée que pour Ras¹⁸¹. Cette protéine est mutée dans la malformation caverneuse cérébrale, une maladie associée à des anomalies du système vasculaire cérébral. Krit1 est un effecteur majeur de Rap1 dans le contrôle des jonctions cellule-cellule endothéliale¹⁸². Dans les CEs, Krit1 se localise aux jonctions où il s'associe aux protéines et est requis pour la réduction de la perméabilité basale¹⁸³. Krit1 s'associe également aux microtubules, à deux protéines CCM (CCM2 et CCM3) et à ICAP1, une protéine qui se lie à la chaîne β des intégrines¹⁸⁴. L'activation de la signalisation Rap1 stimule la libération de Krit1 en se liant à son domaine FERM par les microtubules et favorise sa translocation vers les jonctions cellule-cellule, où elle interagit avec CCM2 et CCM3 et d'autres composants des jonctions, notamment l'AF-6 et la β -caténine pour favoriser la fonction de barrière et pour la polarité endothéliale¹⁸⁴. En interagissant avec le récepteur Heart of Glass et la β -caténine, Rap1 induit également la localisation de Krit1 aux contacts cellulaires¹⁸⁵. Krit1 agit en supprimant l'activation de RhoA limitant ainsi la contractilité induit par l'actine ce qui contribue à l'instabilité jonctionnelle endothéliale¹⁸⁶ (Fig 1.10). Krit1 joue également un rôle dans l'activation des adhérences focales à base d'intégrine car la liaison de Krit1 à ICAP-1 permet la liaison de taline, une protéine cytosquelettique à l'intégrine et l'activation subséquente des adhérences focales¹⁸⁷. Une diminution de Krit1 endothélium spécifique chez les souris

néonatales entraîne une dilatation des vaisseaux crâniens, accompagnée d'une hémorragie et d'une mauvaise localisation de la VE-cadhérine¹⁸⁸.

1.6.8.2 RASIP régule l'assemblage et la stabilisation des actines jonctionnelles

La « Ras-interacting protein 1 » (Rasip) a été identifiée par un criblage de double hybrides de levure en tant que protéine interagissant préférentiellement avec K-Ras, H-Ras et Rap1¹⁸⁹. Des études ont montré que Rasip1 est fortement exprimée dans le système vasculaire embryonnaire et adulte, mais qu'elle n'est retrouvée qu'en faible quantité dans le tissu non vasculaire chez les vertébrés^{190, 191}. La diminution de Rasip1 chez des souris entraîne un œdème péricardique, une hémorragie multifocale et une létalité embryonnaire mi-gestationnelle, résultant d'une malformation des vaisseaux sanguins^{190, 192}. De plus, une diminution chez des embryons de poisson-zèbre en développement provoque des défauts des vaisseaux sanguins¹⁹⁰. Dans l'ensemble, les données provenant de plusieurs espèces de vertébrés montrent que Rasip1 joue un rôle essentiel dans le développement des vaisseaux sanguins embryonnaires^{190, 191, 192}.

1.6.8.3 RapL et les intégrines

RapL est un autre régulateur de Rap1 qui contrôle les intégrines et les microtubules. RapL est localisé sur les microtubules dans les CEs et lie directement les microtubules polymérisés *in vitro*¹⁹³. Dans les essais de cicatritions, RapL est localisé sur les microtubules au front de migration et son interaction avec Rap1 est nécessaire pour une migration directionnelle¹⁹³. De plus, la co-expression de Rap1V12, un vecteur activant de façon constitutive Rap1, induit également une dissociation de RapL des microtubules (Fig 1.10). Dans les lymphocytes, RapL se déplace dynamiquement de la région péri-nucléaire vers le front de migration lors de la stimulation avec des chimiokines. Rap1 activé déclenche alors l'association de RapL avec α L β 2 induisant une redistribution de cette intégrine vers la synapse immunologique¹⁹⁴. RapL est

également connu comme un suppresseur de tumeur et l'expression transitoire de RapL entraîne une apoptose accrue et une progression retardée du cycle cellulaire. En effet, RapL est fortement réprimé dans les tumeurs neuroblastiques et la reconstitution de son expression diminue le phénotype tumorigène¹⁹⁵.

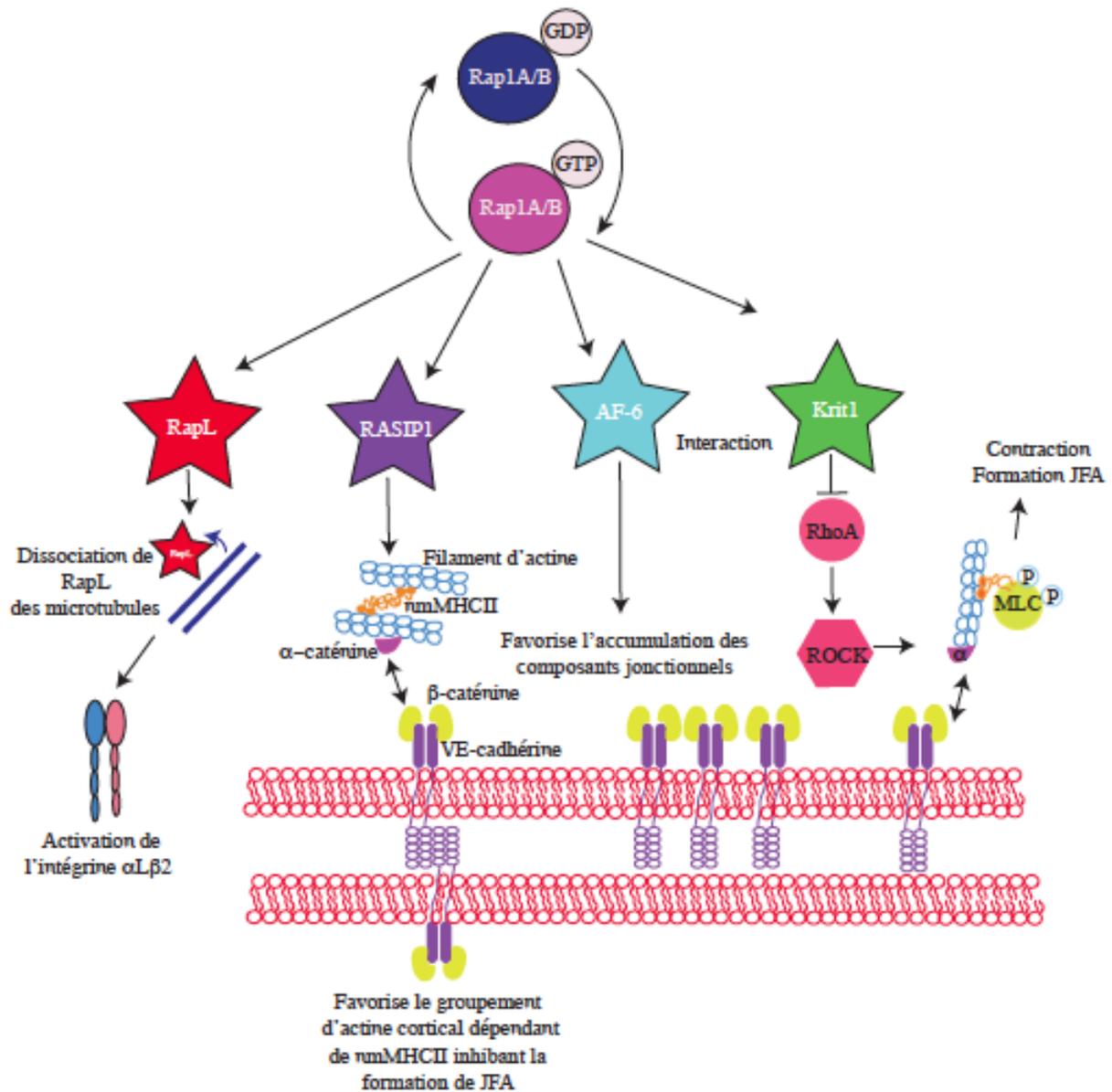


Figure 1.10 Signalisation par les effecteurs Rap1 dans le contrôle de la barrière endothéliale et dans l'adhésion cellule MEC.

Rap1A/B actif peut se lier à des effecteurs tels que RASIP1, AF-6, Krit1 et RapL dans de nombreux cas, déclenchant leur mouvement vers le cortex cellulaire. RASIP1 favorise le regroupement de l'actine corticale réticulée par la nonmuscle myosin heavy chain II (nmMHCII). Les faisceaux d'actine corticale sont liés à des molécules transmembranaires de VE-cadhérine par l'intermédiaire d' α -caténine et de β -caténine, des protéines adaptatrices cytosoliques. L'assemblage de ce réseau d'actine peut inhiber la formation des jonctions focales adhérentes (JFA) composée de complexes cadhérine-caténine liés à des fibres de stress. AF-6

favorise l'accumulation de composants de jonctions et se lie directement à la β -caténine, ainsi que Krit1. Af-6 et Krit1 suppriment l'activation de RhoA. L'inhibition de RhoA réduit la phosphorylation de la CLM par la protéine kinase associée à Rho (ROCK), réduisant la contraction et potentiellement la formation de JFA. RapL est dissocié des microtubules lors de l'activation de Rap1 et RapL, l'association de RapL avec α L β 2 induisant une redistribution de cette intégrine. L'interaction RapL/Rap1 est également nécessaire pour une migration directionnelle. Modifié à partir de référence¹⁹⁶.

1.7 Objectifs de recherche

L'étude est centrée sur le rôle de Rap1, dans les effets proangiogéniques suite à une stimulation de l'Ang-1 sur les CEs. L'objectif à long terme est de mieux comprendre le rôle joué par Rap1 dans le dysfonctionnement endothélial associé à l'angiogenèse. Ce faisant, une meilleure compréhension de la fonction de Rap1 dans des conditions normales et pathologiques sera atteinte. Quatre objectifs spécifiques ont été adressés pour accomplir cette tâche.

Nous savons que Rap1 est une GTPase impliquée dans la stabilisation de la barrière endothéliale. Il est connu que l'Ang-1 inhibe la perméabilité des vaisseaux sanguins. Nous avons donc cherché à savoir, si l'Ang-1 pouvait induire l'activité de Rap1 via sa voie de signalisation. Notre premier objectif était donc de déterminer si l'Ang-1 pouvait activer de façon rapide Rap1 et définir l'effet de cette activation sur les CEs. Notre deuxième objectif était d'examiner l'implication de Rap1 dans la stabilisation des JA lorsque des BAECs sont stimulées avec de l'Ang-1 et de déterminer l'effet d'une diminution de Rap1 sur la barrière endothéliale suite à une activation par Rap1. Le troisième objectif était d'étudier comment l'activité de Rap1 suite à une stimulation par Ang-1 pouvait affecter l'angiogenèse. Le bourgeonnement angiogénique et la migration des CEs sont les étapes les plus importantes lors de l'angiogenèse. Nous avons donc voulu observer l'effet d'une diminution de Rap1 sur les CEs lors de ces étapes cruciales. Notre quatrième objectif était de comparer le rôle de Rap1 dans l'angiogenèse stimulée par Ang-1 avec la VE-cadhérine, une protéine importante pour la stabilisation des JA.

CHAPITRE 2

**ARTICLE: ROLE OF RAP1 IN ANGIOPOIETIN-1–
INDUCED PRO-ANGIOGENIC EFFECTS ON
ENDOTHELIAL CELLS**

CONTRIBUTION DES AUTEURS

Cécile Boscher a participé aux expériences des figures 3 et 4. Chantal Delisle a participé à la figure 4. J'ai conçu et réalisé les expériences ainsi que fait l'analyse des données.

L'écriture du manuscrit a été faite par moi-même et mon directeur de recherche Jean-Philippe Gratton.

Rap1 is involved in angiotensin-1-induced stabilization of cell junctions and sprouting of endothelial cells

Vanda Gaonac'h-Lovejoy, Cécile Boscher, Chantal Delisle & Jean-Philippe Gratton[#]

Department of Pharmacology and Physiology, Faculty of Medicine, Université de Montréal,
Montreal, Quebec, Canada.

Corresponding author:

Dr. Jean-Philippe Gratton

Address: Department of Pharmacology and Physiology, Faculty of Medicine, Université de Montréal. P.O. Box 6128 Station Centre-Ville, Montreal, Quebec, H3C 3J7, CANADA.

E-mail: jean-philippe.gratton@umontreal.ca

Keywords: Angiotensin-1, angiogenesis, Rap1, VE-cadherin, sprouting, migration, adhesion, endothelial

2.1 Abstract

Angiopoietin-1 (Ang-1), an important angiogenic and anti-permeability factor, plays a key role in blood vessel formation. It has been shown that the small GTPase Rap1 is involved in promoting cell adhesion, such as cadherin-mediated adhesion and vessel stability. While many studies establish Rap1 activation as an important signaling event leading to AJ reinforcement, Rap1 has never been reported as a signaling target of Tie2. Thus, we determined the contribution of Rap1 to Ang-1/Tie2-stimulated angiogenic effects on endothelial cells (ECs). We found that downregulation of Rap1 attenuated the anti-permeability effects of Ang-1 on EC monolayers. Our results also reveal that Rap1 is necessary for EC sprouting stimulated by Ang-1 but had no significant effect on EC migration and adhesion. Although Rap1 and VE-cadherin are both essential for the integrity of the endothelial barrier and cell-cell adhesions, downregulation of VE-cadherin abolished Ang-1 stimulated migration and promoted adhesion of ECs in contrast to Rap1. These results suggest that, in response to Ang-1 stimulation, Rap1 is mainly associated at the level of intercellular adhesions of ECs whereas VE-cadherin is also involved in adhesion of ECs to the extracellular matrix.

2.2 Introduction

Angiogenesis is the process by which new blood vessels take form from existing blood vessels. It is involved in many biological processes including development, reproduction and wound repair¹⁹⁷. However, an imbalance in the angiogenic process participates to the establishment of many malignant diseases such as cancer, inflammatory, ischaemic and immune disorders. Angiopoietin-1 (Ang-1) is an angiogenic growth factor which plays an essential role in endothelial cell (EC) survival, migration, sprouting and tubule formation through the EC-specific receptor Tie2¹⁹⁸.

Dynamic regulation of the endothelial barrier is crucial for angiogenesis during development to promote maturation of blood vessels. This barrier is preserved by adherens junctions (AJs) and tight junctions (TJs), both of which are linked to the actin cytoskeleton, and maintains tissue integrity. Vascular endothelial-cadherin (VE-cadherin), which forms Ca^{2+} -dependent homodimer interactions across cell membranes of neighboring cells, is at the heart of AJs¹⁹⁸. VE-cadherin has a cytoplasmic tail that links the actin cytoskeleton through interactions with several cytoplasmic proteins including β -catenin, and participates in transmitting signals that relate to the adhesive function of VE-cadherin and to the outside-in signaling in ECs, both pivotal for angiogenesis¹⁹⁸. The small GTPase Rap1 is one of the essential signaling intermediates mediating these functions of VE-cadherin.

Rap1 is activated by a plethora of extracellular signals and has been clearly described as an important modulator of cell-matrix and cell-cell adhesions^{199, 200}. Recent research has shown that in ECs GTP-bound Rap1 can regulate angiogenesis and the endothelial barrier through the fine-tuning of vascular permeability^{157, 201, 202, 203}. AJ assembly is enforced by Rap1 through the

direct implementation of VE-cadherin adhesion and junction integrity via several Rap1 effectors including KRIT1, RASIP1 and Afadin^{185, 196, 204, 205, 206}. In ECs that have not yet formed stable junctions with neighboring cells, Rap1 plays an active role by fostering the endothelial barrier through the direct regulation of VE-cadherin adhesion and junction integrity via KRIT1^{157, 206}. Active Rap1 can also indirectly control the endothelial barrier through the dynamic reorganization of the actomyosin cytoskeleton and suppression of the Rho-ROCK pathway^{199, 204}. AJ stabilization is triggered by a number of anti-permeability factors such as Ang-1, which stabilizes blood vessels^{74, 207, 208, 209, 210, 211}. It is well established that Ang-1 promotes endothelial barrier integrity by counteracting the pro-permeability effect of vascular endothelial growth factor (VEGF) on ECs^{29, 74, 212}. We have previously shown that Ang-1 acts, at least in part, through the inhibition of VEGF-stimulated nitric oxide release⁷⁴. The role of Rap1 in the formation and reinforcement of AJs is well established. However, its role in the effects of Ang-1 on ECs has never been examined. Herein, we determine the contribution of Rap1 to Ang-1/Tie-2-stimulated angiogenic effects on ECs. We found that downregulation of Rap1 attenuated the anti-permeability effects of Ang-1 and that Rap1 is necessary for Ang-1-stimulated EC sprouting. Surprisingly, downregulation of Rap1 had no significant effect on the migration of ECs in contrast to the downregulation of VE-cadherin which affected both processes. These results highlight the involvement of Rap1 in the effects of Ang-1 on EC junctions and in angiogenic sprouting.

2.3 Methods

Cell culture

Bovine aortic endothelial cells (BAECs), obtained from VEC Technologies, were cultured in Dulbecco modified Eagle medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum

(HyClone Laboratories), 2.0 mM L-glutamine, 100 U/mL penicillin, and 100 µg/mL streptomycin.

Transfections and cell treatments

To silence Rap1 expression, a siRNA against both Rap1A and Rap1B was synthesized. The siRNA sequence targeting bovine Rap1 was 5'-UCUACUUCAACUUGCUUUCUU-3' and the siRNA sequence targeting bovine VE-cadherin was 5'-UCUCUGUCCAGUUCUUUGUUU-3'. A non-related scrambled siRNA was used as control (5'-UUGAGCAAUUCACGUUCAUUU-3') (Dharmacon; Lafayette, CO). For some experiments, BAECs were transfected with expression plasmids: GFP-RAPL (provided by Dr. Michael Gold, University of British Columbia, Canada) and FAK-GFP to visualize and quantify focal adhesions (gift from Dr. Ivan R. Nabi, University of British Columbia, Canada). siRNAs and expression plasmids were transfected in BAECs using Lipofectamine 2000, according to the manufacturer's protocol (Invitrogen). Forty-eight hours after transfections, cells were starved overnight in serum-free media before stimulation by Ang-1. Ang-1 was obtained from Cerdarlane reconstituted at 100ng/mL in sterile PBS with 0.1% bovine serum albumin (BSA).

Endothelial permeability assay

Permeability across endothelial cell monolayers was measured using type I collagen coated Transwell units (6.5mm diameter, 3.0 µm pore size polycarbonate filter; Corning Costar). BAEC cells were plated 48 hours after transfection at a density of 200,000 cells per well and cultured for 4 days until the formation of a tight monolayer. Cells were serum-starved for 1 hour in DMEM containing 1% BSA. Ang-1 (100 ng/mL) were added to the upper chambers in presence of 1mg/mL FITC-labeled dextran (molecular mass 40kDa). Endothelial permeability

was measured by collecting 50 μ L sample from the lower compartment which was diluted with 300 μ L phosphate-buffered saline (PBS) and measured for fluorescence at 520 nm when excited at 492 nm with a Wallac Victor ³V spectrophotometer (PerkinElmer).

Antibodies and immunoblotting

For immunofluorescence and immunoblot analyses, we used Alexa-coupled antibodies from Invitrogen and HRP-coupled antibodies from Jackson Laboratories, respectively. Primary antibodies used were: rabbit anti-Rap1 (Cell Signaling), goat anti-VE-cadherin (Santa Cruz Biotechnology), mouse anti-4G10 (Millipore), anti- β -actin (Cell Signaling).

Immunoblot analyses were performed as follow. Proteins were separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, transferred onto a nitrocellulose membrane (Hybond-ECL; GE Healthcare), and Western blotted. Antibody detection was performed with HRP-coupled antibodies from Jackson Laboratories and using the Image Quant LAS4000 chemiluminescence-based detection system (enhanced chemiluminescence) (GE Healthcare).

Immunofluorescence microscopy

BAECs were cultured on 0.1% gelatin-coated coverslips and transfected as previously described. Cells were serum-starved overnight and stimulated for 30 minutes with Ang-1. Cells were fixed for 20 minutes in serum free DMEM containing 4% paraformaldehyde. Once fixed, cells were rinsed with PBS and permeabilized with 0.1% Triton for 5 minutes. Fixed cells were then incubated for 1 hour with primary antibodies in 1% BSA in PBS followed by a 1-hour incubation with the appropriate secondary antibodies labeled with Alexa Fluor 488 and/or 568.

Coverslips were mounted on slides using Fluoromount (Sigma-Aldrich) and observed using a Zeiss LSM 800 confocal laser-scanning microscope. Images were assembled using Photoshop CS5 (Adobe Systems). To quantify focal adhesions (FAs), BAECs were transfected with FAK-GFP and fixed after 48 hours. Quantifications were performed using ImageJ (NIH, Bethesda, USA) by applying a threshold on the GFP level and quantifying the number of GFP positive FAs per cell. A total of 20 cells were quantified for each condition.

Rap1 activation assay

Rap1 activation was determined using an established pull-down method based on the binding of a GST fusion protein containing the Rap-binding domain of RalGDS (RalGDS-RBD/GST) to the active GTP-bound form of Rap1. TOPF10 Escherichia coli were transformed with the expression vector pGEX-RalGDS-RBD and RalGDS-RBD/GST fusion proteins were induced with 0.1mM isopropyl-1-thio- β -D-galactopyraoside (IPTG). Bacteria were then resuspended in in 50mM Tris-HCl, pH 7,4, 50mM NaCl, 1% Triton X-100, 1mM protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics) and 1% Nonidet P40 and sonicated. RalGDS-RBD/GST fusion proteins were purified from sonicated supernatant by incubation with glutathione-coupled Sepharose 4B beads (Amersham) overnight at 4°C. The beads were washed three times in lysis buffer and the amount of bound fusion proteins was estimated by SDS-PAGE and Coomassie Blue staining. BAECs were lysed in 1% Nonidet P40, 50mM Tris-HCl, 0,1mM EDTA, 0,1mM EGTA, 0,1% SDS, 0,1% deoxycholic acid, 20mM sodium fluoride, 1mM sodium pyrophosphate, 1mM orthovanadate. Aliquots of glutathione–Sepharose beads containing about 50 μ g of RalGDS-RBD/GST proteins were then used to precipitate GTP-bound Rap1 from cell lysate supernatants by incubation for 1 hour at 4°C with gentle rotation. The beads were then washed 3 times with

an excess of lysis buffer. The complexes were precipitated, boiled in SDS sample buffer and bound Rap1 revealed by immunoblotting.

Migration assay and time-lapse video microscopy

Cells were first transfected with siRNAs and then left for 48 hours to recover and reach 90% confluency. BAECs were starved overnight in 12-well plates. Transfected cells were incubated with the fluorescent vital Hoechst dye for 10 min before performing scratches with a 10 μ l-pipette tip on the confluent monolayer. Cells movements were recorded using an Axio-Observer Z1 microscope (Zeiss) equipped with an AxioCam MrM camera (Zeiss) and programmed to capture a frame every 10 minutes of the migration period (6 hours). Temperature was maintained at 37°C and the atmosphere within the chamber was kept at 5% CO₂/96% air throughout the experiment. Nucleus of cells at the leading-edge were traced by time-lapse video microscopy with the plugin Cell Tracker of ImageJ (NIH, Bethesda, USA) and nuclei tracks were analyzed with the plugin Manage cell Tracks of Ice Software. The total displacement and net displacement were obtained from each tracks and statistical analysis were performed.

Spheroid-based in vitro angiogenesis assay

24 hours after transfection of siRNA, spheroids of BAEC were generated as previously described²¹³. Briefly, transfected BAECs were cultured in DMEM containing 25% methocell, 10% FBS, 1% L-Glutamine and 1% penicillin/streptomycin in a U-shape 96 wells plate for 24 h to allow spheroids formation. Spheroids were transferred in complete medium containing 45% collagen pH 7.4 and 20% methocell and cultured for 24 h before fixation in 4 % PFA. Images

of the spheroids were taken after 24 hours of sprouting using a camera mounted on an inverted Zeiss Axio observer A2 with a x10/0.25 NA objective. The extent of capillary sprouting was quantified by measuring average sprout length and number of sprouts growing out of each spheroid using the ImageJ 1.49v software. At least 10 spheroids per conditions were analyzed, and 3 independent experiments were performed.

Cell adhesion assay

BAEC adhesion was assayed in 96-well plates precoated with 1% gelatin overnight, as described, with minor modifications²¹⁴. 48 hours after transfection, 50,000 cells were plated and left to adhere at 37°C for 1 hour. Adherent cells were stained with 0.2% crystal violet (Sigma Aldrich), 20% methanol in PBS and adhesion was quantitated by measuring absorbance at 550 nm with a Wallac Victor³V microplate reader (PerkinElmer). Each experimental point was performed in triplicate.

Statistical analysis

Data are represented as the means \pm S.E.M. Two-tailed independent Student's t tests were used when comparing two groups. Comparisons between multiple groups were made using one-way ANOVA followed by *post-hoc* Bonferroni's multiple comparisons test among groups using GraphPad Prim 5 software. *p* value < 0.05 was considered statistically significant.

2.4 Results

Ang-1 stimulation of ECs activates Rap1

We investigated the effect of Ang-1 stimulation of BAECs on Rap1 activation using a Rap1 activity assays. Ang-1 rapidly increased binding of active GTP-bound Rap1 to the GST

fusion protein containing the Rap-binding domain of RalGDS as determined by pulldown assay (Fig. 1A). Quantifications revealed that Rap1 activation was tripled after 5 minutes of Ang-1 stimulation and sustained for at least 30 minutes (Fig. 1B). Activation of Rap1 after Ang-1 stimulation was also determined by examining the cellular localization of GFP tagged RAPL, a downstream effector protein of Rap1. Following stimulation with Ang-1 of BAECs transfected with RAPL-GFP expression vectors, RAPL-GFP relocalized near the plasma membrane in close proximity to VE-cadherin staining, revealed by immunofluorescence, at cell junctions (Fig. 1C). The merge coefficient of the GFP and VE-cadherin immunofluorescence was increased by two folds in cells treated with Ang-1 compared to untreated cells (Fig. 1D). Collectively, these results indicate that Ang-1 stimulation of BAECs leads to Rap1 activation, which promotes relocalization of the Rap1 effector RAPL at junctions of ECs.

Rap1 is required for Ang-1-stimulated EC junction stabilization of EC junction

To determine whether Rap1 is essential for Ang-1-induced stabilization of the endothelial barrier stability, we examined the permeability of BAECs monolayers to macromolecules. The permeability of BAECs transfected with control (siCT) or siRNA targeting Rap1 (siRap1) to fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled dextran (40kDa) was monitored. We confirmed that transfection of BAECs with siRap1 decreased Rap1 protein expression by at least 75%, as determined by immunoblot (Fig. 2A). As expected, Ang-1 stimulation inhibited transendothelial permeability of control transfected BAECs (siCT) compared to unstimulated cells (Fig. 2B). However, the reduction in transendothelial permeability induced by Ang-1 was inhibited in cells transfected with siRap1. To further document the involvement of Rap1 in the stabilization of endothelial junctions induced by Ang-1, we examined the reorganization of cell junctions after Ang-1 stimulation in Rap1 downregulated cells. By visualizing VE-cadherin localization in

BAECs using immunofluorescence, we determined the linearity of intercellular junctions in ECs transfected with siCT or siRap1 (Fig. 2C-D). The junctional linearity index was defined as the ratio of the total junctional length over the net linear junctional length. BAECs transfected with siCT, had a VE-cadherin positive junction linearity index around 0.6 whereas cells subjected to 30 minutes of Ang-1 had a linearity closer to 1, suggesting a tightening of intercellular junctions, which is consistent with a reduction in endothelial permeability. On the other hand, cells transfected with siRap1 had a significantly decreased linearity index, compared to untreated siCT transfected cells (Fig. 2D). Furthermore, Ang-1-induced linearization of EC junctions was abolished in siRap1 transfected cells. Together, these observations suggest that Rap1 plays a significant role in Ang-1-induced stabilization of EC junctions and inhibition of transendothelial permeability.

Silencing of Rap1 or VE-cadherin inhibits EC sprouting

To examine the involvement of Rap1 in Ang-1-stimulated angiogenesis *in vitro*, we used a 3-dimensional spheroidal system of EC sprouting. Spheroids of ECs were set in collagen gels and the outgrowth of capillary like structures were analyzed following Ang-1 treatment. In cells transfected with siRNA against Rap1, the Ang-1-induced sprouting of BAECs was significantly blocked (Fig. 3B-D). Not only were there fewer sprouts per spheroid in Rap1 silenced cells stimulated with Ang-1, but sprout length was also significantly reduced (Fig. 3C-D). These data show that Rap1 activity is necessary to promote Ang-1-induced sprouting of ECs *in vitro*.

Since Rap1 acts at VE-cadherin based EC junctions, we examined if downregulation of VE-cadherin had similar functional consequences on EC sprouting as Rap1 downregulation. For this purpose, we first transfected cells with a siRNA against VE-cadherin (siVE-cadherin) or siCT (Fig. 3A) and confirmed at least 75% reduction in protein expression. We then performed

EC sprouting assays, and quantified the sprouting from of spheroids in response to Ang-1 transfected with siVE-cadherin. Similar to spheroids of BAECs with silenced Rap1, silencing of VE-cadherin significantly blocked Ang-1-induced sprouting of BAECs, reducing sprout length and number of sprouts per spheroids (Fig. 3E-G).

Rap1 is not necessary for Ang-1 stimulated EC migration

Next, we examined the role of Rap1 in Ang-1 induced migration of ECs. As we have previously shown, Ang-1 induces an increase in total cell migration and net cell displacement of BAECs determined by live-cell tracking (Fig. 4 A-C)⁹³. Interestingly, we did not observe any effect of siRap1 transfection on Ang-1-stimulated BAEC migration since cells behaved in an identical manner as cells transfected with siCT. This suggests that Rap1 is dispensable for Ang-1 stimulated EC migration (Fig. 4A-C).

We then examined the effect of VE-cadherin downregulation on the migration of BAECs stimulated with Ang-1. In contrast to Rap1-downregulated cells, we observed in BAECs transfected with siVE-cadherin a significant inhibition of Ang-1-stimulated cell migration (Fig. 4D-E). Total and net displacement (Fig. 4D-E) of Ang-1 stimulated cells within the wounded area of the monolayers were markedly reduced in VE-cadherin downregulated BAECs. Overall, these data demonstrate that, in contrast to Rap1, VE-cadherin is required for Ang-1-induced EC migration.

Role of Rap1 and VE-cadherin in endothelial cell adhesion

To define in more details the cell migration phenotypes of Rap1 and VE-cadherin downregulated ECs, we examined cellular adhesion to the extracellular matrix (ECM), which is an essential component of cell migration. Similarly to its effect on EC migration,

downregulation of Rap1 had no effect on adhesion of BAECs to the ECM in presence of Ang-1 (Fig. 5A). Interestingly, the basal adhesion of cells transfected with siVE-cadherin was increased compared to BAECs transfected with siCT. Moreover, downregulation of VE-cadherin markedly enhanced adhesion of BAECs stimulated with Ang-1 (Fig. 5A). Since tyrosine phosphorylation of Focal Adhesion Kinase (FAK) is linked to adhesion of cells to the ECM and in remodeling of FAs, we examined by immunofluorescence the overall levels of tyrosine phosphorylation in BAECs, which is generally associated with phosphorylation of FAK. We found that Ang-1 stimulation increased total phospho-tyrosine staining, in particular at the cellular edges and in ruffle like structures. Downregulation of Rap1 had no effect on Ang-1 induced phosphotyrosine staining of ECs. In contrast, siVE-cadherin transfected cells had elevated basal phospho-tyrosine staining, which was not increased further upon Ang-1 stimulation (Fig. 5B). To directly monitor the remodeling of FAs, we transfected BAECs with FAK-GFP, which localize to FAs and assessed the number of FA per cell. Consistent with increased cell adhesion, Ang-1 stimulation increased the number of FAs in siCT transfected cells. Downregulation of Rap1 slightly increased basal and Ang-1 stimulated FAs numbers in BAECs (Fig. 5C-D). In siVE-cadherin transfected cells, a marked increase in FA numbers was observed and this was increased further in Ang-1 stimulated BAECs. Overall, these results suggest that Rap1 is not involved in EC migration and adhesion while VE-cadherin depletion results in a marked increase of adhesion resulting in a blockage of EC migration induced by Ang-1.

2.5 Discussion

Rap1 has been identified as promoting cellular processes important for the angiogenic response such as migration, tube formation and integrin-mediated adhesion. Although Rap1 activation occurs in response to various extracellular stimuli, most studies have not identified them and have rather focused on the evolutionarily conserved GEFs, specifically on mechanisms in response to elevated cAMP. Angiogenic stimuli regulating Rap1 needs further attention. The present study clearly identifies for the first time, Rap1 as an indispensable factor for Ang-1-induced *in vitro* angiogenesis. Silencing Rap1 attenuated the ability of Ang-1 to reduced cell permeability and decreased *in vitro* angiogenic sprouting, suggesting that Rap1 is responsible for coupling the Tie-2 receptor to multiple downstream pathway to mediate blood vessel formation. We therefore propose a novel molecular mechanism by which Ang-1 stimulation activates the small GTPase Rap1 in it's GTP bound state, and consequently induces the activation of cell-cell junction formation signaling pathway. We demonstrated that the angiogenic growth factor Ang-1 rapidly increases Rap1 activity. However, the underlying mechanism is uncertain. It is likely that a GEF, which probably acts downstream of the Ang-1 receptor acts as an intermediate. Further studies are required to clarify the mechanism of Ang-1 induced Rap1 activation in endothelial cells.

In line with previous studies^{215, 216}, we found that silencing Rap1 activity blocked the angiogenic sprouting and tube forming activity of endothelial cells. Moreover, others have shown that in mice, a single global knockout of either of the Rap1 isoforms induced defective angiogenesis. Furthermore, the role of two Rap1 GEFs has been studied in several mouse models. Mouse knock outs of C3G²¹⁶ and PDZ-GEF^{157, 201, 217, 218} have caused defective vascular

morphogenesis. Remarkably, we are the first to show through an *in vitro* angiogenesis assay that Ang-1 induces sprouting of endothelial cells via Rap1. Angiogenic sprouting was inhibited in a similar way when silencing VE-cadherin. The fact that Rap1 and VE-cadherin suppression both exhibit the same phenotype might therefore be explained by the fact that both are necessary for angiogenic sprouting. Interestingly, a study showed that Rap1 recruits a protein complex essential for angiogenic sprouting to VE-cadherin as to regulate AJs locally during sprouting¹⁵⁷. This suggests that Rap1 and VE-cadherin interact during angiogenic sprouting. VE-cadherin mediates endothelial cell junction formation and Rap1 regulates the appropriate control of junctional myosin and adherent junction dynamics during sprouting.

Cell migration is crucial for the angiogenic process yet the role of Rap1 in cell migration is however somewhat controversial. Some studies have shown that active Rap1 blocked cell motility in carcinoma cells²¹⁹, whereas others have shown that inactivating Rap1 impaired cell migration²¹⁸. In this study, the data revealed that silencing Rap1 RNA had no effect on endothelial cell migration. Furthermore, no difference was observed between the control group and the knockdown Rap1 group after 30 min of stimulation with Ang-1. We then looked at the role of VE-cadherin. In line with another study¹⁵⁹, we found that cells with silenced VE-cadherin showed a marked increase in migration relative to cells in the control group. Surprisingly, when treated with Ang-1 for 30 min, cells with knockdown VE-cadherin did not travel as far as the control group stimulated with Ang-1 (Fig. 4E-F). We also found that depleting VE-cadherin from our BAECs caused a significant increase in cell adhesion. A possible explanation for the decrease in cell migration could be that transfecting cells with siRNA against VE-cadherin causes the cells to adhere more strongly to the ECM preventing the cells from migrating. Rap1 on the other hand is not necessary for Ang-1 induced cell adhesion and

therefore cell migration is not affected by knockdown Rap1 cells. A tempting hypothesis is that both Rap1 and VE-cadherin are essential for *in vitro* angiogenesis and that Ang-1 stimulation induces the co-operation between these two proteins during angiogenic sprouting. In fact, a study has shown that during sprouting Rap1 recruits a complex of proteins to VE-cadherin which regulates locally the dynamic of AJ²¹⁹. In ECs stimulated with Ang-1, VE-cadherin is important for angiogenic sprouting, cell migration and cell adhesion whereas Rap1 activity, induced by Ang-1, controls angiogenic sprouting and the EC barrier.

Research has shown that Rap1 is an important activator of adhesion in a multitude of cells¹⁹⁹. However, the role of Rap1 in cell adhesion in the presence of Ang-1 has not been investigated so far. VE-cadherin had a significant increase in cell adhesion to the ECM after Ang-1 stimulation. These results suggest that the function of Rap1 in angiogenesis stimulated by Ang-1 is mostly related to its role in intercellular adhesion of EC as opposed to VE-cadherin which is more involved in the adhesion of the ECM.

ACKNOWLEDGEMENTS:

We thank Chantal Delisle for expert technical assistance.

2.6 Figure Legends

FIGURE 1

Ang-1 activates Rap1 and induces RAPL accumulation at cell-cell junctions. (A) Rap1 activation was determined by pull-down assays using RalGDS-RBD/GST. BAECs were treated with Ang-1 (100ng/mL) for the indicated times and pull-down (PD) assay were performed on protein extracts to reveal the amount of active Rap1 (Rap1-GTP) in comparison to the amount

of Rap1 in total cell lysates (TCL). β -actin was used as a loading control. Immunoblots are representative of three independent experiments. **(B)** Densitometric quantification of Rap1 activation shown in A. Average ratio of active Rap1 (PD) to Rap1 levels in TCL for 3 experiments. $*P < 0.05$ vs unstimulated (0 min). **(C)** Ang-1 stimulation of BAECs induces the translocation of the Rap1 effector RAPL to VE-cadherin positive cell-cell junctions. Representative confocal micrograph of BAECs transfected with GFP-RAPL (green) and treated or not with Ang-1 (100ng/mL) for 30 min and processed for VE-cadherin immunofluorescence (red). Recruitment of GFP-RAPL to cell-cell junctions is visualized by its colocalisation (merge: yellow) with VE-cadherin staining. The arrow points to the colocalization at cell-cell junctions. **(D)** Quantification of the colocalization coefficient of GFP-RAPL and VE-cadherin expressed as arbitrary units (A.U.). The average colocalization coefficient of at least 30 cell junctions per condition were quantified in 3 different experiments. $* P < 0.05$.

FIGURE 2

Rap1 is essential for Ang-1-induced stabilisation of cell junctions and inhibition of endothelial permeability. **(A)** siRNA-mediated downregulation of Rap1 in BAECs. BAECs were transfected with control siRNA (siCT) or targeting Rap1 (siRap1) and downregulation was confirmed by immunoblotting against Rap1. β -actin was used as a loading control. **(B)** Transendothelial permeability was determined by measuring the passage of FITC-dextran through a monolayer of BAEC. Passage of FITC-dextran was measured after exposure of BAECs, transfected with siCT or siRap1, to Ang-1 (100ng/mL; 30min). The graph presents the average of 3 independent experiments (mean \pm SEM; $p < 0.05$). **(C)** Representative confocal micrographs of BAECs stained for VE-cadherin (green) and with DAPI (nucleus, blue) and transfected with siCT or siRap1. Where indicated, cells were stimulated with Ang-1 (100ng/ml)

for 30 minutes prior to fixation. Linearity of cell-cell junction staining (VE-cadherin) is indicative of junction stability. **(D)** Quantification of the “Index of linearity”, as described in the Results, is shown. The graph represents the average Index of linearity +/- SEM of at least n=30 junctional sections between cells per conditions. (*p<0.05). n.s.: not significant.

FIGURE 3

Rap1 and VE-cadherin are required for Ang-1-induced sprouting of BAECs. **(A)** siRNA-mediated downregulation of VE-cadherin in BAECs. BAECs were transfected with control siRNA (siCT) or targeting VE-cadherin (siVE-cadherin) and downregulation was confirmed by immunoblotting against VE-cadherin. **(B)** Representative images of phase contrast micrographs of BAECs spheroids transfected with control siRNA (siCT) or targeting Rap1 (siRap1) and treated with Ang-1 (100 ng/mL) or left untreated (CT). **(C-D)** Quantification of sprout length or number of sprouts per spheroids. Data are represented as mean ± SEM of three experiments with at least 8 spheroids per condition. Scale bar represents 100 μm. **(E)** Representative images of phase contrast micrographs of BAECs spheroids transfected with siCT or siVE-cadherin and treated with Ang-1 (100 ng/mL) or left untreated (CT). **(F-G)** Quantification of sprout length or number per spheroids. Data are represented as mean ± SEM of three experiments with at least 8 spheroids per condition. Scale bar represents 100 μm.

FIGURE 4

VE-cadherin, but not Rap1, is essential for Ang-1-induced migration of BAECs. (A) Representative images of the trajectories of migrating BAECs captured by live-cell imaging during 6 hours of migration. BAECs were transfected with control siRNA (siCT) or targeting Rap1 (siRap1) and treated with Ang-1 (100ng/mL), where indicated. (B-C) Quantifications of total and net cell migration are shown. The graphs are representative of three independent experiments each yielding similar results. At least 60 cells per experiments were quantified (*p<0.05). (D-E) BAECs were transfected with control siCT or targeting VE-cadherin (siVE-cadherin) and treated with Ang-1 (100ng/mL), where indicated. Quantifications of total and net cell migration are shown. The graphs are representative of three independent experiments each yielding similar results. At least 60 cells per experiments were quantified (*p<0.05).

FIGURE 5

VE-cadherin is required for Ang-1-induced cell adhesion to the extracellular. (A) Quantification of the relative cell adhesion to gelatin coated substrates of BAECs transfected with siRNA against VE-cadherin (siVE-cadherin), Rap1 (siRap1) or control siRNA (siCT), was measured in every condition as displayed. Results are shown as a relative ratio to the control. (B) Representative confocal micrographs of BAECs stained for total phospho-tyrosine (4G10; green) and transfected with siCT, siVE-cadherin or siRap1. Where indicated, cells were stimulated with Ang-1 (100ng/ml) for 30 minutes prior to fixation. The arrows point towards cell membrane where phospho-tyrosine staining is strongest. Scale: 20 μ m. (C) Representative confocal micrographs images of BAECs transfected with GFP-FAK plasmids and transfected with siCT, siVE-cadherin or siRap1. Where indicated, cells were stimulated with Ang-1 (100ng/ml) for 30 minutes prior to fixation. (D) Quantification of the number of focal adhesions

(FAs) per cell performed as in **C**. A total of 20 to 25 cells per condition were counted. The graphs are representative of three independent experiments each yielding similar results. * $p < 0.05$.

2.8 Figures

Figure 1

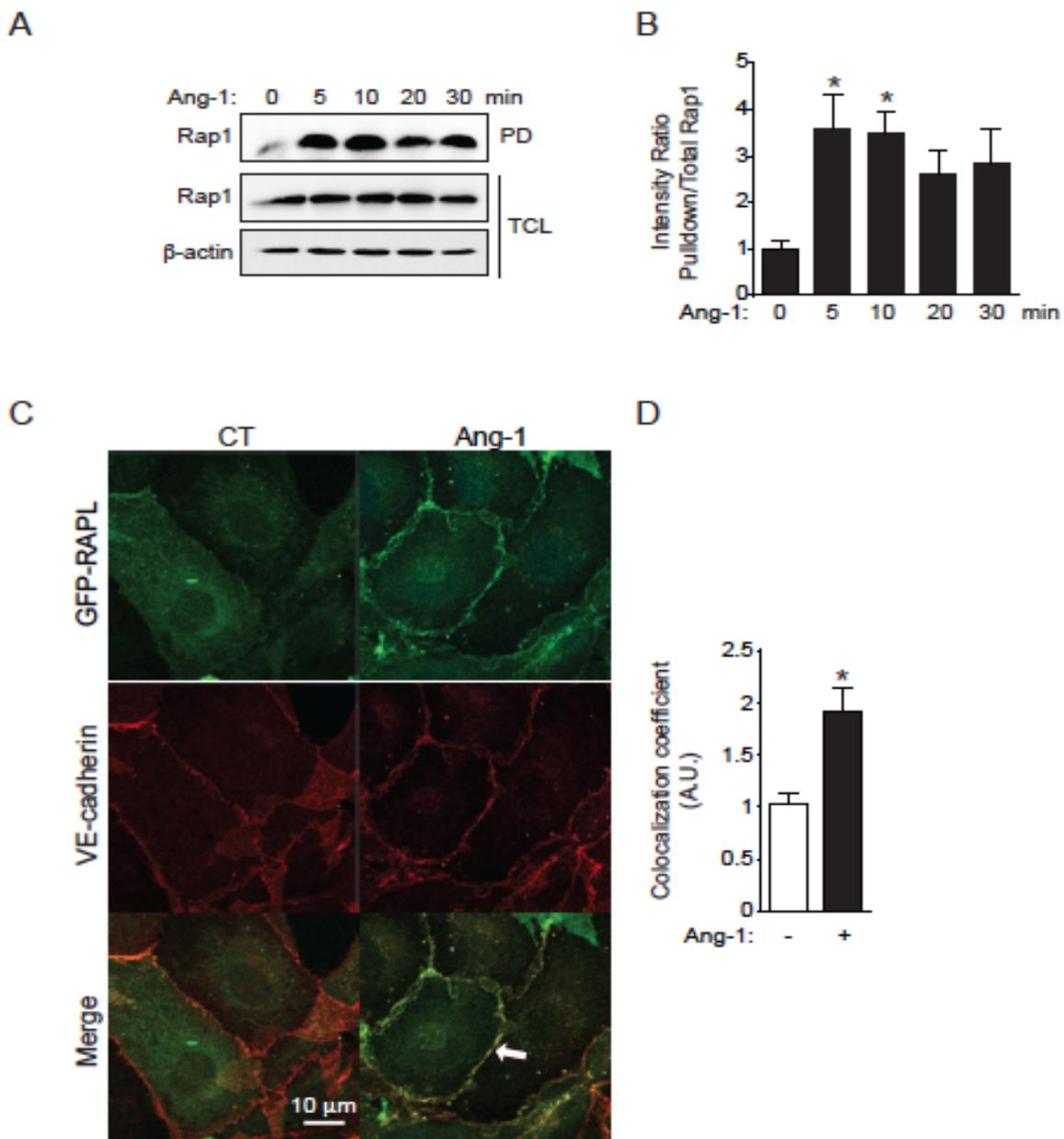


Fig 1: Ang-1 activates Rap1 and induces RAPL accumulation at cell-cell junctions

Figure 2

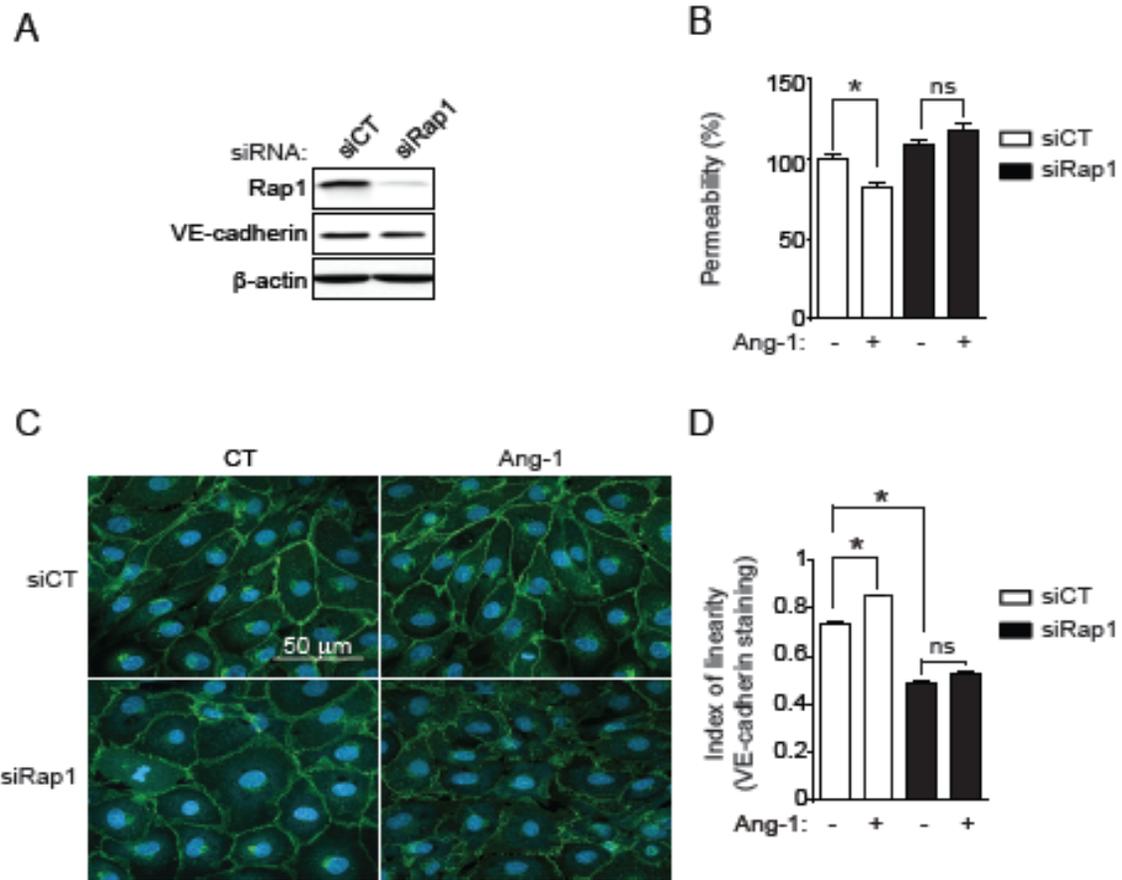


Fig 2: Rap1 is essential for Ang-1-induced stabilisation of cell junctions and inhibition of endothelial permeability

Figure 3

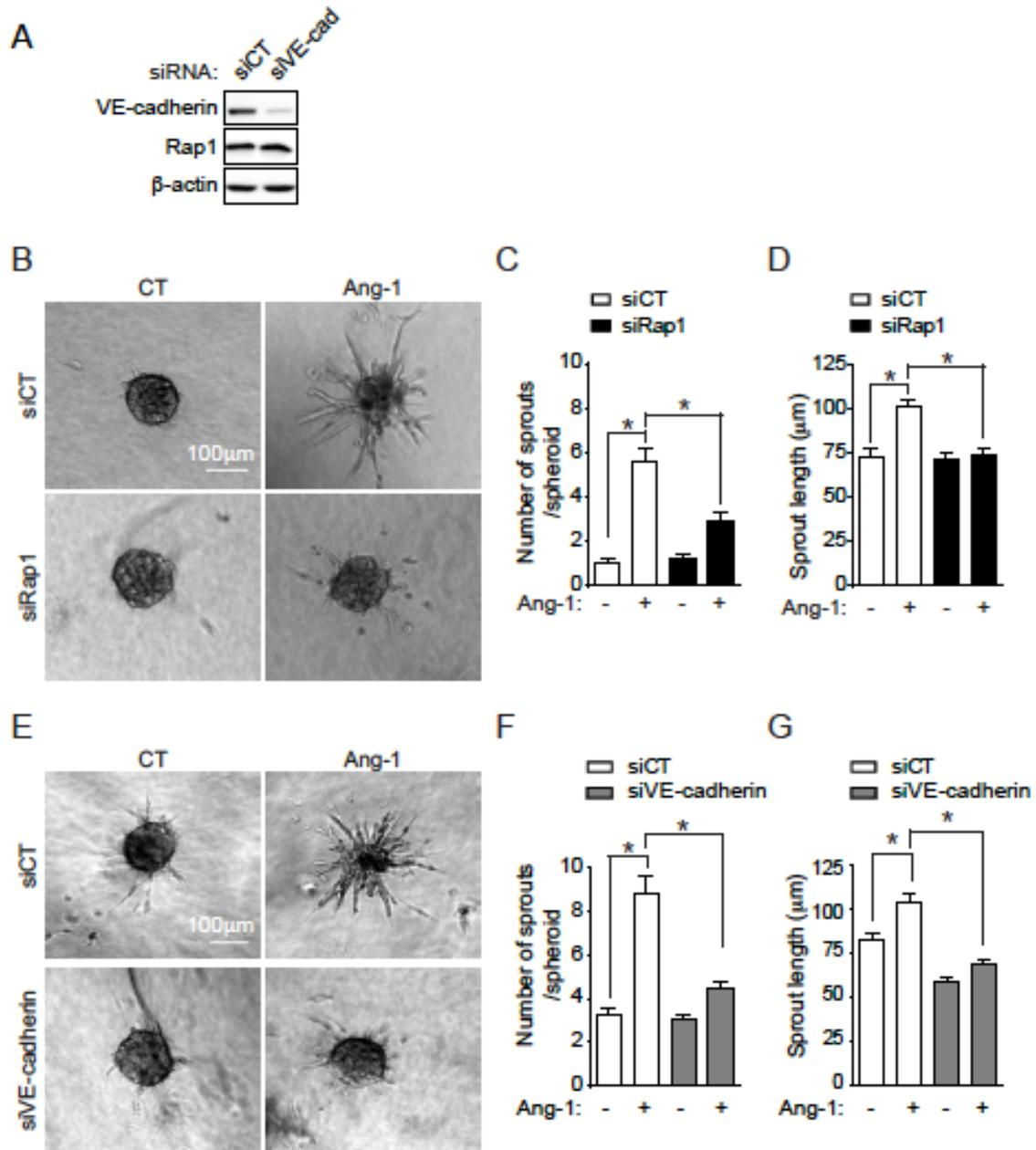


Fig 3: Rap1 and VE-cadherin are required for Ang-1-induced sprouting of BAECs

Figure 4

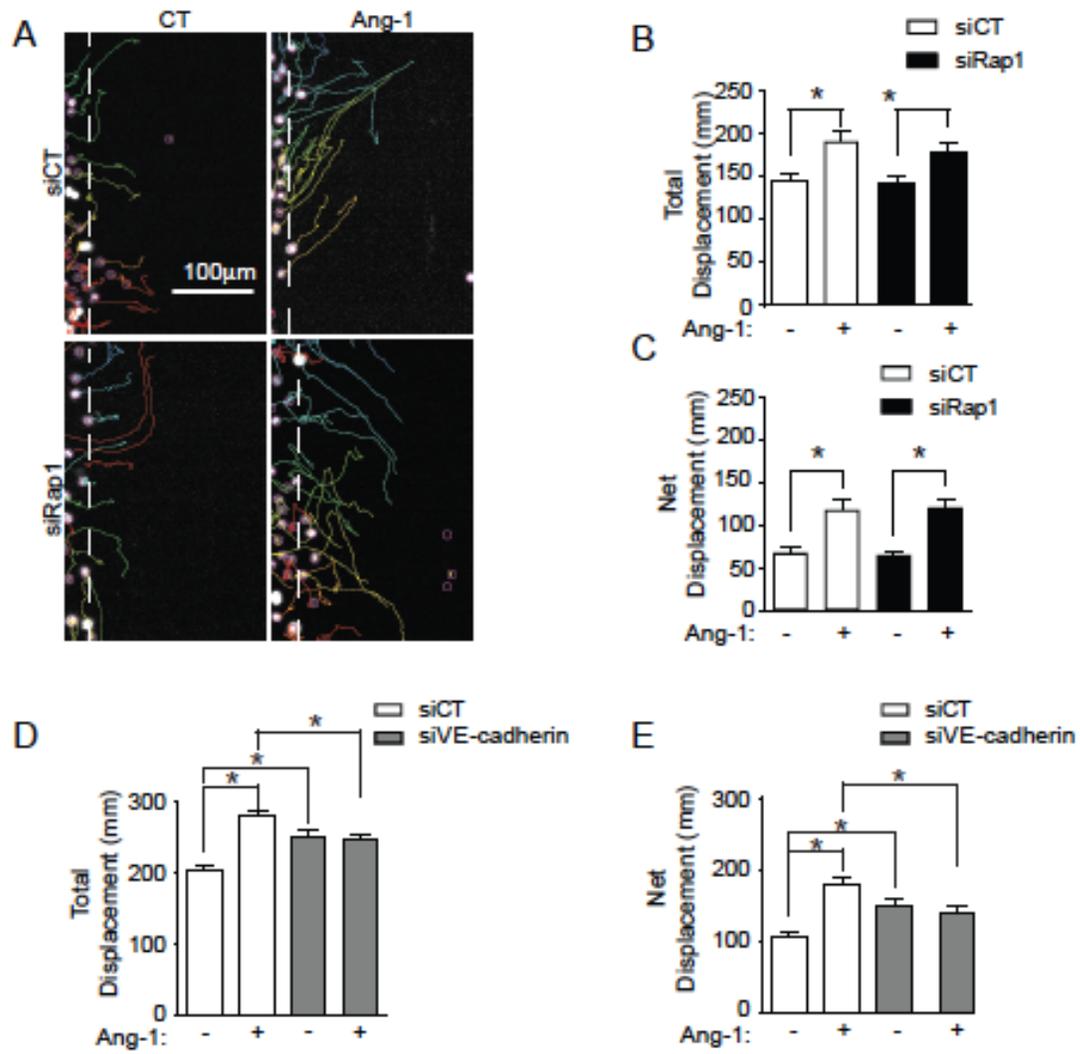


Fig 4: VE-cadherin, but not Rap1, is essential for Ang-1-induced migration of BAECs

Figure 5

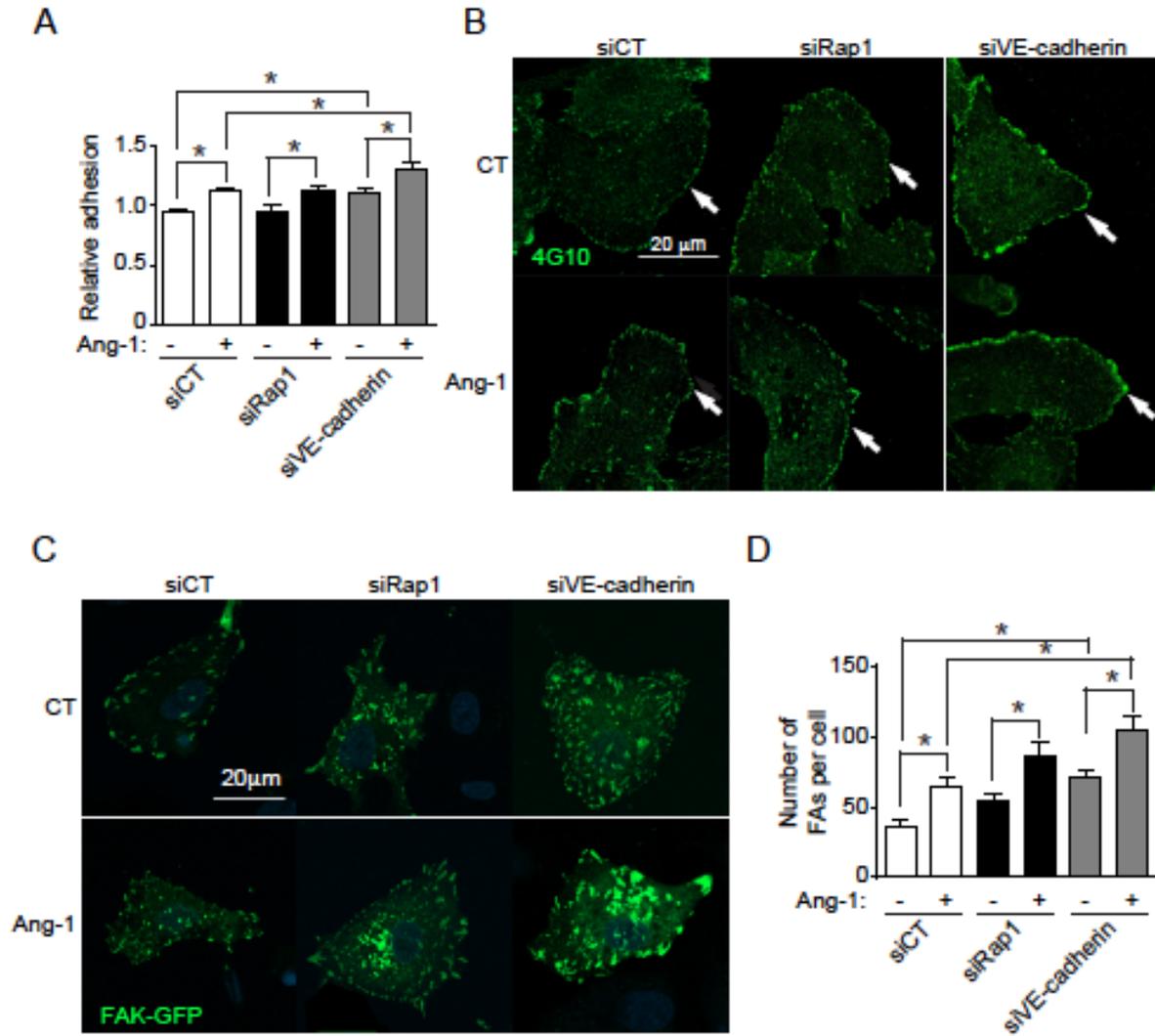


Fig 5: VE-cadherin is required for Ang-1-induced cell adhesion to the extracellular matrix

CHAPITRE 3
DISCUSSION, PERSPECTIVE ET CONCLUSIONS

3.1 DISCUSSION

Il est reconnu que l'Ang-1 est un facteur de croissance indispensable pour l'angiogenèse et la vasculogenèse. Grâce à son récepteur Tie-2, l'Ang-1 régule la réponse des CEs incluant la prolifération, la perméabilité, la stimulation de la migration et la promotion de la survie des CEs. Cependant, les voies de signalisation en aval restent méconnues. Des études ont montré que Rap1 est un régulateur positif de l'angiogenèse et un régulateur important de la barrière endothéliale^{217, 220}. Cependant, le rôle de Rap1 comme effecteurs de l'Ang-1 n'a pas été étudié jusqu'à présent.

La présente étude souligne l'implication de Rap1 dans l'angiogenèse induite par l'Ang-1 (Fig. 3.1). Plus précisément, les données de la présente étude ont révélé que (1) le facteur de croissance Ang-1 peut induire l'activité de Rap1 dans les CEs. (2) Rap1 est essentielle pour l'augmentation de la barrière endothéliale induite par Ang-1. (3) Rap1 est nécessaire au bourgeonnement angiogénique *in vitro*. (4) Rap1 n'est pas nécessaire dans la migration des CEs après une stimulation par Ang-1. (5) Le blocage de la migration des CEs observé lors d'une diminution des niveaux de VE-cadhérine pourrait être dû à une augmentation de l'adhésion des CEs à la MEC. Ainsi la présente étude montre que Rap1 est nécessaire au bourgeonnement angiogénique ainsi que pour la stabilisation des JA après une stimulation par Ang-1. Cependant, l'inhibition de VE-cadhérine par siARN mais non l'inhibition de Rap1 contrôle l'adhésion cellulaire, suggérant que l'Ang-1 active Rap1 et la VE-cadhérine par différentes voies de signalisation.

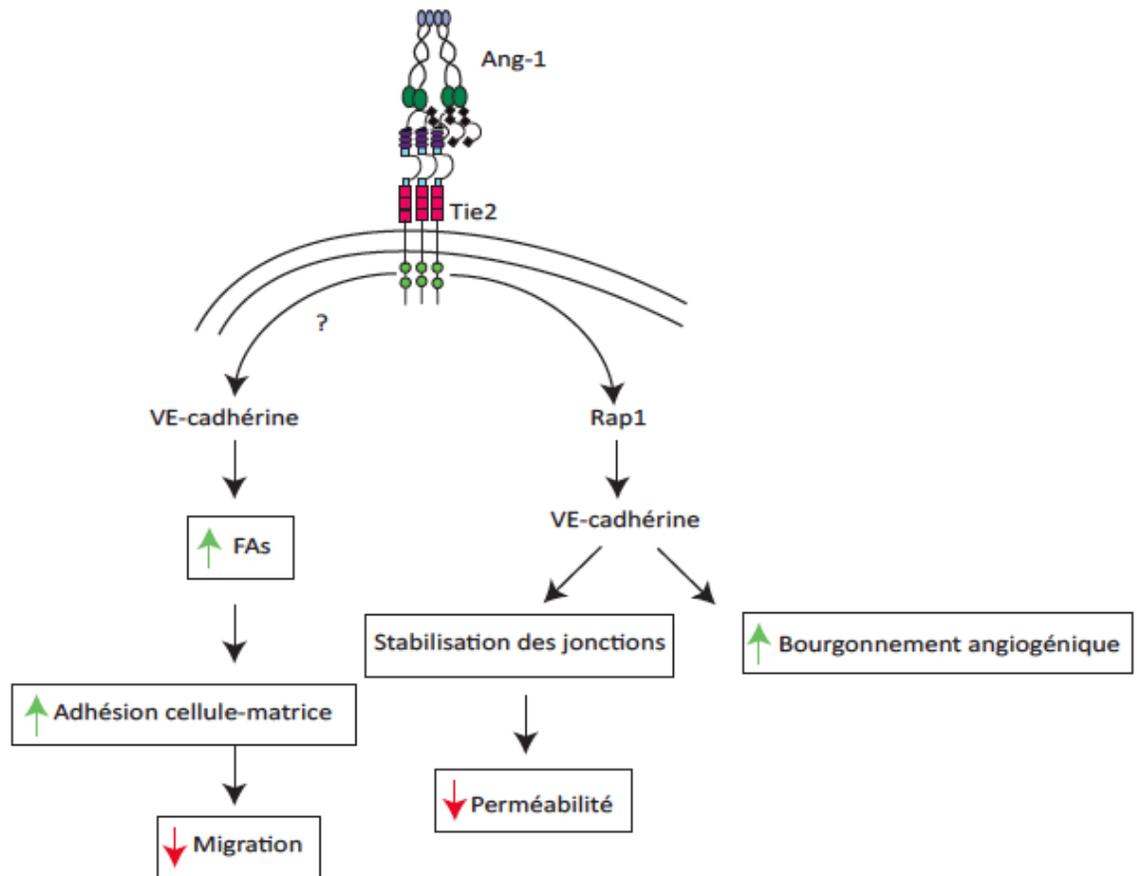


Figure 3.1 Modèle d'activation de Rap1 et de VE-cadhérine en aval de la signalisation Ang-1.

L'activation de Rap1 par Ang-1 stimule VE-cadhérine et entraîne la stabilisation des jonctions grâce à la diminution de la perméabilité. L'induction de Rap1 et de VE-cadhérine stimule le bourgeonnement angiogénique. Ang-1 induit également l'activation de la VE-cadhérine de façon indépendante de Rap1. La VE-cadhérine provoque la hausse de la formation d'adhésions focales ce qui renforce l'adhérence cellule-matrice. Ceci entraîne un blocage dans la migration collective endothéliale.

À notre connaissance, cette étude démontre pour la première fois que le facteur de croissance, Ang-1, induit rapidement l'activité de Rap1. Cependant, le mécanisme sous-jacent n'est pas encore établi. Il est probable qu'un GEF, qui agirait en aval du récepteur Tie-2 pourrait agir comme médiateur dans cet effet. Un candidat GEF possible est PDZ-GEF2 aussi appelé RA-GEF ou Rapgef6, qui transmet les signaux du récepteur tyrosine kinase Tie-2. En effet, une

analyse phosphoprotéomique conduite récemment dans notre laboratoire a identifié PDZ-GEF2 comme étant phosphorylée lors d'une activation par Ang-1 dans les CEs²²¹. Cependant le rôle de PDZ-GEF2 pour l'activation de Rap1 induite par Ang-1 dans les CEs n'est pas établi. D'autres études seront nécessaires pour clarifier le mécanisme de l'activation de Rap1 induite par Ang-1 dans les CEs.

La dégradation de l'intégrité vasculaire est une des étapes importantes de l'angiogenèse. Rap1 a été montré comme étant un régulateur essentiel pour la régulation de la barrière endothéliale^{218, 222, 223}. Cependant, l'effet de l'activation de Rap1 par Ang-1 au niveau des JA n'a pas été étudié jusqu'à présent. Notre étude *in vitro* montre que Rap1 est essentiel lors de la stabilisation des JA par Ang-1. En effet, lors de l'inhibition de Rap1 par siARN, l'Ang-1 est incapable de maintenir une barrière endothéliale stable. Cela suggère que Rap1 est nécessaire au mécanisme anti-perméabilité de Ang-1. Une fois Rap1 activée, il a été établi que cette GTPase régule la fonction de la barrière endothéliale par deux mécanismes : directement en augmentant l'adhésivité des VE-cadhérines²²⁴ ainsi qu'indirectement par la régulation dynamique du cytosquelette d'actomyosine²²⁵. Une étude a observé que Rap1 active Rac1 ce qui entraîne une réduction de la phosphorylation des CLM non musculaire ainsi qu'une diminution de la formation de fibres de stress radiales²²⁶. Il est concevable que l'activation de Rap1 par Ang-1 induise ces voies de signalisation afin de stabiliser la barrière endothéliale, mais d'autres études sont nécessaires pour élucider les mécanismes induits par la voie Ang-1/Rap1.

La formation de nouvelles jonctions cellule-cellule afin de former des tubules endothéliaux est une étape clef de l'angiogenèse. Étonnement, l'inhibition de Rap1 par une transfection de siARN contre Rap1, suite à une stimulation de l'Ang-1, a bloqué le bourgeonnement angiogénique dans les CEs. Ainsi, une étude récente a montré que des souris

hétérozygotes Rap1a avaient une réponse angiogénique réduite lors d'un essai sur Matrigel *in vivo*¹¹⁰. Des souris déficientes en Rap1b présentaient des anomalies angiogéniques. Une étude a également observé chez des souris n'ayant plus de C3G et de PDZ-GEF, que les souris avaient une morphogénèse vasculaire défectueuse^{227, 228}. Ces résultats soutiennent nos observations que Rap1 est nécessaire lors de la formation de bourgeonnement angiogénique suite à une activation par Ang-1.

La VE-cadhérine est une composante des JA et elle est importante pour l'intégrité vasculaire²²⁹. De plus, Rap1 induit les adhérences cellule-cellule véhiculées par la VE-cadhérine²⁰¹. Nous avons ainsi étudié le bourgeonnement angiogénique dans des CE ayant des niveaux de siARN de VE-cadhérine faible. Nos résultats montrent qu'une diminution de VE-cadhérine dans les sphéroïdes endothéliaux résulte en une diminution du bourgeonnement angiogénique suite à une activation par Ang-1 *in vitro*. Cela suggère qu'à la fois Rap1 et VE-cadhérine sont essentiels pour le bourgeonnement angiogénique. Une autre étude a examiné la relation entre Rap1 et VE-cadhérine et a montré que Rap1 recrute un complexe de protéines essentielles au bourgeonnement à la VE-cadhérine pour réguler localement la dynamique des JA pendant le bourgeonnement²³⁰. Ainsi cette dernière étude confirme que Rap1 et VE-cadhérine interagissent ensemble lors du bourgeonnement angiogénique.

Le bourgeonnement angiogénique nécessite un réarrangement exhaustif du cytosquelette qui est induit par RapL^{193, 215}. Nous avons montré qu'une stimulation de Rap1 par Ang-1 résulte en une localisation de RapL aux jonctions intercellulaires. Rap1 peut induire RapL à se dissocier des microtubules et le déplace dynamiquement de la région péri-nucléaire vers le front de migration¹⁹⁴. Des études supplémentaires sont nécessaires pour élucider le mécanisme

moléculaire par lequel Rap1 affecte le bourgeonnement des CEs après une stimulation par Ang-1.

La migration cellulaire est une fonction angiogénique essentielle des CEs. Le rôle de Rap1 est cependant controversé. Une perte de C3G dans les fibroblastes de souris augmenterait la migration comparée à celle de cellules contrôles²³¹. Dans la même lignée, la surexpression de Rap1V12 bloquerait la motilité cellulaire dans des cellules de carcinome. Cependant, certaines études rapportent qu'une diminution de Rap1 bloque la migration cellulaire alors que l'augmentation de Rap1 entraînerait une augmentation de la capacité à migrer^{193, 232, 233}. Curieusement, nous avons observé que la petite GTPase Rap1 est essentielle, suite à une stimulation par l'Ang-1, pour la stabilisation des JA ainsi que pour le bourgeonnement angiogénique, mais ne joue pas un rôle important dans la migration endothéliale. Pourtant, notre laboratoire a montré que l'Ang-1 est essentiel à la migration collective, car elle favorise la polarisation des CEs par l'induction de la formation du complexe de polarité Par et la promotion des protéines impliquées dans les JA au front de migration⁹³. Il est connu que la formation de nouveaux bourgeons à partir de vaisseaux préexistants est induite entre autres par la migration des cellules pionnières. Puisque la migration de cellules pionnières est une étape cruciale au bourgeonnement vasculaire, il est étonnant que Rap1 ne joue pas de rôle majeur dans la migration. Plusieurs hypothèses peuvent être émises afin d'expliquer nos observations. Il est connu que l'Ang-1 resserre les connections entre les cellules pionnières et les cellules « stalks »²³⁴. L'arrière des cellules pionnières doit maintenir le contact avec les cellules « stalks » et exercer des forces de traction pour empêcher la désintégration des branches. Il est possible que lors du bourgeonnement angiogénique, l'Ang-1 induise l'activité de Rap1 qui à son tour, est importante lors de la stabilisation des jonctions entre les cellules pionnières et les cellules

« stalks ». Il se pourrait alors que Rap1 ne soit tout simplement pas impliqué directement dans la croissance linéaire des bourgeons. Une diminution des niveaux de Rap1, empêcherait alors la formation de jonctions stable entre cellules pionnières et cellules « stalks » et préviendrait la croissance de bourgeons. Cette hypothèse permettrait d'expliquer notre observation que Rap1 est activé de façon sélective par Ang-1 lors du bourgeonnement et qu'il est important pour le contact cellule-cellule situé à l'arrière de la cellule pionnière, mais qu'il n'est pas activé lors des contacts latéraux pendant la migration.

Une autre hypothèse qui pourrait expliquer le blocage de bourgeonnement lors de l'inhibition de Rap1 pourrait être que Rap1 est requis pour la polarisation des cellules pionnières. Il est possible que Rap1 soit important pour l'établissement de signaux de polarité pendant le bourgeonnement en réponse à l'Ang-1. Il est important lors du bourgeonnement angiogénique que les CEs sachent quelles est leurs positions en fonction de leurs voisines lors du développement des vaisseaux afin d'assurer une réponse appropriée lors de signaux de guidage par les facteurs de croissance. La migration polarisée des cellules pionnières est induite lorsque celles-ci détectent et répondent aux facteurs de croissance. Nous savons que l'Ang-1 joue un rôle important lors de cette étape. Il est possible que la petite GTPase Rap1 régule la dynamique du cytosquelette et la polarité cellulaire au moment de la polarisation des cellules pionnières en réponse à l'Ang-1. Une diminution de Rap1 pourrait alors empêcher la formation de cellules hyperpolarisées, inhibant la formation de cellules-pionnières. La cellule pionnière est importante, car elle est le leader des CEs lors du bourgeonnement angiogénique. Une possibilité est que l'Ang-1 active sélectivement Rap1 lors du bourgeonnement induisant la polarisation de cellules pionnières, mais que Rap1 ne soit pas impliqué lors de la formation du complexe de polarité pendant la migration collective induite par Ang-1.

Rap1 est connu comme étant un activateur essentiel de l'adhésion dans une variété de cellules²¹³. Cependant, les rôles de Rap1 pour l'interaction cellule-MEC après une activation par Ang-1 n'ont pas été étudiés. Nous avons trouvé que VE-cadhérine est essentiel à l'adhésion cellule-matrice mais que Rap1 ne l'était pas. Cela n'est pas étonnant, puisqu'une augmentation de l'adhésion cellulaire à la matrice telle que nous l'avons vu dans des CEs transfectées avec un siARN contre VE-cadhérine peut expliquer le blocage de la migration que nous avons observée lors d'une diminution de VE-cadhérine. Dans le même sens, nous avons remarqué une hausse du nombre de FA par immunofluorescence dans les cellules ayant des niveaux de VE-cadhérine diminués.

En résumé, il est évident que Rap1 n'est pas seulement important pour la promotion de la stabilisation de la barrière endothéliale mais également que celle-ci joue un rôle dans les effets proangiogéniques de l'Ang-1 telle que dans la stabilisation de la barrière endothéliale et le bourgeonnement angiogénique. Les données suggèrent que Rap1 peut agir comme un médiateur de Tie-2, un des principaux récepteurs de CEs contrôlant l'homéostasie des CEs. Dans la régulation de la signalisation à partir de ce récepteur, le passage de l'activité Rap1 de la promotion de la barrière à la promotion de l'angiogenèse peut dépendre de la nature de l'agoniste et des mécanismes intracellulaires conduisant à l'activation de Rap1. Il sera important d'élucider les effecteurs de Rap1 immédiats à différents stades de la réponse angiogénique, afin de comprendre exactement comment Rap1 contrôle les fonctions des CEs dans des conditions physiologiques.

3.2 PERSPECTIVES FUTURES

Les résultats montrés dans ce mémoire ouvrent la voie à plusieurs projets. Premièrement, nous avons montré que l'Ang-1 activait rapidement Rap1 dans les CEs. L'identification des GEFs impliquées dans la voie de signalisation Ang-1/Rap1 permettrait d'élucider le mécanisme d'activation de Rap1 lors d'une stimulation par Ang-1. Notre étude phosphoprotéomique a identifié PDZ-GEF2 comme un GEF potentiel étant activé par Ang-1 et induisant l'activité de Rap1. Cela nous permettrait de déterminer si PDZ-GEF2 active Rap1 suite à une stimulation par l'Ang-1 en transfectant les BAECs avec des siARN contre PDZ-GEF2. Un essai par pull-down pourrait ensuite nous permettre d'examiner si l'activation de Rap1 est affectée après une stimulation par l'Ang-1.

Deuxièmement, nous avons montré que Rap1 était impliqué dans le bourgeonnement angiogénique. Il serait intéressant à court terme, d'examiner la polarité des CEs ayant des niveaux de Rap1 diminués afin de mieux comprendre quel est le rôle de Rap1 dans le bourgeonnement angiogénique. En effet, une polarité directionnelle persistante est nécessaire pour la formation de nouveaux bourgeons. Pour examiner cette question, nous pourrions faire un essai de polarité, qui consiste à observer par immunofluorescence l'orientation du Golgi par rapport à un scratch. Chez des cellules de mammifères lors de la migration cellulaire, le Golgi est souvent positionné proche du centrosome et est donc localisé devant le noyau de la cellule. Cet essai nous permettrait de déterminer si Rap1 est impliqué dans l'orientation du Golgi lors de la migration 2D et lors du bourgeonnement 3D.

Troisièmement, nos résultats montrent que Rap1 est important pour la stabilisation des JA suite à une activation par Ang-1. Il serait intéressant de quantifier l'effet d'une diminution

des niveaux de Rap1 suite à une stimulation par l'Ang-1 sur la perméabilité vasculaire *in vivo*, chez des souris Rap1 *knockout*. Pour cela, nous pourrions faire un essai intradermique « Miles assay » tel que décrit précédemment dans la littérature²⁰¹. Lors de cet essai, la queue de ces souris est injectée avec 1% de bleu d'Evans puis injectée de façon intradermique avec de l'Ang-1. Il serait ensuite possible d'étudier l'étendue du colorant bleu Evans extravasé en quantifiant le poids du colorant par le poids de l'échantillon de tissu dermique.

Quatrièmement, les résultats de ce mémoire nous ont permis de mieux comprendre le rôle de Rap1 lors de l'activation de l'Ang-1 dans l'angiogenèse et la stabilisation de la barrière endothéliale. Par conséquent, nos recherches futures devront se pencher sur le rôle de Rap1 dans l'angiogenèse suite à son activation par l'Ang-1 *in vivo*. Une étude générant des souris doubles knock-out endothéliales spécifiques a causé la mort des souris à E13.5¹⁵⁹. Rap1 semble donc être nécessaire pour la formation d'une vascularisation fonctionnelle. Une autre étude a examiné chez des souris endothéliales spécifiques Rap1A-knock-out (Rap1A-ECKO) et Rap1B-knock-out (Rap1B-ECKO) la fonction des deux isoformes sur le maintien de la barrière endothéliale et le remodelage des vaisseaux induit par le VEGF¹⁶⁰. Cependant, aucune étude n'a encore regardé la croissance tumorale dans des souris doubles knock-out pour Rap1. Il serait donc intéressant comme expérience à long terme, de générer des souris doubles knock-out Rap1 inducible par du tamoxifène endothélial restreint en croisant des souris dépourvues conditionnellement du gène qui code pour Rap1. Ces souris pourraient être générées grâce au système Flox/loxP par injection par tamoxifène qui active la recombinaison Cre seulement dans les CEs (Tie2-Cre⁺⁰; Rap1^{-/-}; Rap1-ECKO). Ces souris auraient alors une diminution de Rap1 strictement dans les CEs. Cela nous permettrait d'examiner l'effet de Rap1 lors de l'expression de l'Ang-1 sur la croissance tumorale.

3.3 CONCLUSION

La complexité de la signalisation Rap1 est en train d'être élucidée grâce à l'identification de nouvelles cibles moléculaires induites par les réponses de Rap1. L'émergence de la fonction de Rap1 comme un régulateur critique dans les cellules endothéliales justifie davantage d'études sur le rôle de Rap1 dans le dysfonctionnement endothélial associé aux pathologies cardiaques. En effet, d'autres études sont nécessaires afin d'avoir une meilleure compréhension des mécanismes sous-jacents de l'activation de Rap1 par Ang-1. Ils permettront d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques pouvant traiter les maladies cardio-vasculaires et les cancers. La signalisation Rap1 peut être exploitée dans des pathologies associées à des signes anormaux d'Ang-1 tels que les rétinopathies, le diabète et l'angiogenèse tumorale. En plus des conditions associées aux maladies, l'importance relative des diverses voies de signalisation Rap1 dans l'endothélium peut dépendre des types de vaisseaux et de leurs emplacements.

BIBLIOGRAPHIE

1. Galley H, Webster N. Physiology of the endothelium. *Br J Anaesth* 2004, **93**: 105–113.
2. Montezano AC, Neves KB, Lopes RAM, Rios F. *Isolation and culture of endothelial cells from large vessels*, In: Touyz R., Schiffrin E. (eds) Hypertension edn, vol. 1527. Springer: New York, NY, 2017.
3. Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nature Medicine* 1995, **1**: 27–30.
4. Dejana E, Tournier-Lasserre E, Weinstein BM. The control of vascular integrity by endothelial cell junctions: molecular basis and pathological implications. *Developmental cell* 2009, **16**(2): 209-221.
5. Baldwin AL, Thurston G. Mechanics of endothelial cell architecture and vascular permeability. *Critical reviews in biomedical engineering* 2001, **29**(2): 247-278.
6. Bazzoni G, Dejana E. Endothelial cell-to-cell junctions: molecular organization and role in vascular homeostasis. *Physiol Rev* 2004, **84**: 869-901.
7. Gonzalez-Mariscal L, Tapia R, Chamorro D. Crosstalk of tight junction components with signaling pathways. *Biochim Biophys Acta* 2008, **1778**: 729-756.
8. Dejana E. Endothelial cell-cell junctions: happy together. . *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004, **5**: 261-270.
9. Van Itallie CM, Anderson JM. Claudins and epithelial paracellular transport. *Annu Rev Physiol* 2006, **68**: 403–429.
10. Furuse M, Tsukita S. Claudins in occluding junctions of humans and flies. . *I6* 2006, **16**: 181-188.
11. Wallez Y, Huber P. Endothelial adherens and tight junctions in vascular homeostasis, inflammation and angiogenesis. *Biochim Biophys Acta* 2008, **1778**: 794–809.
12. Engelhardt B. Development of the blood-brain barrier. *Cell Tissue Res* 2003, **314**: 119-129.
13. Stamatovic SM, Keep RF, Andjelkovic AV. Brain endothelial cell-cell junctions: how to "open" the blood brain barrier. *Curr Neuropharmacol* 2008, **6**(3): 179-192.

14. Unger V, Kumar N, Gilula N, Yeager M. Three dimensional structure of a recombinant gap junction membrane channel. *Science* 1999, **282**: 1176-1180.
15. Christ G, Spray D, El-Sabban M, Moore L, PR B. Gap junctions in vascular tissues: evaluating the role of intercellular communication in the modulation of vasomotor tone. *Circ Res* 1996, **79**: 631–646.
16. Severs N, Dupont E, Kaprielian R, Yeh H, Rothery S. Gap junctions and connexins in the cardiovascular system. *Annual of Cardiac Surgery* 1996, **9th ed**: 31-44.
17. Kumar N, Gilula N. The gap junction communication channel. *Cell* 1996, **84**: 381-388.
18. Goodenough DA, Paul D. Gap Junctions. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2009.
19. Kuroki T, Inoguchi T, Umeda F, Ueda F, H. N. High glucose induces alteration of gap junction permeability and phosphorylation of connexin-43 in cultured aortic smooth muscle cells. *Diabetes* 1998, **47**: 931-936.
20. Larson D, Haudenschild C. Junctional transfer in wounded cultures of bovine aortic endothelial cells. *Lab Invest* 1988, **59**: 373–379.
21. Bai H, JV F, Zhao M. DC electric stimulation up-regulates angiogenic factors in endothelial cells through activation of VEGF receptors. *Cytokine* 2011, **55**: 110-115.
22. Figueroa XF, Duling BR. Gap junctions in the control of vascular function. *Antioxidants & redox signaling* 2009, **11(2)**: 251-266.
23. Aberle H, Schwartz H, Kemler R. Cadherin-catenin complex: protein interactions and their implications for cadherin function. *J Cell Biochem* 1996, **61**: 514-523.
24. Dejana E, Orsenigo F, Lampugnani MG. The role of adherens junctions and VE-cadherin in the control of vascular permeability. *J Cell Sci* 2008, **121**: 2115–2122.
25. Stockton RA, Schaefer E, Schwartz MA. p21-activated kinase regulates endothelial permeability through modulation of contractility. *J Biol Chem* 2004, **279**: 46621–46630.
26. Weis S, Shintani S, Weber A, Kirchmair R, Wood M, Cravens A, *et al*. Src blockade stabilizes a Flk/cadherin complex, reducing edema and tissue injury following myocardial infarction. *The Journal of clinical investigation* 2004, **113**: 885-894.

27. Baumer S, Keller L, Holtmann A, Funke R, August B, Gamp A, *et al.* Vascular endothelial cell-specific phosphotyrosine phosphatase (VE-PTP) activity is required for blood vessel development. . *Blood* 2006, **107**: 4754-4762.
28. Vestweber D. VE-cadherin: the major endothelial adhesion molecule controlling cellular junctions and blood vessel formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008, **28**: 223–232.
29. Gavard J, Gutkind JS. VEGF controls endothelial-cell permeability by promoting the β -arrestin-dependent endocytosis of VE-cadherin. *Nat Cell Biol* 2006, **8**: 1223-1234.
30. Chung AS, Lee J, Ferrara N. Targeting the tumour vasculature: insights from physiological angiogenesis. *Nature reviews Cancer* 2010, **10**(7): 505-514.
31. Adams R, Alitalo K. Molecular regulation of angiogenesis and lymphogenesis. *Nature reviews Molecular cell biology* 2007, **8**: 464-478.
32. Carmeliet P, Jain RK. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature* 2011, **473**: 298-307.
33. Adams R, Eichmann A. Axon guidance molecules in vascular patterning. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2010, **2**.
34. Jakobsson L, Franco C, Bentley K, Collins R, Ponsioen B. Endothelial cells dynamically compete for the tip cell position during angiogenic sprouting. *Nat Cell Biol* 2010, **12**: 943-953.
35. Potente M, Carmeliet P. The Link Between Angiogenesis and Endothelial Metabolism. *Annual review of physiology* 2017, **79**: 43-66.
36. Seaman S, Stevens J, Yang M, Logsdon D, Graff-Cherry C, St. Croix B. Genes that Distinguish Physiological and Pathological Angiogenesis . *Cancer cell* 2008, **11**(6): 539-554.
37. Chang YS, di Tomaso E, McDonald DM, Jones R, Jain RK, Munn LL. Mosaic blood vessels in tumors: frequency of cancer cells in contact with flowing blood. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2000, **97**(26): 14608-14613.
38. Kerbel RS. Tumor angiogenesis: past, present and the near future. *Carcinogenesis* 2000, **21**(3): 505-515.

39. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011, **144**(5): 646-674.
40. Pugh C, Ratcliffe P. The von Hippel-Lindau tumor suppressor, hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) degradation, and cancer pathogenesis. *Semin Cancer Biol* 2003, **13**: 83-89.
41. Fraisl P, Mazzone M, Schmidt T, Carmeliet P. Regulation of angiogenesis by oxygen and metabolism. *Dev Cell* 2009, **16**: 167-179.
42. Dumont DJ, Yamaguchi TP, Conlon RA, Rossant J, Breitman ML. tek, a novel tyrosine kinase gene located on mouse chromosome 4, is expressed in endothelial cells and their presumptive precursors. *Oncogene* 1992, **7**(8): 1471-1480.
43. Iwama A, Hamaguchi I, Hashiyama M, Murayama Y, Yasunaga K, Suda T. Molecular cloning and characterization of mouse TIE and TEK receptor tyrosine kinase genes and their expression in hematopoietic stem cells. *Biochemical and biophysical research communications* 1993, **195**(1): 301-309.
44. Sato TN, Tozawa Y, Deutsch U, Wolburg-Buchholz K, Fujiwara Y, Gendron-Maguire M, *et al.* Distinct roles of the receptor tyrosine kinases Tie-1 and Tie-2 in blood vessel formation. *Nature* 1995, **376**(6535): 70-74.
45. Barton WA, Tzvetkova-Robev D, Miranda EP, Kolev MV, Rajashankar KR, Himanen JP, *et al.* Crystal structures of the Tie2 receptor ectodomain and the angiopoietin-2-Tie2 complex. *Nature structural & molecular biology* 2006, **13**: 524-532.
46. Schnurch H, Risau W. Expression of tie-2, a member of a novel family of receptor tyrosine kinases, in the endothelial cell lineage. *Development* 1993, **119**(3): 957-968.
47. Davis S, Aldrich TH, Jones PF, Acheson A, Compton DL, Jain V, *et al.* Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, by secretion-trap expression cloning. *Cell* 1996, **87**(7): 1161-1169.
48. Valenzuela DM, Griffiths JA, Rojas J, Aldrich TH, Jones PF, Zhou H, *et al.* Angiopoietins 3 and 4: diverging gene counterparts in mice and humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1999, **96**(5): 1904-1909.
49. Nishimura M, Miki T, Yashima R, Yokoi N, Yano H, Sato Y, *et al.* Angiopoietin-3, a novel member of the angiopoietin family. *FEBS letters* 1999, **448**(2-3): 254-256.

50. Savant S, La Porta S, Budnik A, Busch K, Hu JH, Tisch N, Korn C, Valls AF, Benest AV, Terhardt D, et al. The orphan receptor Tie1 controls angiogenesis and vascular remodeling by differentially regulating Tie2 in Tip and stalk cells. *Cell Rep* 2015, **12**: 1761-1773.
51. Puri MC, Rossant J, Alitalo K, Bernstein A, Partanen J. The receptor tyrosine kinase TIE is required for integrity and survival of vascular endothelial cells. *EMBO J* 1995, **14**: 5884-5891.
52. Partanen J, Puri MC, Schwartz L, Fischer KD, Bernstein A, Rossant J. Cell autonomous functions of the receptor tyrosine kinase TIE in a late phase of angiogenic capillary growth and endothelial cell survival during murine development. *Development* 1996, **122**: 3013-3021.
53. Dumont DJ, Gradwohl G, Fong GH, Puri MC, Gertsenstein M, Auerbach A, et al. Dominant-negative and targeted null mutations in the endothelial receptor tyrosine kinase, tek, reveal a critical role in vasculogenesis of the embryo. *Genes Dev* 1994, **8**: 1897-1909.
54. Suri C, Jones PF, Patan S, Bartunkova S, Maisonpierre PC, Davis S, et al. Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell* 1996, **87**: 1171-1180.
55. Puri MC, Partanen J, Rossant J, Bernstein A. Interaction of the TEK and TIE receptor tyrosine kinases during cardiovascular development. *Development* 1999, **126**: 4569-4580.
56. Puri MC, Bernstein A. Requirement for the TIE family of receptor tyrosine kinases in adult but not fetal hematopoiesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003, **100**: 12753-12758.
57. Fagiani E, Christofori G. Angiopoietins in angiogenesis. *Cancer Letters* 2013, **328**(1): 18-26.
58. Eklund L, Olsen BR. Tie receptors and their angiopoietin ligands are context-dependent regulators of vascular remodeling. *Exp Cell Res* 2006, **312**: 630-641.
59. Saharinen P, Kerkela K, Ekman N, Marron M, Brindle N, Lee GM, et al. Multiple angiopoietin recombinant proteins activate the Tie1 receptor tyrosine kinase and promote its interaction with Tie2. *J Cell Biol* 2005, **169**: 239-243.
60. Kim KT, Choi HH, Steinmetz MO, Maco B, Kammerer RA, Ahn SY, et al. Oligomerization and multimerization are critical for angiopoietin-1 to bind and phosphorylate Tie2. *J Cell Biol* 2005, **280**: 20126-20131.

61. Davis S, Papadopoulos N, Aldrich TH, Maisonpierre PC, Huang T, Kovac L, *et al.* Angiopoietins have distinct modular domains essential for receptor binding, dimerization and superclustering. . *Nat Struct Biol* 2003, **10**: 38-44.
62. Thurston G, Suri C, Smith K, McClain J, Sato TN, Yancopoulos GD, *et al.* Leakage-resistant blood vessels in mice transgenically overexpressing angiopoietin-1. *Science* 1999, **286**: 2511-2514.
63. Fiedler U, Reiss, Y., Scharpfenecker, M., Grunow, V., Koidl, S., Thurston, G., Gale, N.W., Witzenrath, M., Rosseau, S., Suttorp, N. *et al.* Angiopoietin-2 sensitizes endothelial cells to TNF-alpha and has a crucial role in the induction of inflammation. *Nat Med* 2006, **12**: 235-239.
64. Gale NW, Thurston G, Hackett SF, Renard R, Wang Q, McClain J, *et al.* Angiopoietin-2 is required for postnatal angiogenesis and lymphatic patterning, and only the latter role is rescued by Angiopoietin-1. *Developmental cell* 2002, **3**(3): 411-423.
65. Augustin HG, Koh GY, Thurston G, Alitalo K. Control of vascular morphogenesis and homeostasis through the angiopoietin-Tie system. *Nature reviews Molecular cell biology* 2009, **10**(3): 165-177.
66. Scholz A, Lang V, Henschler R, Czabanka M, Vajkoczy P, Chavakis E, *et al.* Angiopoietin-2 promotes myeloid cell infiltration in a beta2-integrin-dependent manner. *Blood* 2011, **118**: 5050-5059.
67. Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, Bartunkova S, Wiegand SJ, Radziejewski C, *et al.* Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science* 1997, **277**(5322): 55-60.
68. Veikkola T, Alitalo K. Dual role of Ang2 in postnatal angiogenesis and lymphangiogenesis. *Developmental cell* 2002, **3**: 302-304.
69. Lee HJ, Cho CH, Hwang SJ, Choi HH, Kim KT, Ahn SY, *et al.* Biological characterization of angiopoietin-3 and angiopoietin-4. . *FASEB J* 2004, **18**: 1200-1208.
70. Kim I, Kim H, So J, Kim J, Kwak H, Koh G. Angiopoietin-1 regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-Kinase/Akt signal transduction pathway. . *Circ Res* 2000, **86**: 24-29.
71. Papapetropoulos A, Fulton D, Mahboubi K, Kalb R, O'Connor D, Li F, *et al.* Angiopoietin-1 inhibits endothelial cell apoptosis via the Akt/survivin pathway. *The Journal of biological chemistry* 2000, **275**: 9102 - 9105.

72. Duronio V. The life of a cell: apoptosis regulation by the PI3K/PKB pathway. *Biochem J* 2008; 333-344.
73. Gamble J, Drew J, Trezise L, Underwood A, Parsons M, Kasminkas L, *et al.* Angiopoietin-1 is an antipermeability and anti-inflammatory agent in vitro and targets cell junctions. *Circ Res* 2000, **87**: 603-607.
74. Oubaha M, Gratton J. Phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase by atypical PKC ζ contributes to angiopoietin-1-dependent inhibition of VEGF-induced endothelial permeability in vitro. *Blood* 2009, **114**: 3343-3351.
75. Kim I, Moon S, Park S, Chae S, GY K. Angiopoietin-1 reduces VEGF-stimulated leukocyte adhesion to endothelial cells by reducing ICAM-1, VCAM-1, and E-selectin expression. *Circ Res* 2001, **89**: 477 - 479.
76. Fiedler U, Scharpfenecker M, Koidl S, Hegen A, Grunow V, Schmidt J, *et al.* The Tie-2 ligand angiopoietin-2 is stored in and rapidly released upon stimulation from endothelial cell Weibel-Palade bodies . *Blood* 2004, **103**: 4150 - 4156.
77. Jeansson M, Gawlik, A., Anderson, G., Li, C., Kerjaschki, D., Henkelman, M., Quaggin, S.E. Angiopoietin-1 is essential in mouse vasculature during development and in response to injury. *J Clin Invest* 2011, **121**: 2278-2289.
78. Fukuhara S, Sako K, Noda K, Zhang J, Minami M, Mochizuki N. Angiopoietin-1/Tie2 receptor signaling in vascular quiescence and angiogenesis *Histol Histopathol* 2010, **25**: 387-396.
79. Fukuhara S, Sako, K., Minami, T., Noda, K., Kim, H.Z., Kodama, T., Shibuya, M., Takakura, N., Koh, G.Y., Mochizuki, N. Differential function of Tie2 at cell-cell contacts and cell-substratum contacts regulated by angiopoietin-1. *Nat Cell Biol* 2008, **10**: 513-526.
80. Zhang J, Fukuhara S, Sako K, Takenouchi T, Kitani H, Kume T, *et al.* Angiopoietin-1/Tie2 signal augments basal Notch signal controlling vascular quiescence by inducing delta-like 4 expression through AKT-mediated activation of β -catenin. *The Journal of biological chemistry* 2011, **286**.
81. Fachinger G, Deutsch U, Risau W. Functional interaction of vascular endothelial-protein-tyrosine phosphatase with the angiopoietin receptor Tie-2. *Oncogene* 1999, **18**: 5948-5953.

82. Nottebaum AF, Cagna G, Winderlich M, Gamp AC, Linnepe R., Polaschegg C, *et al.* VE-PTP maintains the endothelial barrier via plakoglobin and becomes dissociated from VE-cadherin by leukocytes and by VEGF. *J Exp Med* 2008, **205**: 2929-2945.
83. Saharinen P, Eklund L, Miettinen J, Wirkkala R, Anisimov A, Winderlich M, *et al.* Angiopoietins assemble distinct Tie2 signalling complexes in endothelial cell–cell and cell–matrix contacts
. *Nat Cell Biol* 2008, **10**: 527-537.
84. Winderlich M, Keller L, Cagna G, Broermann A, Kamenyeva O, Kiefer F, *et al.* VE-PTP controls blood vessel development by balancing Tie-2 activity. *J Cell Biol* 2009, **185**: 657-671.
85. Eklunda L, Saharinen P. Angiopoietin signaling in the vasculature. *Experimental Cell Research* 2013, **319**: 1271-1280.
86. Chen J, Lawrence M, Cunningham G, Christman B, B M. HSP90 and Akt modulate Ang-1-induced angiogenesis via NO in coronary artery endothelium. *J Appl Physiol* 2004, **96**: 612-620.
87. Fujikawa K, de Aos Scherpenseel I, Jain S, Presman E, Christensen R, Varticovski L. Role of PI 3-kinase in angiopoietin-1-mediated migration and attachment-dependent survival of endothelial cells. *Exp Cell Res* 1999, **253**: 663-672.
88. Cascone I, Audero E, Giraud E, Napione L, Maniero F, Philips M, *et al.* Tie-2 -dependent activation of RhoA and Rac1 participates in endothelial cell motility triggered by angiopoietin-1. *Blood* 2003, **102**: 2482-2490.
89. Jones N, Chen SH, Sturk C, Master Z, Tran J, Kerbel RS, *et al.* A unique autophosphorylation site on Tie2/Tek mediates Dok-R phosphotyrosine binding domain binding and function. *Mol Cell Biol* 2003, **23**: 2658-2668.
90. Master Z, Jones N, Tran J, Jones J, Kerbel R, Dumont D. Dok-R plays a pivotal role in angiopoietin-1-dependent cell migration through recruitment and activation of Pak. *EMBO J* 2001, **20**: 5919-5928.
91. Audero E, Cascone I, Maniero F, Napione L, Arese M, Lanfrancone L, *et al.* Adaptor ShcA Protein Binds Tyrosine Kinase Tie2 Receptor and Regulates Migration and Sprouting but Not Survival of Endothelial Cells. *The Journal of biological chemistry* 2004, **279**: 13224-13233.

92. Li X, Hahn C, Parsons M, Drew J, Vadas M, Gamble J. Role of protein kinase C {zeta} in thrombin-induced endothelial permeability changes: inhibition by angiopoietin-1. *Blood* 2004, **104**: 1716-1724.
93. Oubaha M, Lin M, Margaron Y, Filion D, Price E, Zon L, *et al.* Formation of a PKC ζ / β -catenin complex in endothelial cells promotes angiopoietin-1-induced collective directional migration and angiogenic sprouting. *Blood* 2012, **120**(16): 3371-3381.
94. Scarpa E, Mayor R. Collective cell migration in development. *J Cell Biol* 2016, **212**(2): 143-155.
95. Weijer CJ. Collective cell migration in development. *J Cell Sci* 2009, **122**(Pt 18): 3215-3223.
96. Friedl P, Gilmour D. Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer. *Nature reviews Molecular cell biology* 2009, **10**(7): 445-457.
97. Guo W, Giancotti FG. Integrin signalling during tumour progression. *Nature reviews Molecular cell biology* 2004, **5**(10): 816-826.
98. Sieg DJ, Hauck CR, Ilic D, Klingbeil CK, Schaefer E, Damsky CH, *et al.* FAK integrates growth-factor and integrin signals to promote cell migration. *Nat Cell Biol* 2000, **2**(5): 249-256.
99. Le Boeuf F, Houle F, Sussman M, Huot J. Phosphorylation of focal adhesion kinase (FAK) on Ser732 is induced by rho-dependent kinase and is essential for proline-rich tyrosine kinase-2-mediated phosphorylation of FAK on Tyr407 in response to vascular endothelial growth factor. *Mol Biol Cell* 2006, **17**(8): 3508-3520.
100. Borghi N, Lowndes M, Maruthamuthu V, Gardel ML, Nelson WJ. Regulation of cell motile behavior by crosstalk between cadherin- and integrin-mediated adhesions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2010, **107**(30): 13324-13329.
101. Dupin I, Camand E, Etienne-Manneville S. Classical cadherins control nucleus and centrosome position and cell polarity. *J Cell Biol* 2009, **185**(5): 779-786.
102. Camand E, Peglion F, Osmani N, Sanson M, Etienne-Manneville S. N-cadherin expression level modulates integrin-mediated polarity and strongly impacts on the speed and directionality of glial cell migration. *J Cell Sci* 2012, **125**(Pt 4): 844-857.

103. Peglion F, Llense F, Etienne-Manneville S. Adherens junction treadmilling during collective migration. *Nat Cell Biol* 2014, **16**(7): 639-651.
104. Cherfils J, Zeghouf M. Chronicles of the GTPase switch. *Nature chemical biology* 2011, **7**(8): 493-495.
105. Cox AD, Der CJ. Ras history: The saga continues. *Small GTPases* 2010, **1**(1): 2-27.
106. Vetter IR, Wittinghofer A. The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science* 2001, **294**(5545): 1299-1304.
107. Bos J, Rehmann H, Wittinghofer A. GEFs and GAPs: Critical Elements in the Control of Small G Proteins. *Cell* 2007, **130**(2): 385.
108. Cherfils J, Zeghouf M. Regulation of small GTPases by GEFs, GAPs, and GDIs. *Physiological reviews* 2013, **93**(1): 269-309.
109. Etienne-Manneville S, Hall A. Rho GTPases in cell biology. *Nature* 2002, **420**(6916): 629-635.
110. Chrzanowska-Wodnicka M. Rap1 in endothelial biology. *Current opinion in hematology* 2017, **24**(3): 248-255.
111. Wojciak-Stothard B, Ridley AJ. Rho GTPases and the regulation of endothelial permeability. *Vascular pharmacology* 2002, **39**(4-5): 187-199.
112. Vandenbroucke E, Mehta D, Minshall R, Malik AB. Regulation of endothelial junctional permeability. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2008, **1123**: 134-145.
113. Hoffman GR, Cerione RA. Signaling to the Rho GTPases: networking with the DH domain. *FEBS letters* 2002, **513**(1): 85-91.
114. Rossman KL, Campbell SL. Bacterial expressed DH and DH/PH domains. *Methods in enzymology* 2000, **325**: 25-38.
115. Tcherkezian J, Lamarche-Vane N. Current knowledge of the large RhoGAP family of proteins. *Biology of the cell* 2007, **99**(2): 67-86.
116. Dransart E, Olofsson B, Cherfils J. RhoGDIs revisited: novel roles in Rho regulation. *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 2005, **6**(11): 957-966.

117. Wojciak-Stothard B, Entwistle A, Garg R, Ridley AJ. Regulation of TNF-alpha-induced reorganization of the actin cytoskeleton and cell-cell junctions by Rho, Rac, and Cdc42 in human endothelial cells. *Journal of cellular physiology* 1998, **176**(1): 150-165.
118. Adamson RH, Curry FE, Adamson G, Liu B, Jiang Y, Aktories K, *et al.* Rho and rho kinase modulation of barrier properties: cultured endothelial cells and intact microvessels of rats and mice. *The Journal of physiology* 2002, **539**(Pt 1): 295-308.
119. Baumer Y, Burger S, Curry FE, Golenhofen N, Drenckhahn D, Waschke J. Differential role of Rho GTPases in endothelial barrier regulation dependent on endothelial cell origin. *Histochemistry and cell biology* 2008, **129**(2): 179-191.
120. Sun H, Breslin JW, Zhu J, Yuan SY, Wu MH. Rho and ROCK signaling in VEGF-induced microvascular endothelial hyperpermeability. *Microcirculation (New York, NY : 1994)* 2006, **13**(3): 237-247.
121. van Nieuw Amerongen GP, Beckers CM, Achekar ID, Zeeman S, Musters RJ, van Hinsbergh VW. Involvement of Rho kinase in endothelial barrier maintenance. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2007, **27**(11): 2332-2339.
122. Kuhn S, Geyer M. Formins as effector proteins of Rho GTPases. *Small GTPases* 2014, **5**: e29513.
123. Yamamoto M, Ramirez SH, Sato S, Kiyota T, Cerny RL, Kaibuchi K, *et al.* Phosphorylation of claudin-5 and occludin by rho kinase in brain endothelial cells. *The American journal of pathology* 2008, **172**(2): 521-533.
124. Clark PR, Kim RK, Pober JS, Kluger MS. Tumor necrosis factor disrupts claudin-5 endothelial tight junction barriers in two distinct NF-kappaB-dependent phases. *PLoS One* 2015, **10**(3): e0120075.
125. Xiaolu D, Jing P, Fang H, Lifen Y, Liwen W, Ciliu Z, *et al.* Role of p115RhoGEF in lipopolysaccharide-induced mouse brain microvascular endothelial barrier dysfunction. *Brain Res* 2011, **1387**: 1-7.
126. Heasman SJ, Ridley AJ. Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. *Nature reviews Molecular cell biology* 2008, **9**(9): 690-701.
127. Saci A, Cantley LC, Carpenter CL. Rac1 regulates the activity of mTORC1 and mTORC2 and controls cellular size. *Molecular cell* 2011, **42**(1): 50-61.

128. Ehrlich JS, Hansen MD, Nelson WJ. Spatio-temporal regulation of Rac1 localization and lamellipodia dynamics during epithelial cell-cell adhesion. *Developmental cell* 2002, **3**(2): 259-270.
129. Bosco EE, Nakai Y, Hennigan RF, Ratner N, Zheng Y. NF2-deficient cells depend on the Rac1-canonical Wnt signaling pathway to promote the loss of contact inhibition of proliferation. *Oncogene* 2010, **29**(17): 2540-2549.
130. Ridley AJ. Rho GTPases and actin dynamics in membrane protrusions and vesicle trafficking. *Trends in cell biology* 2006, **16**(10): 522-529.
131. D'Amico G, Jones DT, Nye E, Sapienza K, Ramjuan AR, Reynolds LE, *et al.* Regulation of lymphatic-blood vessel separation by endothelial Rac1. *Development* 2009, **136**(23): 4043-4053.
132. Yamada S, Nelson WJ. Localized zones of Rho and Rac activities drive initiation and expansion of epithelial cell-cell adhesion. *J Cell Biol* 2007, **178**(3): 517-527.
133. Connolly JO, Simpson N, Hewlett L, Hall A. Rac regulates endothelial morphogenesis and capillary assembly. *Mol Biol Cell* 2002, **13**(7): 2474-2485.
134. Bayless KJ, Davis GE. The Cdc42 and Rac1 GTPases are required for capillary lumen formation in three-dimensional extracellular matrices. *J Cell Sci* 2002, **115**(Pt 6): 1123-1136.
135. Davis GE, Stratman AN, Sacharidou A, Koh W. Molecular basis for endothelial lumen formation and tubulogenesis during vasculogenesis and angiogenic sprouting. *International review of cell and molecular biology* 2011, **288**: 101-165.
136. Kesavan G, Sand FW, Greiner TU, Johansson JK, Kobberup S, Wu X, *et al.* Cdc42-mediated tubulogenesis controls cell specification. *Cell* 2009, **139**(4): 791-801.
137. Bryant DM, Datta A, Rodriguez-Fraticelli AE, Peranen J, Martin-Belmonte F, Mostov KE. A molecular network for de novo generation of the apical surface and lumen. *Nat Cell Biol* 2010, **12**(11): 1035-1045.
138. Jin Y, Liu Y, Lin Q, Li J, Druso JE, Antonyak MA, *et al.* Deletion of Cdc42 enhances ADAM17-mediated vascular endothelial growth factor receptor 2 shedding and impairs vascular endothelial cell survival and vasculogenesis. *Mol Cell Biol* 2013, **33**(21): 4181-4197.

139. Chen F, Ma L, Parrini MC, Mao X, Lopez M, Wu C, *et al.* Cdc42 is required for PIP(2)-induced actin polymerization and early development but not for cell viability. *Current biology : CB* 2000, **10**(13): 758-765.
140. Yang L, Wang L, Kalfa TA, Cancelas JA, Shang X, Pushkaran S, *et al.* Cdc42 critically regulates the balance between myelopoiesis and erythropoiesis. *Blood* 2007, **110**(12): 3853-3861.
141. Johnson DI, Pringle JR. Molecular characterization of CDC42, a *Saccharomyces cerevisiae* gene involved in the development of cell polarity. *J Cell Biol* 1990, **111**(1): 143-152.
142. Gomes ER, Jani S, Gundersen GG. Nuclear movement regulated by Cdc42, MRCK, myosin, and actin flow establishes MTOC polarization in migrating cells. *Cell* 2005, **121**(3): 451-463.
143. Stratman AN, Davis GE. Endothelial cell-pericyte interactions stimulate basement membrane matrix assembly: influence on vascular tube remodeling, maturation, and stabilization. *Microscopy and microanalysis : the official journal of Microscopy Society of America, Microbeam Analysis Society, Microscopical Society of Canada* 2012, **18**(1): 68-80.
144. Fukuhara A, Shimizu K, Kawakatsu T, Fukuhara T, Takai Y. Involvement of nectin-activated Cdc42 small G protein in organization of adherens and tight junctions in Madin-Darby canine kidney cells. *The Journal of biological chemistry* 2003, **278**(51): 51885-51893.
145. Broman MT, Mehta D, Malik AB. Cdc42 regulates the restoration of endothelial adherens junctions and permeability. *Trends in cardiovascular medicine* 2007, **17**(5): 151-156.
146. Kouklis P, Konstantoulaki M, Vogel S, Broman M, Malik AB. Cdc42 regulates the restoration of endothelial barrier function. *Circ Res* 2004, **94**(2): 159-166.
147. Noda M, Kitayama H, Matsuzaki T, Sugimoto Y, Okayama H, Bassin RH, *et al.* Detection of genes with a potential for suppressing the transformed phenotype associated with activated ras genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1989, **86**(1): 162-166.
148. Kitayama H, Sugimoto Y, Matsuzaki T, Ikawa Y, Noda M. A ras-related gene with transformation suppressor activity. *Cell* 1989, **56**(1): 77-84.

149. Schmitt JM, Stork PJ. Cyclic AMP-mediated inhibition of cell growth requires the small G protein Rap1. *Mol Cell Biol* 2001, **21**(11): 3671-3683.
150. Pizon V, Lerosey I, Chardin P, Tavitian A. Nucleotide sequence of a human cDNA encoding a ras-related protein (rap1B). *Nucleic acids research* 1988, **16**(15): 7719.
151. Pizon V, Chardin P, Lerosey I, Olofsson B, Tavitian A. Human cDNAs rap1 and rap2 homologous to the Drosophila gene Dras3 encode proteins closely related to ras in the 'effector' region. *Oncogene* 1988, **3**(2): 201-204.
152. Beranger F, Goud B, Tavitian A, de Gunzburg J. Association of the Ras-antagonistic Rap1/Krev-1 proteins with the Golgi complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1991, **88**(5): 1606-1610.
153. Pizon V, Desjardins M, Bucci C, Parton RG, Zerial M. Association of Rap1a and Rap1b proteins with late endocytic/phagocytic compartments and Rap2a with the Golgi complex. *J Cell Sci* 1994, **107** (Pt 6): 1661-1670.
154. Liao Y, Satoh T, Gao X, Jin TG, Hu CD, Kataoka T. RA-GEF-1, a guanine nucleotide exchange factor for Rap1, is activated by translocation induced by association with Rap1*GTP and enhances Rap1-dependent B-Raf activation. *The Journal of biological chemistry* 2001, **276**(30): 28478-28483.
155. Mitra RS, Zhang Z, Henson BS, Kurnit DM, Carey TE, D'Silva NJ. Rap1A and rap1B ras-family proteins are prominently expressed in the nucleus of squamous carcinomas: nuclear translocation of GTP-bound active form. *Oncogene* 2003, **22**(40): 6243-6256.
156. Gao X, Satoh T, Liao Y, Song C, Hu CD, Kariya Ki K, *et al.* Identification and characterization of RA-GEF-2, a Rap guanine nucleotide exchange factor that serves as a downstream target of M-Ras. *The Journal of biological chemistry* 2001, **276**(45): 42219-42225.
157. Pannekoek W, Post A, Bos J. Rap1 signaling in endothelial barrier control. *Cell Adhesion & Migration* 2014, **8**(2): 100-107.
158. Asuri S, Yan J, Parnavitana NC, Quilliam LA. E-cadherin dis-engagement activates the Rap1 GTPase. *J Cell Biochem* 2008, **105**(4): 1027-1037.
159. Chrzanowska-Wodnicka M, White G, Quilliam L, Whitehead K. Small GTPase Rap1 Is Essential for Mouse Development and Formation of Functional Vasculature. *Plos One* 2015.

160. Lakshmikanthan S, Sobczak M, Li Calzi S, Shaw L, Grant MB, Chrzanowska-Wodnicka M. Rap1B promotes VEGF-induced endothelial permeability and is required for dynamic regulation of the endothelial barrier. *J Cell Sci* 2018, **131**(1).
161. van den Berghe N, Cool RH, Wittinghofer A. Discriminatory residues in Ras and Rap for guanine nucleotide exchange factor recognition. *The Journal of biological chemistry* 1999, **274**(16): 11078-11085.
162. Bokoch GM, Quilliam LA. Guanine nucleotide binding properties of rap1 purified from human neutrophils. *Biochem J* 1990, **267**(2): 407-411.
163. Scrima A, Thomas C, Deaconescu D, Wittinghofer A. The Rap-RapGAP complex: GTP hydrolysis without catalytic glutamine and arginine residues. *The EMBO journal* 2008, **27**(7): 1145-1153.
164. Sacco E, Fantinato S, Manzoni R, Metalli D, De Gioia L, Fantucci P, *et al.* The isolated catalytic hairpin of the Ras-specific guanine nucleotide exchange factor Cdc25Mm retains nucleotide dissociation activity but has impaired nucleotide exchange activity. *FEBS letters* 2005, **579**(30): 6851-6858.
165. Hall BE, Yang SS, Boriack-Sjodin PA, Kuriyan J, Bar-Sagi D. Structure-based mutagenesis reveals distinct functions for Ras switch 1 and switch 2 in Sos-catalyzed guanine nucleotide exchange. *The Journal of biological chemistry* 2001, **276**(29): 27629-27637.
166. Feller SM. Crk family adaptors-signalling complex formation and biological roles. *Oncogene* 2001, **20**(44): 6348-6371.
167. Radha V, Rajanna A, Swarup G. Phosphorylated guanine nucleotide exchange factor C3G, induced by pervanadate and Src family kinases localizes to the Golgi and subcortical actin cytoskeleton. *BMC cell biology* 2004, **5**: 31.
168. Wang Z, Dillon TJ, Pokala V, Mishra S, Labudda K, Hunter B, *et al.* Rap1-mediated activation of extracellular signal-regulated kinases by cyclic AMP is dependent on the mode of Rap1 activation. *Mol Cell Biol* 2006, **26**(6): 2130-2145.
169. de Rooij J, Boenink NM, van Triest M, Cool RH, Wittinghofer A, Bos JL. PDZ-GEF1, a guanine nucleotide exchange factor specific for Rap1 and Rap2. *The Journal of biological chemistry* 1999, **274**(53): 38125-38130.
170. Ohtsuka T, Hata Y, Ide N, Yasuda T, Inoue E, Inoue T, *et al.* nRap GEP: a novel neural GDP/GTP exchange protein for rap1 small G protein that interacts with synaptic

- scaffolding molecule (S-SCAM). *Biochemical and biophysical research communications* 1999, **265**(1): 38-44.
171. Bos JL, de Rooij J, Reedquist KA. Rap1 signalling: adhering to new models. *Nature reviews Molecular cell biology* 2001, **2**(5): 369-377.
172. Rubinfeld B, Munemitsu S, Clark R, Conroy L, Watt K, Crosier WJ, *et al.* Molecular cloning of a GTPase activating protein specific for the Krev-1 protein p21rap1. *Cell* 1991, **65**(6): 1033-1042.
173. Kurachi H, Wada Y, Tsukamoto N, Maeda M, Kubota H, Hattori M, *et al.* Human SPA-1 gene product selectively expressed in lymphoid tissues is a specific GTPase-activating protein for Rap1 and Rap2. Segregate expression profiles from a rap1GAP gene product. *The Journal of biological chemistry* 1997, **272**(44): 28081-28088.
174. Takai Y, Ikeda W, Ogita H, Rikitake Y. The immunoglobulin-like cell adhesion molecule nectin and its associated protein afadin. *Annual review of cell and developmental biology* 2008, **24**: 309-342.
175. Takai Y, Nakanishi H. Nectin and afadin: novel organizers of intercellular junctions. *J Cell Sci* 2003, **116**(Pt 1): 17-27.
176. Yamamoto T, Harada N, Kano K, Taya S, Canaani E, Matsuura Y, *et al.* The Ras target AF-6 interacts with ZO-1 and serves as a peripheral component of tight junctions in epithelial cells. *J Cell Biol* 1997, **139**(3): 785-795.
177. Hoshino T, Sakisaka T, Baba T, Yamada T, Kimura T, Takai Y. Regulation of E-cadherin endocytosis by nectin through afadin, Rap1, and p120ctn. *The Journal of biological chemistry* 2005, **280**(25): 24095-24103.
178. Tawa H, Rikitake Y, Takahashi M, Amano H, Miyata M, Satomi-Kobayashi S, *et al.* Role of afadin in vascular endothelial growth factor- and sphingosine 1-phosphate-induced angiogenesis. *Circ Res* 2010, **106**(11): 1731-1742.
179. Ikeda W, Nakanishi H, Miyoshi J, Mandai K, Ishizaki H, Tanaka M, *et al.* Afadin: A key molecule essential for structural organization of cell-cell junctions of polarized epithelia during embryogenesis. *J Cell Biol* 1999, **146**(5): 1117-1132.
180. Serebriiskii I, Estojak J, Sonoda G, Testa JR, Golemis EA. Association of Krev-1/rap1a with Krit1, a novel ankyrin repeat-containing protein encoded by a gene mapping to 7q21-22. *Oncogene* 1997, **15**(9): 1043-1049.

181. Wohlgemuth S, Kiel C, Kramer A, Serrano L, Wittinghofer F, Herrmann C. Recognizing and defining true Ras binding domains I: biochemical analysis. *Journal of molecular biology* 2005, **348**(3): 741-758.
182. Glading A, Han J, Stockton R, Ginsberg M. Krit-1/ccm1 is a rap1 effector that regulates endothelial cell cell junctions. *J Cell Biol* 2007, **179**: 247-254.
183. van den Berg MC, Burgering BM. CCM1 and the second life of proteins in adhesion complexes. *Cell Adh Migr* 2014, **8**(2): 146-157.
184. Beraud-Dufour S, Gautier R, Albiges-Rizo C, Chardin P, Faurobert E. Krit 1 interactions with microtubules and membranes are regulated by Rap1 and integrin cytoplasmic domain associated protein-1. *The FEBS journal* 2007, **274**(21): 5518-5532.
185. Liu J, Stockton R, Gingras A, Ablooglu A, Han J, Bobkov A, *et al.* A mechanism of rap1-induced stabilization of endothelial cell-cell junctions. *Mol Biol Cell* 2011, **22**: 2509-2519.
186. Stockton RA, Shenkar R, Awad IA, Ginsberg MH. Cerebral cavernous malformations proteins inhibit Rho kinase to stabilize vascular integrity. *The Journal of experimental medicine* 2010, **207**(4): 881-896.
187. Zhang J, Clatterbuck RE, Rigamonti D, Chang DD, Dietz HC. Interaction between krit1 and icap1alpha infers perturbation of integrin beta1-mediated angiogenesis in the pathogenesis of cerebral cavernous malformation. *Hum Mol Genet* 2001, **10**(25): 2953-2960.
188. Maddaluno L, Rudini N, Cuttano R, Bravi L, Giampietro C, Corada M, *et al.* EndMT contributes to the onset and progression of cerebral cavernous malformations. *Nature* 2013, **498**(7455): 492-496.
189. Mitin NY, Ramocki MB, Zullo AJ, Der CJ, Konieczny SF, Taparowsky EJ. Identification and characterization of rain, a novel Ras-interacting protein with a unique subcellular localization. *The Journal of biological chemistry* 2004, **279**(21): 22353-22361.
190. Wilson CW, Parker LH, Hall CJ, Smyczek T, Mak J, Crow A, *et al.* Rasip1 regulates vertebrate vascular endothelial junction stability through Epac1-Rap1 signaling. *Blood* 2013, **122**(22): 3678-3690.
191. Xu K, Chong DC, Rankin SA, Zorn AM, Cleaver O. Rasip1 is required for endothelial cell motility, angiogenesis and vessel formation. *Developmental biology* 2009, **329**(2): 269-279.

192. Xu K SA, Fu S, et al. Blood vessel tubulogenesis requires Rasip1 regulation of GTPase signaling. 2011, **20**: 526-539.
193. Fujita H, Fukuhara S, Sakurai A, Yamagishi A, Kamioka Y, Nakaoka Y, *et al.* Local activation of Rap1 contributes to directional vascular endothelial cell migration accompanied by extension of microtubules on which RAPL, a Rap1-associating molecule, localizes. *The Journal of biological chemistry* 2005, **280**(6): 5022-5031.
194. Katagiri K, Maeda A, Shimonaka M, Kinashi T. RAPL, a Rap1-binding molecule that mediates Rap1-induced adhesion through spatial regulation of LFA-1. *Nature immunology* 2003, **4**(8): 741-748.
195. Geli J, Kogner P, Lanner F, Natalishvili N, Juhlin C, Kiss N, *et al.* Assessment of NORE1A as a putative tumor suppressor in human neuroblastoma. *International journal of cancer* 2008, **123**(2): 389-394.
196. Wilson C, Ye W. Regulation of vascular endothelial junction stability and remodeling through Rap1-Rasip1 signaling. *Cell Adh Migr* 2014, **8**: 76-83.
197. Otrrock Z, Mahfouz R, Makarem J, Shamseddine A. Understanding the biology of angiogenesis: review of the most important molecular mechanisms. *Blood Cells Mol Dis* 2007, **39**(2): 212-220.
198. Abdel-Malak N, Mofarrahi M, Mayaki D, Khachigian L, Hussain S. Early growth response-1 regulates angiopoietin-1-induced endothelial cell proliferation, migration, and differentiation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009, **29**(2): 209-216.
199. Ando K, Fukuhara S, Moriya T, Obara Y, Nakahata N, Mochizuki N. Rap1 potentiates endothelial cell junctions by spatially controlling myosin II activity and actin organization. *J Cell Biol* 2013, **202**(6): 901-916.
200. Jeon TJ, Lee DJ, Merlot S, Weeks G, Firtel RA. Rap1 controls cell adhesion and cell motility through the regulation of myosin II. *J Cell Biol* 2007, **176**(7): 1021-1033.
201. Fukuhara S, Sakurai A, Sano H, Yamagishi A, Somekawa S, Takakura N, *et al.* Cyclic AMP potentiates vascular endothelial cadherin mediated cell-cell contact to enhance endothelial barrier function through an Epac-Rap1 signaling pathway. *Mol Cell Biol* 2005, **25**: 136—146.
202. Cerutti C, Ridley A. Endothelial cell-cell adhesion and signaling. *Exp Cell Res* 2017, **358**: 31-38.

203. Ramos C, Lin C, Liu X, Antonetti D. The EPAC-Rap1 pathway prevents and reverses cytokine-induced retinal vascular permeability. *Journal of Biological Chemistry* 2017, **293**: 717-730.
204. Post A, Pannekoek W, Ross S, Verlaan I, Brouwer P, Bos J. Rasip1 mediates Rap1 regulation of Rho in endothelial barrier function through ArhGAP29. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2013, **28**: 11427-11432.
205. Bonello T, Perez-Vale K, Sumigray K, Peifer M. Development. Rap1 acts via multiple mechanisms to position Cnnoe/Afadin and adherens junctions and mediate apical-basal polarity establishment. *Development* 2018, **145**(2).
206. Glading A, Han J, Stockton RA, Ginsberg MH. KRIT-1/CCM1 is a Rap1 effector that regulates endothelial cell cell junctions. *J Cell Biol* 2007, **179**(2): 247-254.
207. Sundberg C, Kowanetz M, Brown L, Detmar M, Dvorak H. Stable expression of angiopoietin-1 and other markers by cultured pericytes: phenotypic similarities to a subpopulation of cells in maturing vessels during later stages of angiogenesis in vivo. *Lab Invest* 2002, **82**: 387-401.
208. Satoh N, Yamada Y, Kinugasa Y, Takakura N. Angiopoietin-1 alters tumor growth by stabilizing blood vessels or by promoting angiogenesis. *Cancer Sci* 2008, **99**: 2373-2379.
209. Shah A, Birdsey G, Peghaire C, Pitulescu M, Dufton N, Yang Y, *et al.* The endothelial transcription factor ERG mediates Angiopoietin-1-dependent control of Notch signalling and vascular stability. *Nature Communications* 2017, **8**.
210. Thurston G, Rudge JS, Ioffe E, Zhou H, Ross L, Croll SD, *et al.* Angiopoietin-1 protects the adult vasculature against plasma leakage. *Nat Med* 2000, **6**(4): 460-463.
211. Pizurki L, Zhou Z, Glynos K, Roussos C, Papapetropoulos A. Angiopoietin-1 inhibits endothelial permeability, neutrophil adherence and IL-8 production. *British journal of pharmacology* 2003, **139**(2): 329-336.
212. Thurston G, Suri C, Smith K, McClain J, Sato TN, Yancopoulos GD, *et al.* Leakage-resistant blood vessels in mice transgenically overexpressing angiopoietin-1. *Science* 1999, **286**(5449): 2511-2514.
213. Bos J. Linking Rap to cell adhesion. *Current Opinion in Cell Biologie* 2005, **17**(2): 123-128.

214. Acevedo L, Yu J, Erdjument-Bromage H, Miao RQ, Kim JE, Fulton D, *et al.* A new role for Nogo as a regulator of vascular remodeling. *Nat Med* 2004, **10**: 382-388.
215. Carmona G, Göttig S, Orlandi A, Scheele J, Bäuerle T, Jugold M, *et al.* Role of the small GTPase Rap1 for integrin activity regulation in endothelial cells and angiogenesis. *Blood* 2009, **113**: 488-497.
216. Korff T, Augustin H. Integration of endothelial cells in multicellular spheroids prevents apoptosis and induces differentiation. *J Cell Biol* 1998, **143**: 1341-1352.
217. Chrzanowska-Wodnicka M. Regulation of angiogenesis by a small GTPase Rap1. *Vasc Pharmacol* 2010, **53**(1-2): 1-10.
218. Cullere X, Shaw S, Andersson L, Hirahashi J, Luscinskas F, Mayadas T. Regulation of vascular endothelial barrier function by Epac, a cAMP-activated exchange factor for Rap GTPase. *Blood* 2005, **105**: 1950-1955.
219. Carmeliet P, Lampugnani M-G, Moons L, Breviario F, Compernelle V, Bono F, *et al.* Targeted deficiency or cytosolic truncation of the VE-cadherin gene in mice impairs VEGF-mediated endothelial survival and angiogenesis. *Cell* 1999, **98**: 147-157.
220. M. C-W. Distinct functions for Rap1 signaling in vascular morphogenesis and dysfunction. *Exp Cell Res* 2013, **319**: 2350-2359.
221. Chidiac R, Zhang Y, Tessier S, Faubert D, Delisle C, Gratton JP. Comparative Phosphoproteomics Analysis of VEGF and Angiopoietin-1 Signaling Reveals ZO-1 as a Critical Regulator of Endothelial Cell Proliferation. *Molecular & cellular proteomics : MCP* 2016, **15**(5): 1511-1525.
222. Orlova VV, Economopoulou M, Lupu F, Santoso S, Chavakis T. Junctional adhesion molecule-C regulates vascular endothelial permeability by modulating VE-cadherin-mediated cell-cell contacts. *The Journal of experimental medicine* 2006, **203**(12): 2703-2714.
223. Kooistra MR, Corada M, Dejana E, Bos JL. Epac1 regulates integrity of endothelial cell junctions through VE-cadherin. *FEBS letters* 2005, **579**(22): 4966-4972.
224. Glocerich M, Bos JL. Regulating Rap small G-proteins in time and space. *Trends in cell biology* 2011, **21**(10): 615-623.

225. Roberts OL, Dart C. cAMP signalling in the vasculature: the role of Epac (exchange protein directly activated by cAMP). *Biochem Soc Trans* 2014, **42**(1): 89-97.
226. Frye M, Dierkes M, Kuppers V, Vockel M, Tomm J, Zeuschner D, Rossaint J, Zarbock A, Koh G.Y., Peters K, et al. Interfering with VE-PTP stabilizes endothelial junctions in vivo via Tie-2 in the absence of VE-cadherin. *J Exp Med* 2015, **212**: 2267-2287.
227. Voss A, Gruss P, Thomas T. The guanine nucleotide exchange factor C3G is necessary for the formation of focal adhesions and vascular maturation. *Development* 2003, **130**(2): 355-367.
228. Wei P, Satoh T, Edamatsu H, Aiba A, Setsu T, Terashima T, et al. Defective vascular morphogenesis and mid-gestation embryonic death in mice lacking RA-GEF-1. *Biochem Biophys Res Commun* 2007, **363**(1): 106-112.
229. Giannotta M, Trani M, Dejana E. VE-cadherin and endothelial adherens junctions: active guardians of vascular integrity. *Developmental cell* 2013, **26**(5): 441-454.
230. Wimmer R, Cseh B, Maier B, Scherrer K, Baccarini M. Angiogenic sprouting requires the fine tuning of endothelial cell cohesion by the Raf-1/Rok- α complex. *Developmental cell* 2012, **22**(1): 158-171.
231. Ohba Y, Ikuta K, Ogura A, Matsuda J, Mochizuki N, Nagashima K, et al. Requirement for C3G-dependent Rap1 activation for cell adhesion and embryogenesis. *The EMBO journal* 2001, **20**(13): 3333-3341.
232. Shimonaka M, Katagiri K, Nakayama T, Fujita N, Tsuruo T, Yoshie O, et al. Rap1 translates chemokine signals to integrin activation, cell polarization, and motility across vascular endothelium under flow. *J Cell Biol* 2003, **161**(2): 417-427.
233. McLeod SJ, Li AH, Lee RL, Burgess AE, Gold MR. The Rap GTPases regulate B cell migration toward the chemokine stromal cell-derived factor-1 (CXCL12): potential role for Rap2 in promoting B cell migration. *J Immunol* 2002, **169**(3): 1365-1371.
234. Shin Y, Jeon JS, Han S, Jung GS, Shin S, Lee SH, et al. In vitro 3D collective sprouting angiogenesis under orchestrated ANG-1 and VEGF gradients. *Lab on a chip* 2011, **11**(13): 2175-2181.

