

2011.3019.11

Université de Montréal

Mécanismes par lesquels le VEGF induit la synthèse du NO  
dans les cellules endothéliales

par

David Gélinas

Département de Pharmacologie

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des Études Supérieures

en vue de l'obtention du grade de

Maître ès science (M. Sc.)

en pharmacologie

avril 2002

© David Gélinas, 2002





Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :  
Mécanismes par lesquels le VEGF induit la synthèse du NO  
dans les cellules endothéliales

présenté par  
David Gélinas

Département de Pharmacologie  
Faculté de Médecine

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes

Dr Denis deBlois.....président-rapporteur  
Dr Martin G. Sirois.....directeur de recherche  
Dr Pedro D'Orleans Juste.....membre du jury

## RÉSUMÉ

Certaines controverses existent concernant le(s) mécanisme(s) par le(s)quel(s) le "vascular endothelial growth factor" (VEGF) induit l'activation de la synthèse de l'oxyde nitrique endothéliale (eNOS). Par conséquent, nous avons étudié la contribution de différentes voies de signalisation menant à la synthèse du monoxyde d'azote (NO) qui a été quantifié par la synthèse de GMPc. De plus, comme le VEGF induit la synthèse du "platelet-activating factor" (PAF) et du NO, nous avons voulu déterminer s'il existait une interaction entre ces deux molécules. Dans cette étude, nous avons démontré qu'un prétraitement avec un inhibiteur de la phospholipase C (PLC) (U73122), un antagoniste de la calmoduline (W-7) ou avec des chélateurs calciques (EGTA/AM, BAPTA/AM) prévenait la phosphorylation sur la Sérine 1177 (Ser<sup>1177</sup>) de la eNOS et la synthèse de GMPc induite par le VEGF. Toutefois, un prétraitement avec deux inhibiteurs de la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) (Wortmannin, LY294002) ou de la protéine kinase C (PKC) (GF109203X, Ro318220) ont atténué la phosphorylation de eNOS induite par le VEGF, mais n'ont pas altéré la synthèse immédiate de GMPc (0-10 min) médiée par le VEGF. Néanmoins, ces derniers inhibiteurs ont bloqué jusqu'à 84% la synthèse tardive de GMPc (10-30 min). Un prétraitement avec des inhibiteurs de la synthèse de PAF ou avec des antagonistes du récepteur du PAF n'ont pas atténué la phosphorylation de eNOS et la synthèse de GMPc médiée par le VEGF. Nos résultats suggèrent que le VEGF induit la synthèse immédiate de GMPc via la voie de signalisation PLC-Ca<sup>2+</sup>/CaM et que Akt et PKC sont impliqués dans l'induction de la synthèse tardive de GMPc.

Mots clés: eNOS, cellules endothéliales, PAF, PKC, Akt



## SUMMARY

Recently, controversies have arisen in regards to the mechanisms by which vascular endothelial growth factor (VEGF) induces endothelial nitric oxide synthase (eNOS) activation. Therefore, we sought to evaluate the contribution of numerous pathways in VEGF-induced nitric oxide (NO) synthesis by measuring cGMP production. In addition, as VEGF induces the synthesis of NO and platelet-activating factor (PAF), we wanted to assess if the induction of PAF and NO is contributing to the synthesis of each other. Herein, we show that a treatment with a phospholipase C (PLC) inhibitor (U73122), a calmodulin antagonist (W-7) or with intracellular calcium chelators (EGTA/AM, BAPTA/AM) prevented VEGF-mediated eNOS Ser<sup>1177</sup>-phosphorylation and NO synthesis measured by cGMP production. However, pretreatment with two phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) (Wortmannin, LY294002) or two protein kinase C (PKC) (GF109203X, Ro318220) inhibitors attenuated eNOS Ser<sup>1177</sup>-phosphorylation mediated by VEGF, but did not alter immediate (0-10 min) cGMP synthesis induced by VEGF. Nonetheless, these latter inhibitors blocked by up to 84% the delayed (10-30 min) cGMP synthesis. Pretreatment with PAF synthesis inhibitors or with PAF receptor antagonists did not abrogate neither eNOS Ser<sup>1177</sup>-phosphorylation nor cGMP synthesis mediated by VEGF. In conclusion, our data demonstrate that VEGF induces an immediate cGMP synthesis through the PLC-Ca<sup>2+</sup>/CaM pathway, and that the induction of delayed cGMP synthesis implies Akt and PKC activity.

Keywords: eNOS, endothelial cells, PAF, PKC, Akt

## TABLES DES MATIÈRES

RÉSUMÉ.....	III
ABSTRACT.....	IV
LISTE DES FIGURES.....	VII
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	VIII
REMERCIEMENTS.....	IX
1.0. INTRODUCTION.....	1
1.1. GÉNÉRALITÉS SUR LE CONCEPT D'ANGIOGENÈSE.....	1
1.1.1. Rôle de l'endothélium dans l'homéostasie vasculaire.....	1
1.1.2. Étapes du processus angiogénique.....	2
1.2. VEGF ET ANGIOGENÈSE.....	3
1.2.1. Découverte du VEGF.....	3
1.2.2. Le VEGF et ses récepteurs, Flt-1 et Flk-1.....	5
1.3. MONOXYDE D'AZOTE.....	7
1.3.1. Biosynthèse du NO.....	7
1.3.2. Mécanismes d'activation de la eNOS.....	12
1.3.3. NO et VEGF.....	17
1.4. INFLAMMATION ET PAF.....	19
1.4.1. Réaction inflammatoire.....	19
1.4.2. Inflammation et angiogénèse.....	21
1.5. PROBLÉMATIQUE ET BUT DE NOTRE ÉTUDE.....	23
1.6. APPROCHES MÉTHODOLOGIQUES.....	23
2.0. ARTICLE.....	26
2.1. Abstract.....	28
2.2. Introduction.....	29
2.3. Methods.....	31

2.4. Results.....	36
2.5. Discussion.....	46
2.6. Acknowledgments.....	53
2.7. References.....	54
2.8. Footnotes.....	57
2.9. Legends.....	58
2.10. Figures.....	63
3.0. DISCUSSION.....	74
3.1. Formation du complexe Ca <sup>2+</sup> /CaM et activation de la eNOS.....	76
3.2. La synthèse immédiate de GMPc est Akt-indépendante.....	77
3.3. La synthèse tardive de GMPc est PKC- et Akt-dépendante.....	80
3.4. Absence d'interaction entre la synthèse de PAF et du NO médiée par le VEGF.....	83
3.5. Critique de méthodologie.....	83
4.0. CONCLUSION.....	86
5.0. RÉFÉRENCES.....	89

## LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Réaction catalytique de la eNOS représentée au niveau moléculaire.....	9
Figure 2 : Réaction catalytique de la eNOS.....	11
Figure 3 : Régulation de la eNOS au niveau membranaire.....	14
Figure 4 : Mécanismes susceptibles de contribuer à l'activation de la eNOS.....	25
Figure 5 : Mécanisme proposé pour l'activation de la eNOS par le VEGF.....	88

**Article**

Figure 1 : VEGF effect on cGMP production.....	63
Figure 2 : Effect of several pathway inhibitors on VEGF-induced cGMP production.....	64
Figure 3 : VEGF effect on eNOS phosphorylation at Serine 1177.....	65
Figure 4 : VEGF effect on Akt phosphorylation at Serine 473.....	66
Figure 5 : Effect of IBMX pretreatment on VEGF-induced immediate cGMP synthesis.....	67
Figure 6 : Effect of PI3K and PKC inhibitors on VEGF-induced immediate and delayed cGMP synthesis.....	68
Figure 7 : Western blot analysis of PAFR expression.....	69
Figure 8 : Immunofluorescence analysis of PAFR.....	70
Figure 9 : Effect of VEGF-induced PAF synthesis on EC migration.....	71
Figure 10 : Effect of VEGF-induced nitric oxide production on PAF synthesis.....	72
Figure 11 : Proposed intracellular pathways for the induction of NO and PAF synthesis by VEGF in endothelial cells.....	73

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

Ca <sup>2+</sup> /CaM	:	calcium/calmoduline
CE	:	cellules endothéliales
CMLs	:	cellules musculaires lisses
CoA-IT	:	"CoA-independent transacylase"
EDRF	:	"endothelium-derived relaxing factor"
eNOS	:	synthase de l'oxyde nitrique endothéliale
Fik	:	"fetal liver kinase"
FIt	:	"fms-like tyrosine kinase"
lyso-PAF-AT	:	lyso-PAF acétyltransferase
NO	:	oxyde nitrique
PAF	:	facteur d'activation plaquettaire
PI3K	:	phosphatidylinositol 3-kinase
PLC	:	phospholipase C
PIGF	:	"placental growth factor"
PKC	:	protéine kinase C
sPLA <sub>2</sub>	:	phospholipase A <sub>2</sub> sécrétée
VEGF	:	"vascular endothelial growth factor"

## REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier sincèrement:

1. Le Docteur Martin G. Sirois, pour m'avoir dirigé durant ma maîtrise et pour son support financier.
2. Mes collègues de travail, pour leur amitié et support.
3. Le département de pharmacologie, pour la qualité des cours et des professeurs.
4. Les membres du jury pour leurs corrections et commentaires judicieux.
5. Mes parents, pour leur soutien moral et financier.

## 1.0. INTRODUCTION

### 1.1. GÉNÉRALITÉS SUR LE CONCEPT D'ANGIOGENÈSE

#### 1.1.1. Rôle de l'endothélium dans l'homéostasie vasculaire

L'invention de la microscopie photonique moderne par von Leuwenhoek (1632-1723) et Swannerdam (1637-1680) permit à la recherche anatomique de progresser de façon significative. Avec la collaboration de Ruysch (1638-1731), ces derniers mirent au point les premières techniques d'injection de substances colorées dans la lumière de vaisseaux sanguins. Malgré le fait que ces techniques étaient élémentaires, elles ont néanmoins permis d'identifier rapidement les différentes structures qui constituent ces vaisseaux. Le nom "endothélium" fut donné par His en 1865 alors qu'il fit la différence entre le "vrai" et le "faux" épithélium. His s'avéra être un ardent défenseur de la théorie stipulant que l'endothélium n'était en réalité qu'une simple barrière physique ayant comme unique but de prévenir une fuite de sang vers les tissus. Au cours du dernier siècle, des évidences grandissantes suggérèrent que cette simple monocouche joue en réalité un rôle essentiel au niveau de l'homéostasie générale. L'endothélium fut souvent associé à l'accumulation et à la transmigration de leucocytes durant l'inflammation (1), ainsi qu'à la prolifération des cellules musculaires lisses (CMLs) médiales dans la lumière vasculaire aux endroits où l'endothélium était absent (2). En 1922, Henschen démontra aussi que les cellules endothéliales (CE) étaient

directement impliquées dans le développement de la thrombose. Ainsi, la théorie de la simple barrière entre le sang et l'interstitium était révolue.

### 1.1.2. Étapes du processus angiogénique

En 1935, Hertig observa la formation de nouveaux vaisseaux sanguins au niveau du placenta (3). Il remarqua que ce phénomène était médié par le bourgeonnement de nouveaux capillaires à partir de l'endothélium de vaisseaux préexistants et l'appela angiogénèse. Par la suite en 1939, Clark et Clark rapportèrent la séquence d'événements qui constitue le processus angiogénique (4). En premier lieu, les CE de capillaires ou de veinules post-capillaires préexistants sont soumises à une intense activation en réponse à un stimulus angiogénique local. Par la suite, il se produit une vasodilatation, une augmentation de la perméabilité vasculaire et une dégradation protéolytique de la membrane basale des CE, permettant ainsi la migration des CE en direction du stimulus angiogénique. Les CE subissent alors un changement morphologique, elles s'allongent, s'alignent et bourgeonnent pour ensuite se diviser et se multiplier, permettant ainsi au tubule récemment formé de croître graduellement en longueur jusqu'à la source de la stimulation (5). La dernière étape consiste en la maturation du vaisseau qui est accomplie par la reconstitution de la membrane basale.

L'angiogénèse est essentielle tant pour le développement d'organe lors de l'embryogénèse que pour le maintien de l'intégrité structurale et fonctionnelle des différents tissus (6). De plus, l'angiogénèse est requise lors de guérisons vasculaires,



en conditions inflammatoires (7), en situation ischémique (8) et aussi au cours de certaines périodes du cycle menstruel chez la femme (9).

En revanche, lorsqu'elle est mal contrôlée, l'angiogenèse peut aussi être impliquée lors du développement de plusieurs pathologies vasculaires. Folkman émit en 1971 l'hypothèse qu'à partir d'un stade critique, une masse tumorale doit nécessairement recruter des cellules endothéliales du stroma environnant pour promouvoir son propre système de microcirculation, ce processus est orchestré par les besoins métaboliques de la tumeur en croissance rapide (10). Cette transition vers une phase angiogénique permet ainsi à la masse tumorale de progresser davantage, et d'engendrer la formation de métastases.

## 1.2. VEGF ET ANGIOGENÈSE

### 1.2.1. Découverte du VEGF

Le mécanisme par lequel l'angiogenèse pathologique est médiée fut décrit pour la première fois par Michaelson en 1948 (11). Ce dernier suggéra que dans le développement de la rétinopathie pathologique, la rétine relâche dans le corps vitreux un facteur angiogénique capable d'induire une néovascularisation non seulement locale (rétine) mais aussi distale (iris). Or, des études récentes ont clairement démontré que le "vascular endothelial growth factor" (VEGF) était non seulement ce facteur angiogénique impliqué dans les rétinopathies prolifératives (12, 13), mais qu'il était

également un élément sécrété par de nombreuses tumeurs et permettait leur vascularisation (14, 15).

Le VEGF fut initialement isolé dans le milieu de culture de cellules tumorales et comme un facteur agissant sur l'augmentation de la perméabilité vasculaire (16). Quelques années plus tard, le gène codant pour la protéine du VEGF humain fut identifié (17), et son analyse révéla qu'il est composé de 8 exons répartis sur une distance approximative de 14 Kb sur le chromosome 6p21.3 (18). Par épissage alternatif, le VEGF peut être synthétisé sous 4 différentes formes (206, 189, 165 ou 121 acides aminés) dont les deux dernières possèdent un peptide signal (19-21). Par la suite, la protéine recombinante s'est avérée être un homodimère capable de lier fortement l'héparine (22). Jusqu'à ce jour, quatre différents gènes codant pour des protéines apparentées au VEGF furent identifiés, soit le "placental growth factor" (PlGF), le VEGF-B, le VEGF-C et le VEGF-D (23-25). Quoique le rôle exact de ces facteurs de croissance demeure encore méconnu, leurs fortes homologues avec le VEGF laissent suggérer qu'ils sont impliqués dans la régulation de la croissance des vaisseaux sanguins et lymphatiques.

Reconnu pour exercer de nombreuses actions principalement au niveau de l'endothélium vasculaire, le VEGF est capable d'induire auprès des cellules endothéliales des accumulations transitoires de calcium cytoplasmique (26), des changements morphologiques cellulaires (27), ainsi que leur prolifération et leur migration (28). Des études *in vivo* ont également permis de démontrer que le VEGF

est un facteur inflammatoire et angiogénique (29). Cette dernière propriété a fasciné la communauté scientifique puisque le phénomène d'angiogenèse est un processus complexe impliquant la dégradation de la membrane basale vasculaire et de la matrice extracellulaire, ainsi que la migration et la prolifération des CE. Le VEGF possède la capacité d'influencer toutes ces étapes de façon directe ou indirecte, ce qui fait sans doute de lui un facteur de premier ordre lors de l'angiogenèse pathologique. Par ailleurs, les activités du VEGF ne sont pas exclusivement restreintes à l'endothélium puisqu'il est également capable d'induire la migration des monocytes (30). Ces données renforcent l'hypothèse voulant que ce dernier soit capable de provoquer une réponse inflammatoire pouvant mener à l'angiogenèse.

#### 1.2.2. Le VEGF et ses récepteurs, Flt-1 et Flk-1

Des études de liaison avec des radioligands sur des tissus de rats foetaux et adultes ont démontré que les sites de liaison à haute affinité du VEGF sont restreints à l'endothélium de petits et grands vaisseaux *in situ* (31, 32). Des études subséquentes ont montré qu'il exerce ses multiples actions via l'activation de récepteurs de type tyrosine kinase, soit le "fms-like tyrosine kinase" (Flt-1) et le "fetal liver kinase" (Flk-1/KDR) (33, 34). Ces deux récepteurs sont constitués chacun de 7 domaines de type immunoglobuline ainsi que d'une seule région transmembranaire (35, 36). Le récepteur Flt-1 possède la plus haute affinité pour le VEGF avec un  $K_d$  (constante d'affinité) de 10-20 pM (33), alors que le  $K_d$  de Flk-1 est de 75-125 pM (34).

De nombreuses observations laissent croire que ces deux récepteurs jouent un rôle de première importance dans l'angiogenèse reliée au VEGF. Leur stimulation par le VEGF entraîne leur phosphorylation, suivie par une élévation de calcium intracellulaire (37-39). Par ailleurs, certaines études ont rapporté que ces deux récepteurs étaient surexprimés au niveau de tumeurs métastatiques (40), des coeurs infarciés (41) et de rétines de patients diabétiques (42). Néanmoins, les données les plus intéressantes proviennent d'étude chez des souris transgéniques. La dislocation homozygote (knockout) du gène Flt-1 permet un développement normal des CE mais interfère avec l'assemblage tridimensionnel des vaisseaux (43), alors que celle du gène Flk-1 bloque la différenciation des angioblastes en CE, engendrant dans ces deux cas une mort au niveau embryonnaire (44). Toutefois, d'après certaines données récentes, il semblerait que l'activation de Flk-1 uniquement soit suffisante pour induire la majeure partie des effets du VEGF *in vitro*. Par exemple, la majorité, sinon la totalité, des études *in vitro* ont démontré que la synthèse de NO induite par le VEGF chez les cellules endothéliales est Flk-1-dépendante (45, 46). Par ailleurs, le VEGF est capable de provoquer une autophosphorylation légère ou même indétectable du récepteur Flt-1 (37). De plus, de nombreux types de cellules n'exprimant pas ces récepteurs ont montré une forte réponse mitogénique et/ou chimiotactique au VEGF lorsqu'elles furent transfectées avec un plasmide codant pour le récepteur Flk-1 (37, 38). En revanche, une telle activité n'a pas été observée lorsque ces cellules furent transfectées avec le gène du récepteur Flt-1 (37).

### 1.3. MONOXYDE D'AZOTE

#### 1.3.1. Biosynthèse du NO

Dans les années 80, les études avant-gardistes de Furchgott et Zawadzki ont démontré que l'endothélium vasculaire était la source d'un facteur vasorelaxant non-prostanoïque. Ils ont observé que des anneaux aortiques précontractés de lapins dilataient en réponse à une stimulation à l'acétylcholine, et que cette réponse était perdue dans les anneaux aortiques dénudés d'endothélium (47). Subséquemment, cette molécule alors nommée "endothelium-derived relaxing factor" (EDRF) fut identifiée comme étant le NO puisque ces deux molécules, EDRF et NO, avaient un effet similaire sur la relaxation des CMLs et sur la liaison avec des molécules telles que l'hémoglobine et le superoxide (48, 49).

Depuis sa découverte, il y a eu une explosion dans la recherche consacrée au NO allant de son implication dans le système cardiovasculaire jusqu'au système nerveux. En effet, mis à part son rôle dans le maintien de l'homéostasie vasculaire, le NO est un médiateur cellulaire de premier plan au niveau du système nerveux central et périphérique (50). Le NO contribue aussi au système de défense immunitaire en vertu de son implication dans la défense de l'organisme via ses propriétés anti-tumorales et anti-pathogènes (51). Les fonctions du NO décrites ci-haut sont bénéfiques pour maintenir l'équilibre physiologique homéostatique. Néanmoins, le NO est aussi impliqué dans une variété de conditions pathologiques et inflammatoires qui

peuvent mener à des blessures tissulaires telles que l'arthrite, l'athérosclérose, le cancer, le diabète, les maladies neurodégénératives et l'infarctus du myocarde (52).

Contrairement aux messagers intracellulaires classiques, le NO diffuse librement et ses effets biologiques sont déterminés par sa réactivité chimique avec les molécules avoisinantes. La synthèse de NO est générée à la suite d'une réaction catalytique de la NOS. Jusqu'à présent, trois isoformes distincts de la NOS ont été isolés et purifiés (53). D'un côté, il y a la NOS endothéliale (eNOS) et la NOS neuronale (nNOS) qui sont constitutivement présentes contrairement à la NOS inductible (iNOS) qui est seulement exprimée lorsque la cellule a été en conditions ischémiques ou en contact avec des cytokines ou agents pathogènes (54).

L'enzyme eNOS a été initialement purifiée dans l'endothélium vasculaire, mais depuis, les recherches ont permis de découvrir que la eNOS se retrouve aussi au niveau des myocytes cardiaques, des plaquettes sanguines et du cerveau (hippocampus) (55). L'isoforme nNOS a été caractérisé dans les plaquettes, les cellules musculaires lisses et les neurones centraux et périphériques (110). Ces deux derniers isoformes nécessitent la liaison du complexe calcium/calmoduline ( $Ca^{2+}/CaM$ ) pour être activés contrairement à la iNOS qui est calcium-indépendante (56).

La eNOS est une enzyme contenant un domaine oxygénase N-terminal et un domaine réductase C-terminale. Les substrats nécessaires à la production de NO sont l'acide aminé L-Arginine, l'oxygène moléculaire ( $O_2$ ) et le NADPH tandis que les

cofacteurs impliqués dans l'activation de la eNOS sont la tétrahydrobioptérine (BH<sub>4</sub>), la flavine adénine dinucléotide (FAD) et la flavine mononucléotide (FMN). L'enzyme contient aussi un site pour le hème et un site pour la liaison de la calmoduline. Le processus de synthèse de NO commence avec la liaison du complexe Ca<sup>2+</sup>/CaM à la eNOS se situant entre le domaine oxygénase et réductase. Par la suite, il y a un transfert d'électrons provenant du substrat NADPH, situé au niveau du domaine réductase, vers le site hème du domaine oxygénase. Ce transfert d'électrons réagit avec la L-Arginine et l'O<sub>2</sub> pour finalement créer une synthèse du NO et de citrulline (57) (Figs. 1 et 2).

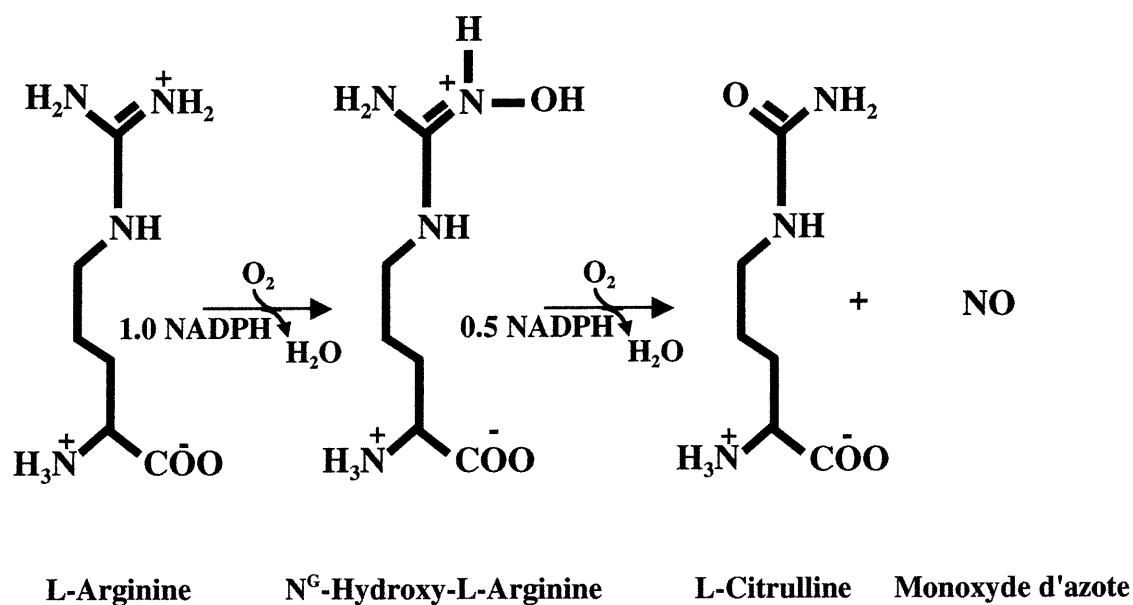


Figure 1. Réaction catalytique de la eNOS représentée au niveau moléculaire.

Les figures 1 et 2 illustrent les étapes impliquées dans la synthèse de NO résultant de l'action enzymatique de la eNOS. Néanmoins, la eNOS possède aussi la

**Figure 2. Réaction catalytique de la eNOS.** La eNOS est une enzyme contenant un domaine oxygénase N-terminal et un domaine réductase C-terminale. Les substrats nécessaires à la production de NO sont l'acide aminé L-Arginine, l'oxygène moléculaire ( $O_2$ ) et le NADPH tandis que les cofacteurs impliqués dans l'activation de la eNOS sont la tétrahydrobioptérine ( $BH_4$ ), la flavine adénine dinucléotide (FAD) et la flavine mononucléotide (FMN). L'enzyme contient aussi un site pour le hème et un site pour la liaison de la calmoduline. Le processus de synthèse de NO commence avec la liaison du complexe  $Ca^{2+}/CaM$  à la eNOS se situant entre le domaine oxygénase et réductase. Par la suite, il y a un transfert d'électrons provenant du substrat NADPH, situé au niveau du domaine réductase, vers le site hème du domaine oxygénase. Ce transfert d'électrons réagit avec la L-Arginine et l' $O_2$  pour finalement créer une synthèse de NO et de citrulline



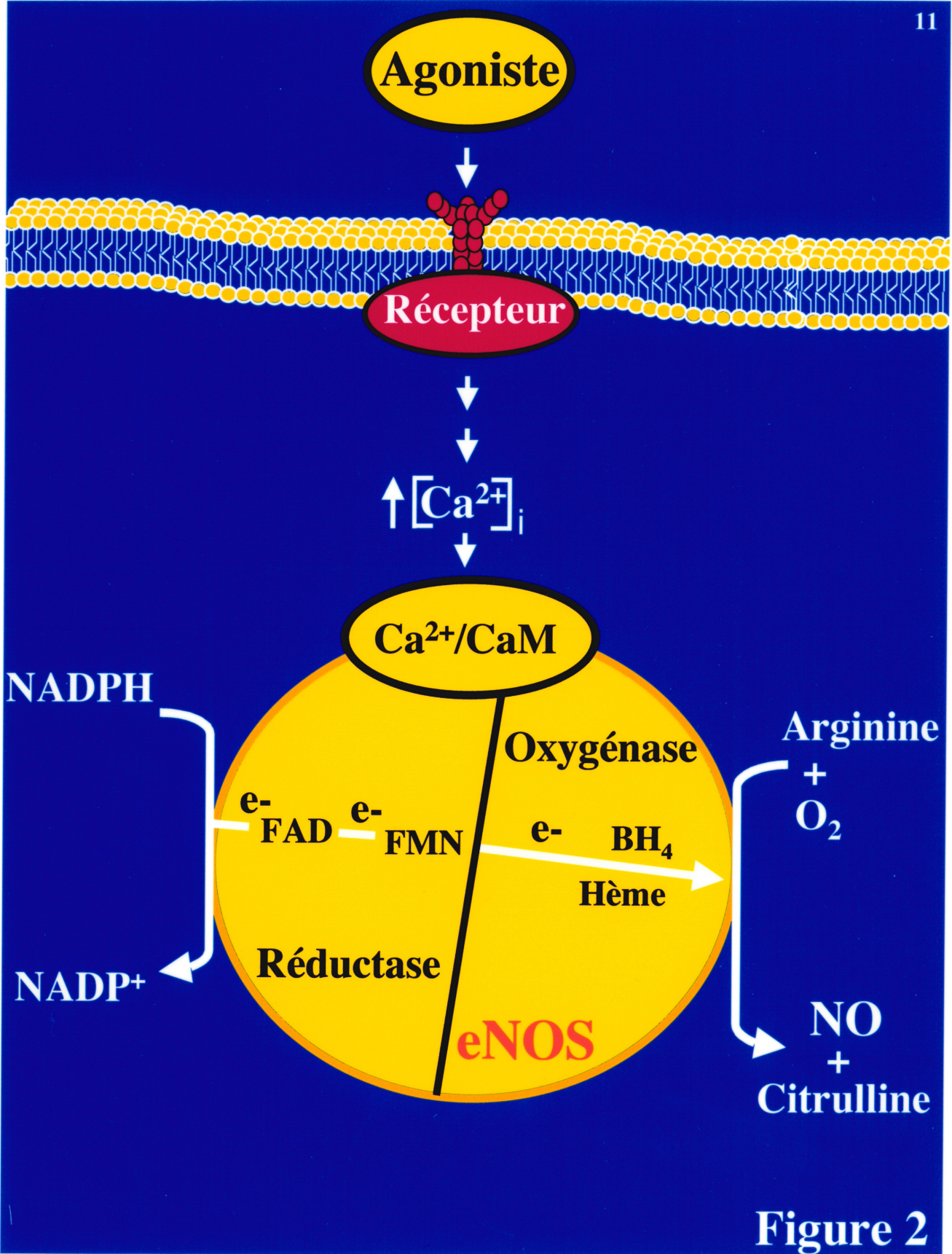


Figure 2

capacité de générer l'anion superoxyde ( $O_2^{\cdot -}$ ) tout dépendamment des conditions de synthèse. En effet, il a été démontré que lorsque les conditions permettent une concentration élevée du substrat L-Arginine et du cofacteur  $BH_4$ , la eNOS produit du NO. À l'inverse, si les conditions favorisent la baisse en concentration de l'une de ces deux molécules, alors la eNOS synthétisera le  $O_2^{\cdot -}$  (58, 59).

### 1.3.2. Mécanismes de synthèse du NO

Il est maintenant bien établi que la eNOS est localisée au niveau de la membrane cellulaire en condition quiescente. Cette position est imputable à l'interaction de la eNOS avec la protéine d'échafaudage cavéoline, ce qui a pour effet d'inhiber l'activité enzymatique de la eNOS dans les conditions basales. Par contre, suite à une stimulation des CE avec certains agonistes spécifiques, il y a une entrée de calcium extracellulaire et/ou une relâche de calcium intracellulaire qui mènent subséquemment à la formation du complexe  $Ca^{2+}/CaM$ . En se liant à la eNOS, le complexe  $Ca^{2+}/CaM$  brise la liaison inhibitrice de la cavéoline avec la eNOS et facilite l'association de la Hsp90 permettant ainsi à l'enzyme d'être sous sa forme active. La protéine Hsp90 est essentiel pour l'activation de la eNOS. En effet, Hsp90 possède une région M lui permettant de se lier à la eNOS et de faciliter l'interaction de Akt avec cette dernière (60, 116) (Fig. 3).

**Figure 3. Régulation de la eNOS au niveau membranaire.** À son état basal, la eNOS est localisée au niveau de la cavéole. Cette position est imputable à l'interaction de la eNOS avec la protéine d'échafaudage cavéoline, ce qui a pour effet d'inhiber l'activité enzymatique de la eNOS dans les conditions basales. Par contre, suite à une stimulation des CE avec certains agonistes spécifiques, il y a une entrée de calcium extracellulaire et/ou une relâche de calcium intracellulaire qui mènent subséquentement à la formation du complexe  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ . En se liant à la eNOS, le complexe  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  brise la liaison inhibitrice de la cavéoline avec la eNOS et facilite celle de la Hsp90 permettant ainsi à l'enzyme d'être sous sa forme active. La forme active de la eNOS facilite également sa phosphorylation par des protéines telles que Akt, PKA, AMPK et PKC.



ÉTAT BASAL

14

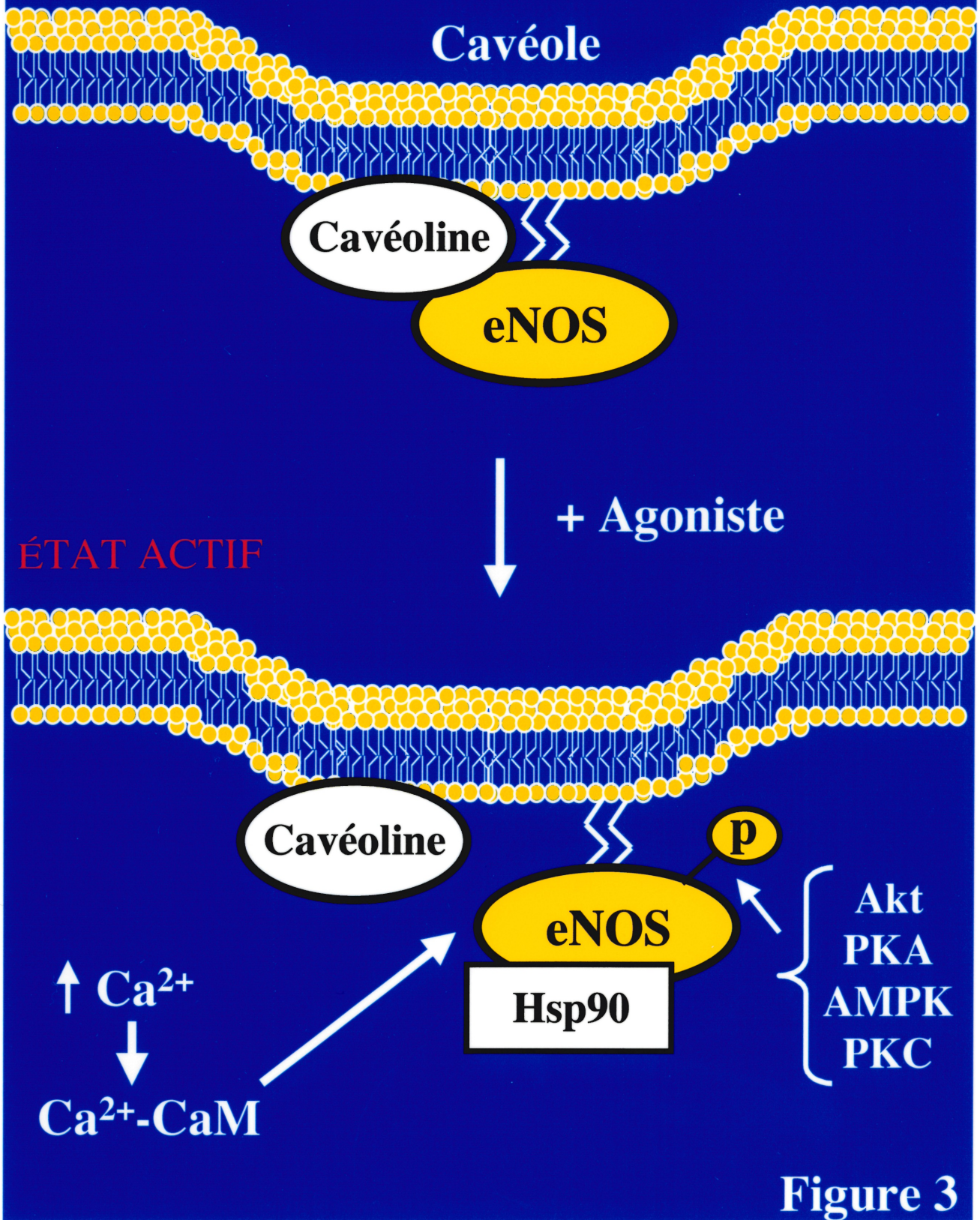


Figure 3

Durant les dernières années, un nombre impressionnant d'études ont tenté d'élucider la(les) voie(s) de signalisation menant à l'activation de la eNOS. Tel que mentionné précédemment, la première étape menant à la production du NO débute par l'activation de la PLC qui conduit, via la synthèse d'IP<sub>3</sub>, à la relâche de calcium intracellulaire, qui à son tour complexe avec la calmoduline et active la eNOS. Par la suite, différents groupes de recherche ont démontré que la eNOS pouvait être phosphorylée sur la Ser<sup>1177</sup> et/ou sur la thréonine 495 (Thr<sup>495</sup>) (61, 62). La phosphorylation de la eNOS sur la Thr<sup>495</sup> est constitutive et une stimulation par des agonistes tels que le VEGF ou la bradykinine a pour effet de déphosphoryler l'enzyme, ce qui stimule la synthèse du NO par eNOS. Toutefois, il semble que la déphosphorylation de la Thr<sup>495</sup> dépende du type cellulaire employé et n'est pas reproductible chez tous les groupes de recherche (61). À l'inverse, la phosphorylation sur la Ser<sup>1177</sup> active la eNOS. Il semblerait que cette phosphorylation entraîne une augmentation de la sensibilité de la eNOS pour la calmoduline (63-66). Par ailleurs, plusieurs médiateurs intracellulaires participant à la phosphorylation sur la Ser<sup>1177</sup> de la eNOS ont été identifiés dont la cAMP-dépendent kinase, la PKA, la PKC, la "Heat Shock Protein 90" (Hsp90) et l'Akt (67).

Néanmoins, il existe certaines controverses concernant la contribution de divers médiateurs intracellulaires activés par le VEGF sur la régulation de la eNOS, et plus particulièrement en ce qui a trait au rôle joué par la PKC et l'Akt. Par exemple, il a été démontré que le VEGF active la cascade PI3K/Akt, qui en retour induit la phosphorylation sur la Ser<sup>1177</sup> de la eNOS et la synthèse du NO (63, 64, 68, 69). En

revanche, des études récentes ont suggéré que l'inhibition de la PI3K n'avait peu ou pas d'effet sur la synthèse du NO (62, 70). Par ailleurs, la PKC est un autre médiateur intracellulaire dont la contribution est controversée. D'un côté, une étude a démontré que l'inhibition de la PKC prévenait la synthèse du NO induite par le VEGF, alors qu'une autre étude a établi que l'activation de la PKC inhibait la eNOS en phosphorylant la Thr<sup>495</sup> et en déphosphorylant la Ser<sup>1177</sup> (46, 61).

Finalement, une étude récente a suggéré que la régulation de la eNOS pouvait être effectuée par un système bimodal. Dans un premier temps, la relâche de calcium intracellulaire, observée suite à une stimulation par un agoniste, est suffisante pour activer la eNOS et synthétiser le NO, et ce, indépendamment de la phosphorylation de la eNOS. Par la suite, la phosphorylation sur la Ser<sup>1177</sup> de la eNOS engendrée par différents médiateurs intracellulaires tels que l'Akt et la Hsp90 induit une synthèse tardive du NO (71). Le mécanisme responsable de ce système n'est pas tout à fait clair. Toutefois, certaines évidences laissent supposer que la phosphorylation sur la Ser<sup>1177</sup> de la eNOS pourrait augmenter la sensibilité de l'enzyme pour le complexe Ca<sup>2+</sup>/CaM et/ou diminuer la dissociation de la calmoduline une fois que la concentration en calcium intracellulaire retourne à son niveau basal (63-66).

### 1.3.3. NO et VEGF

Au niveau du système cardiovasculaire, l'endothélium induit la synthèse du NO via l'activation de la eNOS créant ainsi une action régulatrice sur la pression et le flot sanguin de même que sur l'adhésion plaquettaire et les fonctions cardiaques. La fonction vasorelaxante du NO fut démontrée par des expériences *in vivo* où des animaux traités avec un inhibiteur de la synthèse du NO démontrèrent une augmentation immédiate de la pression sanguine (72) combinée à une vasoconstriction régionale (73). Par la suite, des études ont tenté d'élucider le mécanisme d'action du NO au niveau vasculaire. Or, il a été démontré qu'une stimulation de l'endothélium, suite à la liaison d'agonistes tels que le VEGF ou l'histamine, résulte en une augmentation de la production du NO. Ce dernier, par diffusion, agit comme agent relaxant sur les CMLs en se liant avec le groupe hème de la guanylate cyclase (74).

Dernièrement, un fait intéressant est venu grandement contribuer à déterminer le mécanisme d'action des molécules pro-angiogéniques puisque plusieurs études ont observé une corrélation entre la vasodilatation, l'augmentation de la perméabilité vasculaire et l'angiogenèse (75, 76). En effet, mis à part le NO, plusieurs vasodilatateurs incluant la prostacycline, la prostaglandine  $E_1$  et l'adénosine se sont avérés être des substances pro-angiogéniques (76-78). Ces médiateurs agissent possiblement via leur capacité à induire l'extravasation des protéines plasmiques en augmentant la perméabilité vasculaire, ce qui favorise la création d'une nouvelle matrice extracellulaire nécessaire à l'angiogenèse (16). Parallèlement, certaines études

*in vivo* et *in vitro* ont démontré que l'augmentation de la perméabilité vasculaire induite par le VEGF est régulée par la relâche du NO au niveau des cellules endothéliales (79-81).

Comme l'augmentation de la perméabilité vasculaire et l'induction de la vasorelaxation par le VEGF sont médiées par le NO (79-82), plusieurs études ont tenté d'évaluer la contribution de la synthèse du NO sur les propriétés angiogéniques du VEGF. Il s'est avéré que le NO joue un rôle aussi important pour les effets angiogéniques qu'inflammatoires du VEGF. Par exemple, une étude a démontré qu'un traitement avec L-NAME, un analogue compétitif de la L-Arginine, bloque en totalité l'induction de l'angiogenèse par le VEGF *in vivo* (83). Parallèlement, une étude a établi au moyen de matrigels tridimensionnels que l'inhibition de l'angiogenèse par L-NAME pouvait être restaurée par l'ajout d'un donneur exogène de NO (84). De plus, il a été établi que L-NAME de même qu'un autre inhibiteur de la synthèse de NO (L-NMMA) prévient l'augmentation de la perméabilité vasculaire et cellulaire induite par le VEGF (79, 81). Ces données démontrent que le NO constitue un médiateur essentiel au VEGF tant pour ses effets inflammatoires qu'angiogéniques. Il est aussi intéressant de noter que l'action mitogénique et anti-mitogénique du VEGF sur les CE et les CMLs respectivement, est partiellement imputable à sa capacité d'induire la synthèse de NO (85, 86).



## 1.4. INFLAMMATION ET PAF

### 1.4.1. Réaction inflammatoire

C'est Hunter (1728-1793) qui fournit les premières informations détaillées référant à l'inflammation en observant que la rougeur associée à l'inflammation était imputable à une augmentation du flot sanguin à travers les vaisseaux dilatés. Par la suite, Julius Cohnheim (1839-1884) démontra que l'inflammation est caractérisée par une altération locale de la microcirculation et nota également l'adhésion des cellules leucocytaires de même que leur migration à travers la paroi des vaisseaux sanguins. Ces observations furent d'une aide inestimable aux scientifiques qui ont établi que l'inflammation peut être divisée en deux stades : l'inflammation aiguë et chronique (87). L'inflammation aiguë ou hyperperméabilité vasculaire est une conséquence directe de l'effet des médiateurs inflammatoires sur la contraction des cellules endothéliales, ainsi que de la formation par ces dernières de brèches intercellulaires "gap junction", conduisant à l'extravasation des protéines plasmatiques. Ainsi, la zone affectée devient rouge, chaude, tuméfiée; le sérum sanguin s'échappe des vaisseaux dilatés, infiltre et distend les interstices tissulaires, constituant l'oedème. Par ailleurs, l'inflammation chronique implique le recrutement de cellules inflammatoires circulantes telles que les monocytes et les leucocytes. Le stimulus pro-inflammatoire active les CE qui subséquemment expriment à leur surface plusieurs types de molécules d'adhésion visant à faciliter le ralentissement et l'arrêt complet des cellules inflammatoires de la circulation au site inflammé. Les monocytes et leucocytes sont

ensuite appelés à migrer vers l'interstitium en direction du chémoattractant pour y exercer des actions phagocytaires et/ou protéasiques, ainsi que des réactions délétères pouvant grandement endommager les tissus atteints.

PAF, un médiateur de l'inflammation.

En 1970, Henson fit la découverte du facteur d'activation plaquettaire (PAF, 1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine) (88). Lors de ses travaux, Henson observa qu'un facteur inconnu relâché par des leucocytes de lapin était capable de provoquer l'activation de la fonction plaquettaire. De plus, le PAF est capable d'induire une variété d'activités biologiques telles que l'hypotension (89), la bronchoconstriction aiguë (90) et l'adhésion de leucocytes aux cellules endothéliales (91).

Néanmoins, de nos jours, le PAF est surtout reconnu pour sa capacité à engendrer l'inflammation. Cette propriété est imputable à l'augmentation de la perméabilité vasculaire induite par le PAF. En effet, le PAF se lie aux cellules endothéliales et active des changements au niveau du cytosquelette. Les changements morphologiques des cellules endothéliales se traduisent par une contraction de ces dernières et, subséquentement, par la formation de brèches intercellulaires permettant ainsi aux protéines plasmiques de transmigration vers l'interstitium (92-94).

Deux mécanismes bien distincts ont été décrits pour la synthèse de PAF. Le premier est appelé *de novo*, et répond aux besoins physiologiques de l'organisme; l'activité des enzymes qui le compose est principalement dictée par la disponibilité en substrat, et permet une synthèse de PAF basale et constitutive (95). La deuxième voie est appelée celle du remodelage et semble plutôt être influencée par différents stimuli pro-inflammatoires ou pro-allergiques. La synthèse est initialisée soit par une phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) ou une transacylase indépendante du Coenzyme A (CoA-IT) capable d'hydrolyser un phospholipide membranaire (généralement le 1-O-alkyl-2-arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) générant ainsi une molécule d'acide arachidonique et une molécule de lyso-PAF, le précurseur du PAF. Ce dernier est par la suite transformé en PAF par la lyso-PAF acétyltransférase (lyso-PAF-AT) (96, 97). De plus, de récentes études dans le laboratoire du Dr Sirois ont permis de préciser le mécanisme de la synthèse du PAF induite par le VEGF dans les CE. En effet, le VEGF, via sa liaison avec le récepteur Flk-1/KDR, induit l'activation de la p38 MAPK, de la p42/44 MAPK et la de sPLA<sub>2</sub> de type V toutes essentielles au VEGF pour induire la synthèse de PAF (98-100).

#### 1.4.2. Inflammation et angiogénèse

Plusieurs évidences laissent supposer que l'inflammation précède et/ou accompagne presque automatiquement l'angiogénèse dans des conditions tant physiologiques que pathophysiologiques. En effet, la majorité, sinon la totalité, des masses tumorales démontrent une perméabilité vasculaire accrue, avec la présence de

cellules inflammatoires telles que des monocytes/macrophages et neutrophiles (101). Bien que plusieurs autres facteurs de croissance soient capables d'induire la prolifération et/ou la migration des CE, tels le "basic ou acid fibroblast growth factor" et l' "epidermal growth factor" (29, 102), seul le VEGF est capable d'induire une augmentation de la perméabilité vasculaire. Par ailleurs, les études du Dr Sirois ont démontré que l'effet inflammatoire du VEGF est médié par la synthèse de PAF au niveau des cellules endothéliales (103). De plus, il a été démontré que cette synthèse de PAF joue un rôle prépondérant dans l'angiogenèse induite par le VEGF renforçant ainsi l'hypothèse de la relation entre l'inflammation et l'angiogenèse (104). Il est aussi intéressant de noter que le PAF en soi possède la capacité d'induire l'angiogenèse *in vivo* (105).

## 1.5. PROBLÉMATIQUE ET BUT DE NOTRE ÉTUDE

Les études récentes suggèrent divers mécanismes par lesquels le VEGF pourrait induire l'activation de la eNOS et plus particulièrement au niveau de la contribution apportée par deux médiateurs intracellulaires, en occurrence : Akt et PKC. Par conséquent, nous avons voulu investiguer la contribution de différentes voies de signalisation intracellulaire susceptibles de mener à la synthèse de NO suite à une stimulation de cellules endothéliales avec le VEGF. De plus, comme le VEGF induit la synthèse du NO et du PAF et que ces deux molécules semblent contribuer tant à l'effet inflammatoire qu'angiogénique du VEGF, nous avons voulu déterminer si l'induction de l'une de ces deux molécules pouvait contribuer à la synthèse de l'autre (Fig. 4).

## 1.6. APPROCHES MÉTHODOLOGIQUES

Les approches méthodologiques appliquées dans ce mémoire se retrouvent intégralement dans l'article qui suit.

**Figure 4. Mécanismes susceptibles de contribuer à l'activation de la eNOS.**

Plusieurs mécanismes ont été proposés au cours des dernières années pour médier la synthèse de NO suite à une stimulation des cellules endothéliales. Dans ces mécanismes, nous retrouvons l'implication des protéines suivantes : la PLC, la PKC et l'Akt. De plus, il a été démontré que le NO et le PAF contribuent tant pour les effets inflammatoires qu'angiogéniques du VEGF. Par conséquent, nous émettons l'hypothèse qu'une relation possible existe entre la synthèse du NO et du PAF induite par le VEGF.

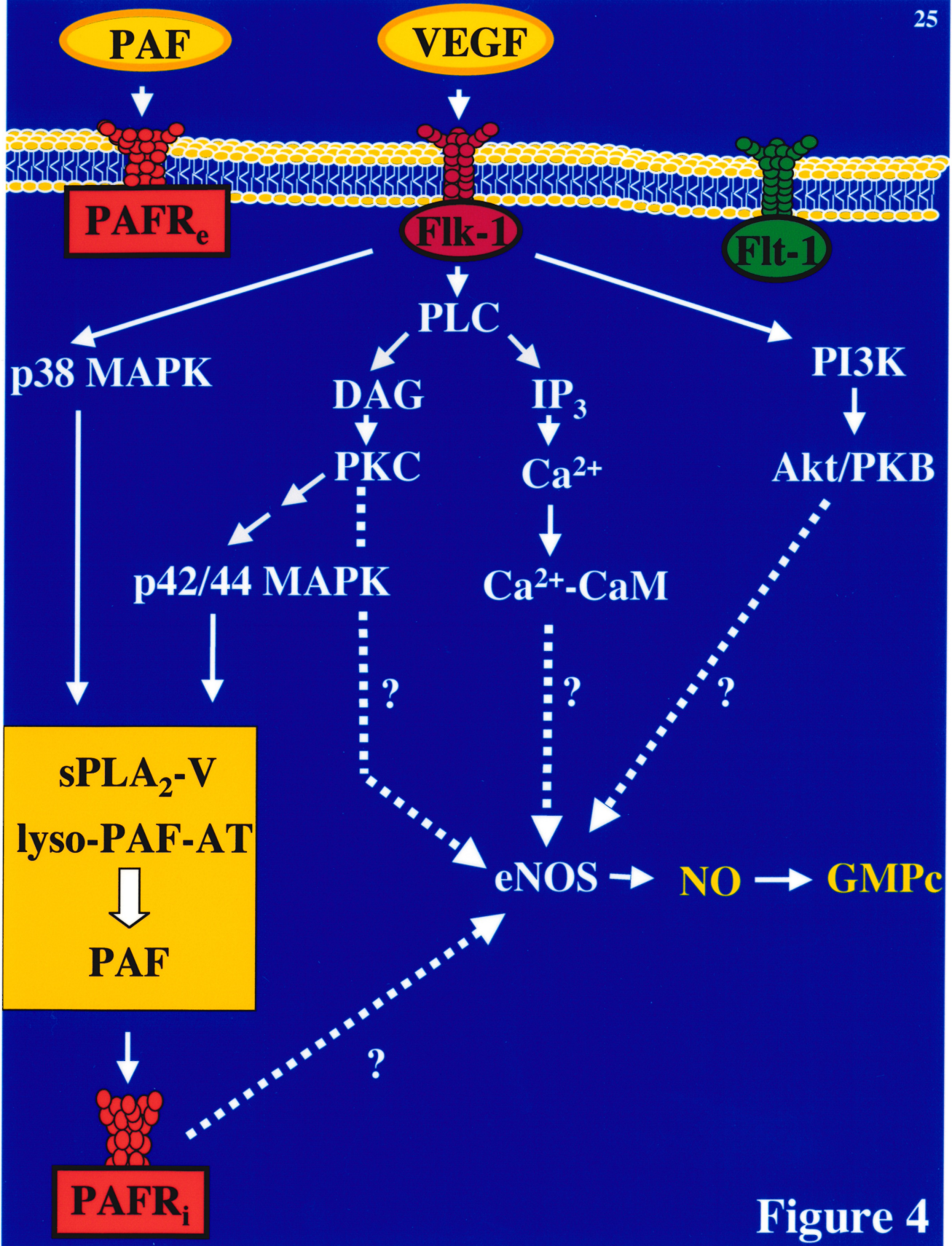


Figure 4

## **2.0. ARTICLE**



**(Accepted with corrections in the British Journal of Pharmacology)**

**IMMEDIATE AND DELAYED VEGF-MEDIATED NO  
SYNTHESIS IN ENDOTHELIAL CELLS :  
ROLE OF PI3K, PKC AND PLC PATHWAYS**

**David S. Gélinas<sup>1</sup>, Pascal N. Bernatchez<sup>1</sup>, Simon Rollin<sup>1</sup>,  
Nicolas G. Bazan<sup>2</sup> and Martin G. Sirois<sup>1\*</sup>.**

<sup>1</sup>Research Center, Montreal Heart Institute, and Department of Pharmacology,  
University of Montreal, Montreal (Qc), Canada.

<sup>2</sup>Neuroscience Center, LSU Health Sciences Center,  
New Orleans, Louisiana 70112, USA.

Running Title: Mechanisms by which VEGF induces NO synthesis

\*Correspondence should be addressed to:

Martin G. Sirois, Ph.D.

Montreal Heart Institute

5000 Belanger Street

Montreal (Qc), Canada, H1T 1C8

Phone: (514) 376-3330 (ext: 3583)

FAX: (514) 376-1355

E-mail: mgsirois@icm.umontreal.ca

## 2.1. ABSTRACT

Recently, controversies have arisen with regards to the mechanisms by which vascular endothelial growth factor (VEGF) induces endothelial nitric oxide synthase (eNOS) activation. Therefore, we sought to evaluate the contribution of numerous pathways in VEGF-induced nitric oxide (NO) synthesis by measuring cGMP production. In addition, as VEGF induces the synthesis of NO and platelet-activating factor (PAF), we wanted to assess if the induction of PAF and NO is contributing to the synthesis of each other. Herein, we show that a treatment with a PLC inhibitor (U73122), calmodulin antagonist (W-7) or with intracellular calcium chelators (EGTA/AM, BAPTA/AM) prevented VEGF-mediated eNOS Ser<sup>1177</sup>-phosphorylation and NO synthesis measured by cGMP production. However, pretreatment with two PI3K (Wortmannin, LY294002) or two PKC (GF109203X, Ro318220) inhibitors attenuated eNOS Ser<sup>1177</sup>-phosphorylation mediated by VEGF, but did not alter immediate (0-10 min) cGMP synthesis induced by VEGF. Nonetheless, these latter inhibitors blocked by up to 84% the delayed (10-30 min) cGMP synthesis. Pretreatment with PAF synthesis inhibitors or with PAF receptor antagonists did not abrogate neither eNOS Ser<sup>1177</sup>-phosphorylation nor cGMP synthesis mediated by VEGF. In conclusion, our data demonstrate that VEGF induces an immediate cGMP synthesis through the PLC-Ca<sup>2+</sup>/CaM pathway, and that the induction of delayed cGMP synthesis implies Akt and PKC activity.

Keywords: eNOS, endothelial cells, PAF, PKC, Akt

## 2.2. INTRODUCTION

It is now well established that angiogenesis, the formation of new blood vessels from preexisting ones, is an essential requirement for numerous physiological conditions, such as wound healing, tissular regeneration, and uterine wall thickening (1, 2). On the other hand, angiogenesis is also involved in numerous pathologies including tumor growth, atherosclerosis, and proliferative retinopathies (1, 3, 4). Induction of angiogenesis consists on a multistep process involving capillary endothelial cell (EC) migration and proliferation, inflammation and subsequently the formation of a three-dimensional structure capable of carrying blood (1).

Since vascular endothelial growth factor (VEGF) and other growth factors can promote EC migration and proliferation *in vitro* and angiogenesis *in vivo* (5), they are consequently considered as major candidates for the regulation of physiological and pathophysiological angiogenesis (6). However, VEGF is the only growth factor capable of promoting vascular permeability and inflammation (7). We first showed that VEGF effect on vascular permeability is mediated through the induction of platelet-activating factor (PAF) synthesis in EC (8). Then, we reported that upon Flk-1/KDR phosphorylation, VEGF leads to the activation of p38, p42/44 mitogen-activated protein kinases (MAPK), group V secreted phospholipase A<sub>2</sub> and lyso-PAF acetyltransferase which are all required for the induction of VEGF-mediated PAF synthesis in EC (9-11). Recently, it was also shown that PAF synthesis contributes to *in vivo* VEGF-angiogenic activity (12).

However, others reported that VEGF angiogenic and inflammatory activities can be mediated through nitric oxide (NO) synthesis (13-17). Numerous studies

focused on the intracellular mechanisms involved in NO synthesis. In EC, it is clearly established that endothelial nitric oxide synthase (eNOS) activation is required for NO release and that eNOS is a  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin ( $\text{Ca}^{2+}$ /CaM)-dependent enzyme activated by intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  release upon phospholipase C- $\gamma$  (PLC- $\gamma$ ) activation (18-21). However, the mechanisms involved in VEGF-mediated NO synthesis is less clear and even controversial. It has been shown that VEGF activates phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) leading to Akt phosphorylation which in turn phosphorylates eNOS, thereby increasing eNOS enzymatic activity (22-25). At the opposite, recent reports have suggested that blocking PI3K activation with specific inhibitors had no or minor effect on NO release (26, 27). In addition, it was recently demonstrated that NO production induced by VEGF results from a bimodal system in which immediate NO synthesis is observed from an eNOS calcium-dependent activation and that delayed NO production is dependent on eNOS phosphorylation induced by intracellular mediator such as heat shock protein 90 (Hsp90) and Akt (28). Another controversial intracellular mediator associated with eNOS regulation is protein kinase C (PKC). On one side, it has been demonstrated that PKC inhibition abrogates VEGF-induced NO release (29), whereas another study has demonstrated that PKC activation in EC inhibits eNOS activity (30).

Finally, as VEGF induces a rapid induction of NO and PAF synthesis in EC and that the intracellular mechanisms by which VEGF induces NO synthesis are still debatable, we first sought to assess the mechanisms involved in VEGF-mediated eNOS activation. Then, we investigated the contribution of PAF in VEGF-induced NO synthesis in endothelial cells.

## 2.3. METHODS

### *Cell Culture*

Bovine aortic endothelial cells (BAEC) were isolated from freshly harvested bovine aortas, cultured in Dulbecco's modified eagle medium (DMEM; Life Technologies, Burlington, ON, Canada) containing 5% fetal bovine serum (Hyclone Lab., Logan, UT), and antibiotics (Sigma Chem., St-Louis, MO). BAEC were characterized as described previously (8, 9). Cells were not passaged for more than 9 cycles.

### *Measurement of cGMP synthesis*

NO synthesis from BAEC was assessed by quantifying the intracellular accumulation of cGMP by using a radioimmunoassay (RIA) kit (New England Nuclear, NEN, Boston, MA) (NEN). Confluent BAEC (6-well tissue culture plate) were serum-starved in DMEM for 18 hrs. Cells were rinsed, and a DMEM / CaCl<sub>2</sub> (5 mM) solution added to the cells. Cells were pretreated with isobutylmethylxanthine (IBMX, 500 µM; 10 minutes), and with inhibitors or antagonists (up to 60 minutes) prior to stimulation with phosphate-buffered saline (PBS) or agonists. The media was removed and 500 µl of ethanol (65%) was added. The cells were scraped, proteins lyophilized and diluted in RIA buffer. A predetermined amount of the antigen ScGMP-TME-[<sup>125</sup>I] was added to the cGMP produced by BAEC. ScGMP-TME-[<sup>125</sup>I] and cGMP were incubated with the antiserum complex for 18 hrs. The samples were centrifuged and the supernatant discarded. The amount of ScGMP-TME-[<sup>125</sup>I] in the precipitate was measured with a γ-counter. Finally, the determination of cGMP was made by an interpolation from a standard curve.

*Western blot analyses of Akt (Serine 473) and eNOS (Serine 1177) phosphorylations and PAFR expression*

Confluent BAEC (100 mm tissue culture plate) were serum-starved for 18 hrs in DMEM and then stimulated with agonists for various periods of time as described for cGMP synthesis  $\pm$  inhibitors or antagonists. Cells were lysed (20 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1.2% Triton X-100, 1 mM EGTA, 1 mM PMSF, 0.15 U/ml aprotinin, 10  $\mu$ g/ml leupeptin, 1mM NaVO<sub>3</sub>, 1 mM Microcystin LR), the plates were scraped, the lysate clarified by centrifugation, and the protein concentration of the supernatant determined by using a protein assay kit (Bio-Rad, Hercules, CA). Proteins (100-150  $\mu$ g) were separated on a 7.5% (Akt, eNOS) or 10% (PAF receptor; PAFR) SDS-PAGE and transblotted onto an Immobilon-P PVDF membrane (Milipore, Bedford, MA). Membranes were then incubated overnight in blocking buffer containing either rabbit polyclonal anti-phospho-Akt (Ser<sup>473</sup>), anti-phospho-eNOS (Ser<sup>1177</sup>) (dilution 1:1000) or goat polyclonal anti-PAFR antibodies (dilution 1:300) (Cell Signaling Technology Inc. Beverly, MA) (Santa Cruz Biotechnologies, Inc, Santa Cruz, CA). Membranes were washed with TTBS and incubated either with anti-rabbit or anti-goat antibodies coupled to horseradish peroxidase (Santa Cruz Biotechnologies). Membranes were washed with TTBS and horseradish peroxidase was revealed by chemiluminescence. Kaleidoscope pre-stained molecular weight standards (Bio-Rad) were used as standards for SDS-PAGE.

### *Immunofluorescence analysis of PAFR expression*

BAEC were cultured on glass coverslips (18 mm) in 12-well culture plates. At 50% confluence, cells were fixed in 3% paraformaldehyde (pH 7.3) for 15 minutes at room temperature and washed with PBS or with PBS-Triton X-100 (0.5%) solution (cells permeabilization) for 10 minutes and incubated overnight with 10% normal donkey serum (NDS) at 4°C. The slides were rinsed with PBS, then incubated with goat polyclonal anti-PAFR antibodies (1:200 in 1% NDS) at room temperature for 1 hr. The cells were subsequently incubated with donkey anti-goat Alexa 488 antibodies (1:500 in 1% NDS) (Molecular Probes, Eugene, OR) at room temperature for 1 hr, then washed with PBS. Glass coverslips were mounted using a 1,4-diazabicyclo-2-2-2-octane (DABCO)/glycerol (1:1) solution. Finally, cells were observed on a Zeiss Axiovert 100 M microscope adapted with a LSM 510 confocal system. Images were captured with the LSM 510 software and analyzed with the Adobe Photoshop program.

### *Chemotaxis assays*

Cell migration was evaluated using a modified Boyden 48-well microchamber kit (NeuroProbe, Cabin John, MD) as previously described (9). Near confluent BAEC (100 mm tissue culture plate) were trypsinized with trypsin-EDTA, resuspended in DMEM / 1% FBS / antibiotics and 50 000 cells  $\pm$  antagonists were added in the higher chamber of the modified Boyden chamber apparatus, and the lower chamber was filled with DMEM / 1% FBS / antibiotics plus VEGF (1 nM). The two sections of the system were separated by a porous polycarbonate filter (5  $\mu$ m pores) pretreated with a gelatin solution (1.5 mg/ml), and assembled. Five hours (5 hrs) post-incubation at

37°C, the apparatus was disassembled, the non-migrated cells were scraped with a plastic policeman, the migrated cells were stained using Quick-Diff solutions and counted.

#### *Measurement of PAF synthesis*

Platelet-activating factor synthesis in BAEC was measured by the incorporation of  $^3\text{H}$ -acetate into lyso-PAF as described previously (8, 9). Briefly, confluent BAEC (6-well tissue culture plates) were stimulated for 15 min in 1 ml of DMEM-HEPES (10 mM, pH 7.4),  $\text{CaCl}_2$  (5 mM),  $^3\text{H}$ -acetate (25  $\mu\text{Ci}$ ) (NEN) plus VEGF (1 nM) (human VEGF- $\text{A}_{165}$ , PeproTech, Rocky Hill, NJ). In various experiments, inhibitors were added 15 minutes prior to VEGF (1 nM) treatment. The reaction was stopped by addition of acidified methanol (50 mM acetic acid), the cells were scraped, and lipids were extracted by the Bligh and Dyer method (31) and purified by high performance liquid chromatography (HPLC). Fractions corresponding to  $^3\text{H}$ -PAF were quantified by counting radioactivity with a  $\beta$ -counter. The separation and detection of  $^3\text{H}$ -PAF was confirmed by comparison with the HPLC elution pattern of a commercial  $^3\text{H}$ -PAF standard (NEN), and by the ability of PAF-containing fractions to induce platelet aggregation when compared to standard alkyl-PAF (8).



*Drugs*

L-NAME, U73122, U73343, GF109203X, Ro318220, W-7, A23187, EGTA/AM, BAPTA/AM, Wortmannin, LY294002, SB203580 and PD98059 were purchased from Calbiochem (La Jolla, CA). BN52021 and CV3988 were purchased from Biomol Research Laboratories, Inc (Plymouth Meeting, PA). SNP and IBMX were purchased from Sigma (St-Louis, MO). Alkyl-PAF was purchased from BACHEM (Torrance, CA). SB203347 was donated by Dr James D. Winkler (SmithKline Beecham Pharmaceuticals; King of Prussia, PA). LAU8080 was synthesized at LSU Health Sciences Center, New Orleans, LA.

*Statistical analysis*

Data are mean  $\pm$  s.e. mean. Statistical comparisons were made by analysis of variance followed by an unpaired Student's t-test followed by Bofferroni's multiple comparison test. Data were considered significantly different if values of  $P < 0.05$  were observed.

## 2.4. RESULTS

### *VEGF effect on cGMP synthesis*

The induction of NO synthesis in BAEC was quantified by measuring the intracellular cGMP accumulation using a radioimmunoassay kit. First, we determined the cGMP synthesis induced by VEGF (1 nM) at 0, 2.5, 5, 10, 15 and 20 minutes post-treatment. VEGF induced a time-dependent cGMP synthesis with a maximal production at 10 minutes (13.6-fold increase) as compared to PBS-treated group (Fig. 1A). Then, we investigated the effect of VEGF on cGMP synthesis at various concentrations (0.01-1 nM) during a 10-minute stimulation period. VEGF maximal effect was achieved at 0.1 nM with a 12.5-fold increase as compared to PBS-treated group (Fig. 1B).

### *Effect of eNOS and PLC pathway on VEGF-induced cGMP synthesis*

First, we sought to confirm that the dose- and time-dependent effect of VEGF on cGMP synthesis was NO-dependent. Stimulation with an exogenous donor of NO (SNP, 500  $\mu$ M) for 10 minutes induced a 14.5-fold increase in cGMP synthesis as compared to PBS-treated group (Fig. 2A). Treatment with VEGF (1 nM; 10 minutes) induced a 13.6-fold increase which was completely blocked by a pretreatment with a competitive L-Arginine analog (L-NAME, 100  $\mu$ M) (Fig. 2A). Then, we investigated the contribution of the PLC pathway since it has been shown to release inositol triphosphate (IP<sub>3</sub>) which triggers intracellular Ca<sup>2+</sup> release needed to activate eNOS (19-21). Pretreatment of EC with a PLC inhibitor (U73122, 10  $\mu$ M) blocked completely the VEGF-mediated cGMP synthesis, whereas its inactive analog (U73343, 10  $\mu$ M) had no effect (Fig. 2A). In addition, as the activation of PLC induces as well

the release of diacylglycerol (DAG) which activates PKC, we used two structurally unrelated PKC inhibitors (GF109203X, 5  $\mu\text{M}$  and Ro318220, 1  $\mu\text{M}$ ) which did not prevent VEGF-induced cGMP synthesis. We also investigated the role of CaM as it is well established that the  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM complex is required to activate eNOS (18). Treatment with a CaM antagonist (W-7, 250  $\mu\text{M}$ ) abolished the effect of VEGF on cGMP synthesis (Fig. 2A).

#### *Effect of $\text{Ca}^{2+}$ chelators on VEGF-induced cGMP synthesis*

As detailed above, the induction of cGMP synthesis mediated by VEGF requires the activation of PLC pathway and CaM contribution. Since PLC activation leads to intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  release which complexes with CaM to activate eNOS (18), we wanted to assess the role of intracellular and extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  on cGMP synthesis. A 10-minute stimulation with the  $\text{Ca}^{2+}$  ionophore A23187 (10  $\mu\text{M}$ ) in presence of extracellular  $\text{CaCl}_2$  (5 mM) induced a 9.2-fold increase in cGMP synthesis (Fig. 2B). Then, we investigated the synthesis of cGMP in absence of extracellular  $\text{Ca}^{2+}$ . The basal cGMP synthesis in an extracellular  $\text{CaCl}_2$ -free DMEM solution was not different from the basal cGMP synthesis observed in the presence of  $\text{CaCl}_2$  (5 mM). However, stimulation with VEGF (1 nM) in a DMEM  $\text{CaCl}_2$ -free solution induced only a 2.5-fold increase in cGMP synthesis as compared to PBS-treated group. Under the same condition (extracellular  $\text{CaCl}_2$ -free solution), the addition of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  chelators such as EGTA/AM (100  $\mu\text{M}$ ) or BAPTA/AM (10  $\mu\text{M}$ ) abolished completely the residual cGMP synthesis mediated by a 10-minute treatment with VEGF (Fig. 2B).

*Effect of PI3K inhibitors on VEGF-induced cGMP synthesis*

Recently, the contribution of PI3K on eNOS activation has been thoroughly investigated. PI3K leads to the activation of Akt/PKB which phosphorylates eNOS at Ser<sup>1177</sup>, thereby increasing NO synthesis (22-25). In contrast, recent studies have suggested a minor role for Akt/PKB in these events (26) and even suggested that eNOS activation is PI3K-independent (27). In our study, we used two structurally unrelated PI3K inhibitors (Wortmannin, 500 nM or LY294002, 50  $\mu$ M) and observed that both inhibitors did not prevent cGMP synthesis induced by VEGF (1 nM) for a 10-minute stimulation (Fig. 2C).

*Effect of PAF on VEGF-induced cGMP synthesis*

As VEGF induces PAF synthesis and that BAEC express PAF receptor (PAFR) (8), we sought to determine the contribution of synthesized PAF on NO synthesis. A selective inhibition of three intracellular proteins directly involved in VEGF-mediated PAF synthesis, namely p38 MAPK (SB203580, 10  $\mu$ M), p42/44MAPK (PD98059, 10  $\mu$ M) or group V sPLA<sub>2</sub> (SB203347, 10  $\mu$ M) (10, 11), did not prevent cGMP synthesis mediated by VEGF. Moreover, pretreatment with three different PAFR antagonists: extracellular PAFR antagonist (BN52021, 10  $\mu$ M), intracellular PAFR antagonist (LAU8080, 100 nM) or extra- and intracellular PAF receptor antagonist (CV3988, 1  $\mu$ M) (32, 33) had no inhibitory effect on cGMP synthesis mediated by VEGF (1 nM). Finally, BAEC were stimulated with exogenous PAF (100 nM and 1  $\mu$ M) which did not increase basal cGMP synthesis (Fig. 2D).

*Effect of VEGF, intracellular inhibitors, and calcium chelators on eNOS phosphorylation at Serine 1177*

Several reports have shown an increase in eNOS phosphorylation upon agonists or shear stress stimulation (34-36). Herein, we demonstrated that VEGF (1 nM) induces a time-dependent increase of eNOS phosphorylation at Ser<sup>1177</sup> in BAEC with a maximal phosphorylation within 10 minutes (Fig. 3A).

Treatment with VEGF (1 nM) for 10 minutes induced a 5.6-fold increase in eNOS phosphorylation as compared to PBS-treated group. Pretreatment with L-NAME (100  $\mu$ M) did not prevent VEGF-induced eNOS phosphorylation. Pretreatment with U73122 (10  $\mu$ M) completely blocked not only VEGF-mediated eNOS phosphorylation but attenuated as well the basal phosphorylation level. The inactive analog U73343 (10  $\mu$ M) had only a marginal (10%) inhibitory effect on eNOS phosphorylation induced by VEGF. Pretreatment with GF109203X (5  $\mu$ M) or Ro318220 (1  $\mu$ M) attenuated VEGF-induced eNOS phosphorylation by 66% and 67% respectively. Finally, W-7 (250  $\mu$ M) abolished both, the VEGF-induced and basal eNOS phosphorylation (Fig. 3B).

In the previous figures, we showed that intracellular Ca<sup>2+</sup> release was essential to cGMP synthesis. Herein, we observed that a 10-minute stimulation with the Ca<sup>2+</sup> ionophore A23187 (10  $\mu$ M) induced a 4.9-fold increase in eNOS phosphorylation which was nearly equivalent to the phosphorylation mediated by VEGF (1 nM) in a DMEM / 5 mM CaCl<sub>2</sub> solution (Fig. 3C). In a DMEM CaCl<sub>2</sub>-free solution, we

observed that there was no or marginal eNOS phosphorylation in PBS-treated group, and that the absence of  $\text{Ca}^{2+}$  greatly attenuated (79%) VEGF capacity to promote eNOS phosphorylation as compared to the experiments performed in presence of 5 mM  $\text{CaCl}_2$ . Pretreatment with EGTA/AM (100  $\mu\text{M}$ ) or BAPTA/AM (10  $\mu\text{M}$ ) completely abrogated the residual VEGF-induced eNOS phosphorylation (Fig. 3C).

There are several reports showing that the phosphorylation of eNOS at Ser<sup>1177</sup> is mediated by Akt which is initially activated by PI3K (23-25). Herein, we demonstrated that a 10-minute pretreatment with Wortmannin (500 nM) or LY294002 (50  $\mu\text{M}$ ) completely blocked VEGF-induced eNOS phosphorylation (Fig. 3D).

*Effect of endogenous inhibitors of PAF synthesis and PAFR antagonists on VEGF-induced eNOS phosphorylation at Serine 1177*

We used three structurally unrelated PAF synthesis inhibitors, SB203580 (10  $\mu\text{M}$ ), PD98059 (10  $\mu\text{M}$ ) or SB203347 (10  $\mu\text{M}$ ), which blocked respectively the activation of p38 MAPK, p42/44 MAPK and group V sPLA<sub>2</sub> (10, 11). The inhibition of these proteins did not alter eNOS phosphorylation mediated by VEGF (Fig. 3E). Pretreatment with PAFR antagonists BN52021 (10  $\mu\text{M}$ ), LAU8080 (100 nM) or CV3988 (1  $\mu\text{M}$ ) did not prevent VEGF-induced eNOS phosphorylation. Finally, stimulation of BAEC with exogenous PAF (up to 1  $\mu\text{M}$ ) for 10 minutes did not increase basal eNOS phosphorylation (Fig. 3E).

*Effect of VEGF, intracellular inhibitors, and calcium chelators on Akt phosphorylation*

We observed that the stimulation of BAEC with VEGF (1 nM) elicited a time-dependent increase in Akt phosphorylation with a peak activity observed within 5 minutes and which was maintained for an additional 5 minutes (Fig. 4A).

In the present series of experiments, we measured Akt phosphorylation upon a 10-minute stimulation since we investigated the regulation of Akt at the time we observed maximal NO production. Treatment with VEGF (1 nM) elicited a 1.7-fold increase in Akt phosphorylation as compared to PBS-treated cells. Pretreatment with L-NAME (100  $\mu$ M) had no inhibitory effect on VEGF-induced Akt phosphorylation. The use of U73122 (10  $\mu$ M) blocked both basal and VEGF-mediated Akt phosphorylation, whereas a pretreatment with U73343 (10  $\mu$ M) had a marginal effect on Akt phosphorylation induced by VEGF. Treatment with GF109203X (5  $\mu$ M) or Ro318220 (1  $\mu$ M) potentiated VEGF-induced Akt phosphorylation by 92% and 70% respectively. Finally, a pretreatment with W-7 (250  $\mu$ M) completely blocked VEGF-mediated Akt phosphorylation (Fig. 4B).

Next, we wanted to assess whether Akt phosphorylation is  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent. A 10-minute stimulation with A23187 (10  $\mu$ M) induced a 1.5-fold increase in Akt phosphorylation which was nearly equivalent to that induced by VEGF (1 nM) (1.7-fold) as compared to PBS-treated cells. In a  $\text{Ca}^{2+}$ -free solution, the basal Akt phosphorylation in PBS-treated cells was slightly reduced as compared to that observed in a 5 mM  $\text{CaCl}_2$  solution. In a  $\text{Ca}^{2+}$ -free media, VEGF (1 nM) elicited a 1.9-

fold increase in Akt phosphorylation as compared to PBS-treated cells, which was abolished by a pretreatment with EGTA/AM, (100  $\mu$ M) or BAPTA/AM (10  $\mu$ M) (Fig. 5C). Pretreatment with Wortmannin (500 nM) or LY294002 (50  $\mu$ M) completely blocked VEGF-induced Akt phosphorylation (Fig. 4D).

*Effect of endogenous PAF synthesis inhibitors and PAFR antagonists on VEGF-induced Akt phosphorylation*

The use of selective inhibitors capable of preventing VEGF-mediated PAF synthesis (SB203580, 10  $\mu$ M; PD98059, 10  $\mu$ M or SB203347, 10  $\mu$ M) did not significantly attenuate Akt phosphorylation mediated by VEGF. In addition, the use of three selective structurally unrelated PAFR antagonists (BN52021, 10  $\mu$ M; LAU8080, 100 nM; CV3988, 1  $\mu$ M) did not inhibit VEGF-induced Akt phosphorylation. Finally, stimulation with exogenous PAF (up to 1  $\mu$ M) did not increase basal Akt phosphorylation (Fig. 5E).

*Effect of PI3K and PKC inhibitors on VEGF-induced delayed cGMP production*

In the previous results, we showed that both PI3K and PKC inhibitors abrogated completely or partially eNOS phosphorylation but had no effect on cGMP production induced by VEGF for a 10-minute stimulation. Interestingly, a recent study has demonstrated that immediate NO production was induced by intracellular calcium release in response to VEGF stimulation whereas delayed NO production was due to eNOS phosphorylation mediated by the activation of intracellular mediators such as PI3K and Hsp90 (28). In order to measure delayed cGMP synthesis, we first sought to



determine the minimal pretreatment time period required with IBMX to prevent cGMP degradation. Pretreatment with IBMX (500  $\mu\text{M}$ ) at 0, 2.5, 5 and 10 minutes prior to VEGF (1 nM) stimulation elicited a time-dependent increase in cGMP synthesis with a maximal production for a 5-minute pretreatment with IBMX (Fig. 5). Then, we assessed the effect of PI3K and PKC inhibitors on VEGF-induced immediate (0-10 min) and delayed (10-30 min) cGMP production. Pretreatment with two independent PI3K inhibitors (Wortmannin, 500 nM or LY294002, 50  $\mu\text{M}$ ) or two independent PKC inhibitors (GF109203X, 5  $\mu\text{M}$  or Ro318220, 1  $\mu\text{M}$ ) did not attenuate immediate VEGF-mediated cGMP synthesis (0-10 min) (Fig. 6; also shown in Fig. 2). To evaluate the delayed cGMP synthesis, IBMX was added 5 minutes after VEGF stimulation and the experiment was stopped at 30 minutes. In the same condition (IBMX was added 5 minutes after VEGF stimulation), we quantified the cGMP synthesis from 5 to 10 minutes (data not shown) and subtracted this value from the total delayed cGMP synthesis. Therefore, in Figure 6 we present the delayed cGMP synthesis observed between 10 and 30 minutes upon VEGF stimulation. We observed that PI3K inhibitors (Wortmannin, 500 nM or LY294002, 50  $\mu\text{M}$ ) and PKC inhibitors (GF109203X, 5  $\mu\text{M}$  or Ro318220, 1  $\mu\text{M}$ ) attenuated VEGF-induced delayed cGMP synthesis by 52%, 62%, 80% and 84% respectively (Fig. 6).

#### *PAF receptor expression in endothelial cells*

To confirm the expression of PAF receptors in BAEC, we performed a Western blot analysis and detected a 39 kDa band which corresponds to PAFR molecular weight (38) (Fig. 7). In addition, we performed an immunofluorescence analysis of PAFR.

By confocal microscopy, we detected in non-permeabilized BAEC the expression of PAFR at the cell membrane surface (Fig. 8A). Permeabilization of the cells allowed the labeling of intra- and extracellular PAFR, which resulted in a greater immunofluorescence (Fig. 8C). The specificity of PAFR expression in BAEC was confirmed by replacing the goat polyclonal anti-PAF receptor antibodies by normal non-specific goat IgG antibodies, which led to no or marginal immunofluorescence in non-permeabilized and permeabilized endothelial cells (Fig. 8B and D).

#### *Role of PAF synthesis in VEGF chemotactic effect*

We previously demonstrated that VEGF elicited a dose-dependent increase of EC migration (9). In addition, it has been shown that PAF itself has a chemotactic activity on EC (38). Consequently, in order to confirm the contribution of PAF in VEGF-mediated biological activities on cultured endothelial cells, we looked at the efficiency of PAFR antagonists to block VEGF-chemotactic activity. Independent pretreatment with the structurally unrelated PAFR antagonists (BN52021, 10  $\mu$ M; LAU8080, 100 nM or CV3988, 1  $\mu$ M) did not alter the basal EC migration. Pretreatment with the extracellular PAFR antagonist BN52021 or with the intracellular PAFR antagonist LAU8080 reduced slightly (35% and 30% respectively) but not significantly the VEGF-induced EC migration. However, the use of the intra- and extracellular PAFR antagonist CV3988 reduced by 80% the EC migration induced by VEGF as compared to its own PBS-control group (Fig. 9).

*Effect of VEGF-induced NO synthesis on PAF synthesis*

In a previous report, we demonstrated that VEGF elicited a time- and dose-dependent increase in PAF synthesis which was maximal within 15 minutes post-treatment (8). We also investigated and established the role of VEGF-induced p42/44 MAPK, p38 MAPK and PI3K pathways in PAF synthesis (10, 11). As VEGF induces NO and PAF synthesis in EC, we wanted to assess if VEGF-mediated PAF synthesis was regulated by the induction of NO synthesis. Pretreatment with L-NAME (100  $\mu$ M), or a 15-minute stimulation with SNP (500  $\mu$ M), in absence of VEGF, did not alter the basal level of PAF synthesis. Treatment with VEGF (1 nM) for 15 minutes induced a 6.2-fold increase of PAF synthesis as compared to PBS-treated cells. A pretreatment with L-NAME (100  $\mu$ M) did not prevent VEGF-induced PAF synthesis. Finally, a combined treatment of BAEC with VEGF (1 nM) plus SNP (500  $\mu$ M) did not alter VEGF-mediated PAF synthesis (Fig. 10).

## 2.5. DISCUSSION

Over the past few years, there have been several studies investigating the mechanisms by which agonists such as insulin, bradykinin and VEGF, are mediating eNOS activation. However, these reports did not highlight an exclusive pathway shared by various agonists leading to eNOS activation. In addition, there are even some discrepancies regarding the mechanisms involved in eNOS activation and NO production mediated by VEGF, peculiarly for those involving the contribution of Akt and/or PKC as intracellular mediators. Furthermore, a recent study has demonstrated that immediate NO production was induced by intracellular calcium release in response to VEGF, and that delayed NO production was mediated by eNOS phosphorylation which results from the activation of intracellular mediators such as PI3K and Hsp90 (28). Herein, we investigated the contribution of Akt, PKC, PLC and calcium on eNOS activation by assessing its phosphorylation at Ser<sup>1177</sup>, and by measuring immediate and delayed cGMP synthesis. In addition, as VEGF induces the synthesis of NO and PAF in endothelial cells and that it has been proposed that both mediators might play key roles in the inflammatory and angiogenic activities mediated by VEGF (13-17), we then wanted to assess if the synthesis of PAF and NO was affecting the synthesis of each other.

In the current study, we measured NO synthesis by quantifying cGMP accumulation as previously detailed (39). First, we confirmed that cGMP production was NO-dependent by treating endothelial cells with a NO exogenous donor (SNP) which induced cGMP production and by the blockade of cGMP production with L-NAME

(Fig. 2A). Treatment with L-NAME did not attenuate VEGF-induced eNOS Ser<sup>1177</sup>-phosphorylation as L-NAME is a L-Arginine competitive analog and therefore interfering downstream to eNOS phosphorylation (Fig. 3B).

#### *Ca<sup>2+</sup>/CaM and eNOS activation*

It is well known that eNOS can be regulated through intracellular calcium release induced by various agonists such as bradykinin, estradiol, serotonin, VEGF and histamine (40). The mechanism by which VEGF releases intracellular calcium in EC is consequent to PLC activation. On one hand, PLC has the ability to induce DAG synthesis and IP<sub>3</sub> which in turn promotes the release of intracellular calcium from the endoplasmic reticulum (19). Herein, we showed that the inhibition of PLC with U73122 abolished Akt phosphorylation, eNOS Ser<sup>1177</sup>-phosphorylation and cGMP synthesis mediated by VEGF. Therefore, this confirms the crucial role played by PLC on eNOS activation. The contribution of intracellular calcium elevation on eNOS Ser<sup>1177</sup>-phosphorylation and immediate NO/cGMP synthesis was furthermore supported by the fact that a treatment with the calcium ionophore A23187 was nearly as potent as VEGF to mediate eNOS activation and cGMP synthesis (Fig. 2B and 3C). Moreover in a calcium-free media, we showed that VEGF had the ability to increase both eNOS Ser<sup>1177</sup>-phosphorylation and cGMP synthesis but at a much lower extent to that observed in a 5 mM CaCl<sub>2</sub>-DMEM solution. These data illustrate that intracellular calcium release upon PLC activation is sufficient to mediate eNOS activation and cGMP production, and that these effects are potentiated by an extracellular calcium entry into endothelial cells (Fig. 2B and 3C).

*Immediate cGMP synthesis is Akt-independent*

In our study, we observed that the blockade of PLC activation,  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM complex formation, and that the use of intracellular calcium chelators abrogated Akt phosphorylation mediated by VEGF. In addition, a treatment with a calcium ionophore induced Akt activation. These data suggest that Akt phosphorylation is  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM complex-dependent. As previously reported (22), we observed that Akt phosphorylation is also mediated by PI3K activation since VEGF-mediated Akt phosphorylation was abrogated by pretreatment either with Wortmannin or LY294002. Therefore, our data imply that Akt phosphorylation requires intracellular calcium elevation, consequent  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM complex formation, and PI3K activation, since the blockade of one or the other inhibits Akt activation. Our hypothesis is supported by recent studies in which it was shown that Akt phosphorylation can be induced through the activation of  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM-dependent protein kinase kinase (CaM-KK), and that a treatment with a CaM antagonist prevented insulin-induced Akt phosphorylation (41-43).

More interestingly, we observed that the blockade of  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM-dependent Akt phosphorylation abrogated immediate cGMP production, whereas the blockade of PI3K-dependent Akt phosphorylation did not prevent immediate cGMP production. In the previous section, we defined that  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM complex formation was also essential for eNOS activation and cGMP production. Consequently, our data suggest that immediate NO/cGMP synthesis requires eNOS- $\text{Ca}^{2+}$ /CaM complex interaction as defined previously (18), and that Akt activation is not necessary for the initial induction of NO/cGMP production.

*Delayed cGMP synthesis is PKC- and Akt-dependent*

Aside the synthesis of IP<sub>3</sub> and intracellular calcium release, PLC promotes as well PKC activation through DAG synthesis. PKC is a calcium-dependent enzyme whose role in eNOS activation has been thoroughly assessed. However, its contribution remains controversial. Indeed, a previous study showed that treatment with a PKC inhibitor completely blocked cGMP synthesis induced by VEGF (29), whereas others (30) showed that PKC phosphorylates eNOS at Thr<sup>495</sup> and dephosphorylates eNOS at Ser<sup>1177</sup> thereby showing an inhibitory action of PKC on eNOS activation. In our study, we found that despite the fact that two unrelated PKC inhibitors (GF109203X or Ro318220) attenuated eNOS Ser<sup>1177</sup>-phosphorylation by 66% and 67% respectively they had no inhibitory effect on immediate cGMP synthesis (Fig. 2B). Interestingly, a recent study has demonstrated that immediate NO production can be induced exclusively by calcium release upon stimulation with VEGF and that eNOS phosphorylation mediated by VEGF leads to a delayed positive effect on NO synthesis (28). The exact mechanism responsible for an increase of eNOS enzymatic activity is unclear, although the late phosphorylation at Ser<sup>1177</sup> is thought to potentiate eNOS sensitivity for Ca<sup>2+</sup>/CaM complex (23, 24, 44, 45). Therefore, we quantified the delayed cGMP synthesis (10-30 min) upon VEGF stimulation and we found that the use of two PKC inhibitors (GF109203X or Ro318220) almost completely blocked VEGF-induced delayed cGMP synthesis (80% and 84% respectively). This latter result confirms a positive role played by PKC on eNOS regulation which is in agreement with two recent studies (26, 29).

It has previously been shown with specific PI3K inhibitors that blockade of Akt activation reduces partially the VEGF-mediated cGMP production (22). Then, it has been demonstrated that activated Akt possesses the ability to phosphorylate eNOS at Ser<sup>1177</sup>, thereby increasing eNOS enzymatic activity (23-25). However, two recent reports have suggested that the inhibition of PI3K with specific inhibitors had no or slight inhibitory effect on NO release (26, 27). In our study, we found that despite the fact that two independent unrelated PI3K inhibitors (Wortmannin or LY294002) completely blocked eNOS Ser<sup>1177</sup>-phosphorylation induced by VEGF, they had no effect on VEGF-induced immediate NO synthesis (Fig. 2D). However, pretreatment with these two inhibitors attenuated by 52% and 62% respectively the delayed cGMP synthesis induced by VEGF (Fig. 6). This latter result is in agreement with a recent study (28) which demonstrated the positive effect of Akt on delayed NO production induced by VEGF. It is suggested that delayed Akt effect on eNOS is attributable to eNOS phosphorylation at Ser<sup>1177</sup> which reduces CaM dissociation from the activated eNOS when intracellular calcium returns to its basal level (23, 24, 45).

Interestingly, the inhibition of the delayed cGMP synthesis mediated by the two PKC inhibitors was greater than that observed with the two PI3K inhibitors, even though eNOS Ser<sup>1177</sup>-phosphorylation blockade was more efficient with the PI3K inhibitors. This is in agreement with a recent study that demonstrated that Ro318220 had a greater inhibitory effect than Wortmannin on VEGF-induced NO synthesis (26). Moreover, a recent study has suggested that temporal sequence of events leading to eNOS activation by VEGF implies KDR-PLC-Ca<sup>2+</sup>-PKC respectively (21). According to this



study, we hypothesize that PKC action on eNOS may occur first and then facilitate Akt action on eNOS. This might explain the greater cGMP synthesis inhibition observed with the PKC inhibitors even though eNOS phosphorylation blockade was more important with PI3K inhibitors.

*Absence of crosstalks between PAF and NO synthesis mediated by VEGF*

Next, we sought to determine the role of PAF on NO synthesis since we observed that VEGF induces the synthesis of both mediators, and that both participate to VEGF angiogenic and inflammatory effects (13-17). Pretreatment with inhibitors of p42/44 MAPK, p38 MAPK or group V sPLA<sub>2</sub> (SB203580, PD98059 or SB203347) which are known to block VEGF-mediated PAF synthesis in BAEC (9, 10) or with PAFR antagonists (BN52021, LAU8080 or CV3988) did not affect Akt phosphorylation, eNOS Ser<sup>1177</sup>-phosphorylation and cGMP synthesis induced by VEGF. In addition, stimulation with exogenous PAF did not affect Akt phosphorylation, eNOS Ser<sup>1177</sup>-phosphorylation and cGMP synthesis as well. Therefore, our data suggest that PAF synthesis does not contribute to VEGF-induced NO synthesis in endothelial cells. In counterpart, we also wanted to investigate whether NO synthesis could be involved in PAF synthesis mediated by VEGF. We demonstrated that the use of L-NAME did not abrogate VEGF-induced PAF synthesis and that an exogenous NO donor (SNP) did not increase basal PAF synthesis neither potentiated VEGF-mediated PAF synthesis. Therefore, our data suggest that VEGF-induced NO and PAF synthesis are mediated by independent pathways and that both mediators do not contribute to the intracellular synthesis of each other (Fig. 11).

In a previous study, we showed that a pretreatment with the PAFR antagonist (BN52021) completely blocked the VEGF-mediated inflammatory effect in rats (8). However, in our study, despite the fact that we confirmed the expression of PAFR in BAEC by Western blot analysis and confocal microscopy, we observed that three structurally unrelated PAFR antagonists did not affect Akt phosphorylation, eNOS Ser<sup>1177</sup>-phosphorylation and cGMP synthesis induced by VEGF. To insure the chemical efficiency of these three PAFR antagonists (BN52021, LAU8080 or CV3988) and to demonstrate that PAF contributes to selective VEGF-mediated effects on cultured endothelial cells, we performed a chemotactic assay, since it has been shown that PAF synthesis has a chemotactic activity on EC (38). In our study, we observed that a pretreatment with the intracellular or extracellular PAFR antagonists (BN52021 or LAU8080) slightly reduced VEGF-induced EC migration. However, the intra- and extracellular PAFR antagonist (CV3988) attenuated by 80% the VEGF-mediated EC migration. This confirms the activity of both intra- and extracellular PAFR and that the activation of PAFR by endogenous PAF may contribute to VEGF-mediated biological activities (8, 38).

In conclusion, VEGF induces an immediate NO/cGMP synthesis which is independent from Akt activation but rather driven through PLC activation which is leading to Ca<sup>2+</sup>/CaM complex formation and eNOS activation. However, VEGF induces as well a delayed NO/cGMP synthesis which implies the activation of PKC and Akt. In addition, we showed that NO and PAF synthesis mediated by VEGF involves two independent intracellular pathways.

## 2.6. ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research (MOP-43919) and from the Heart and Stroke Foundation of Québec to Dr. Sirois. Mr. Bernatchez is recipient of a studentship from the CIHR and Dr. Sirois was recipient of a scholarship from the Heart and Stroke Foundation of Canada, and is currently recipient of a scholarship from the Canadian Institutes of Health Research.

## 2.7. REFERENCES

1. Folkman F. J., and Klagsbrun, M. (1987). *Science*. **235**, 442-447.
2. Folkman, J. (1991). *J. Natl. Cancer Inst.* **82**, 4-6.
3. Ferrara, N. (1995). *Lab. Invest.* **72**, 615-618.
4. Moulton, K.S., Heller, E., Konerding, M.A., Flynn, E., Palinski, W., and Folkman, J. (1999). *Circulation* **99**, 1726-1732.
5. Unemori, E.N., Ferrara, N., Bauer, E.A., and Amento, E.P. (1992). *J. Cell. Physiol.* **153**, 557-562.
6. Ferrara, N., and Davis-Smith, T. (1997). *Endo. Rev.* **18**, 4-25.
7. Connolly, D.T., Heuvelman, D.M., Nelson, R., Olander, J.V., Eppley, B.L., Delfino, J.J., Siegel, N.R., Limgruber, R.M., and Feder, J. (1989). *J. Clin. Invest.* **84**, 1470-1478.
8. Sirois, M.G., and Edelman, E.R. (1997). *Am. J. Physiol.* **272**, H2746-H2756.
9. Bernatchez, P.N., Soker, S., and Sirois, M.G. (1999). *J. Biol. Chem.* **274**, 31047-31054.
10. Bernatchez, P.N., Winstead, M.V., Dennis, E.A., and Sirois, M.G. (2001). *Br. J. Pharmacol.* **134**, 197-205.
11. Bernatchez, P.N., Allen, B.G., Gélinas, D.S., Guillemette, G., and Sirois, M.G. (2001). *Br. J. Pharmacol.* **134**, 1253-1262.
12. Montrucchio, G., Lupia, E., Battaglia, E., Del Sorbo, L., Boccellino, M., Emanuelli, G., and Camussi, G. (2000). *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **20**, 80-88.
13. Ku, D.D., Zaleski, J.K., Liu, S., and Brock, T.A. (1993). *Am. J. Physiol.* **265**, H586-H592.
14. Ziche, M., Morbidelli, L., Choudhuri, R., Zhang, H-T., Donnini, S., Granger, H.J., and Bicknell, R. (1997). *J. Clin. Invest.* **99**, 2625-2634.
15. Lakshminarayanan, S., Antonetti, D.A., Gardner, T.W., and Tarbell, J.M. (2000). *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **41**, 4256-4261.
16. Bussolati, B., Dunk, C., Grohman, M., Kontos, C.D., Mason, J., and Ahmed, A. (2001). *Am. J. Physiol.* **159**, 993-1008.

17. Lal, B.K., Varma, S., Pappas, P.J., Hobson II, R.W., and Duran W.N. (2001). *Microvasc. Res.* **62**, 252-262.
18. Busse, R., and Mulsch, A. (1990). *FEBS Lett.* **265**, 133-136.
19. Brock, T.A., Dvorak, H.F., and Senger, D.R. (1991). *Am. J. Pathol.* **138**, 213-221.
20. Xia, P., Aiello, L.P., Ishii, H., Jiang, Z.Y., Park, D.J., Robinson, G.S., Takagi, H., Newsome, W.P., Jirousek, M.R., and King, G.L. (1996). *J. Clin. Invest.* **98**, 2018-2026.
21. Wu, H.M., Yuan, Y., Zawieja, D.C., Tinsley, J., and Granger, H.J. (1999). *Am. J. Physiol.* **276**, H535-H542.
22. Papapetropoulos, A., García-Cardena, G., Madri, J.A., and Sessa WC. (1997). *J. Clin. Invest.* **100**, 3131-3139.
23. Dimmeler, S., Fleming, I., Fisslthaler, B., Hermann, C., Busse, R., and Zeiher, A.M. (1999). *Nature* **399**, 601-605.
24. Fulton, D., Gratton, J-P., McCabe, T.J., Fontana, J., Fujio, Y., Walsh, K., Franke, T.F., Papapetropoulos, A., and Sessa, W.C. (1999). *Nature* **399**, 597-601.
25. Michell, B.J., Griffiths, J.E., Mitchelhill, K.I., Rodriguez-Crespo, I., Tiganis, T., Bozinovski, S., Ortiz de Montellano, P.R., Kemp, B.E., and Pearson, R.B. (1999). *Cur. Biol.* **9**, 845-848.
26. Thuringer, D., Maulon, L., and Frelin, C. (2001). *J. Biol. Chem.* **277**, 2028-2032.
27. Fleming, I., Fisslthaler, B., Dimmeler, S., Kemp, B.E., and Busse, R. (2001). *Circ. Res.* **88**, e68-e75.
28. Brouet, A., Sonveaux, P., Dessy, C., Balligand, J-L., and Feron, O. (2001). *J. Biol. Chem.* **276**, 32663-32669.
29. He, H., Venema, V.J., Gu, X., Venema, R.C., Marrero, M.B., and Caldwell, R.B. (1999). *J. Biol. Chem.* **274**, 25130-25135.
30. Michell, B.J., Chen, Z-P., Tiganis, T., Stapleton, D., Katsis, F., Power, D.A., Sim, A.T., and Kemp, B.E. (2001). *J. Biol. Chem.* **276**, 17625-17628.
31. Bligh, E.G., and Dyer, W.J. (1959). *Can. J. Biochem. Physiol.* **37**, 911-917.
32. Marcheselli, V.L., Rossowska, M.J., Domingo, M.T., Braquet, P., and Bazan, N.G. (1990). *J. Biol. Chem.* **265**, 9140-9145.

33. Marcheselli, V.L., and Bazan, N.G. (1994). *J. Neurosci. Res.* **37**, 54-61.
34. Michel, T., Li, G.K., and Busconi, L. (1993). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**, 6252-6256.
35. Corson, M.A., James, N.L., Latta, S.E., Nerem, R.M., Berk, B.C., and Harrison, D.G. (1996). *Circ. Res.* **79**, 984-991.
36. García-Cardena, G., Fan, R., Stern, D.F., Liu, J., and Sessa, W.C. (1996). *J. Biol. Chem.* **271**, 27237-27240.
37. Ihida, K., Predescu, D., Czekay, R-P., and Palade, G.E. (1999). *J. Cell Sci.* **112**, 285-289.
38. Camussi, C., Montrucchio, G., Lupia, E., De Martino, A., Perona, L., Arese, M., Vercellone, A., Toniolo, A., and Bussolino, F. (1995). *J. Immunol.* **154**, 6492-6501.
39. Ishii, K., Chang, B., Kerwin, J.F. Jr., Wagenaar, F.L., Huang, Z.J., and Murad, F. (1991). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **256**, 38-43.
40. Govers, R., and Rabelink, T.J. (2001). *Am. J. Physiol.* **280**, F193-F206.
41. Yano, S., Tokumitsu, H., and Soderling, T.R. (1998). *Nature* **396**, 584-587.
42. Yang, C., Watson, R.T., Elmendorf, J.S., Sacks, D.B., and Pessin, J.E. (2000). *Mol. Endocrinol.* **14**, 317-326.
43. Tokumitsu, H., and Soderling, T.R. (1996). *J. Biol. Chem.* **271**, 5617-5622.
44. Gratton, J-P., Fontana, J., O'Connor, D.S., García-Cardena, G., McCabe, T.J., and Sessa, W.C. (2000). *J. Biol. Chem.* **275**, 22268-22272.
45. McCabe, T.J., Fulton, D., Roman, L.J., and Sessa, W.C. (2000). *J. Biol. Chem.* **275**, 6123-6128.

## 2.8. FOOTNOTES

The abbreviations in this manuscript: BAEC, bovine aortic endothelial cells; EC, endothelial cells; eNOS, endothelial nitric oxide synthase; Hsp90, heat shock protein, MAPK, mitogen-activated protein kinase; NO, nitric oxide; PAF, platelet activating factor; PKC, protein kinase C; PI3K, phosphatidylinositol 3-kinase; PLC, phospholipase C; VEGF, vascular endothelial growth factor.

## 2.9. LEGENDS

**Figure 1. VEGF effect on cGMP production.** BAEC were pretreated with (IBMX, 500  $\mu$ M; 10 minutes) prior to VEGF stimulation in a DMEM / 5 mM  $\text{CaCl}_2$  solution. Cells were scraped, proteins lyophilized and cGMP production detected by a RIA kit. (A) VEGF (1 nM) induced a time-dependent increase of cGMP production. (B) Effect of VEGF at various concentrations (0.01-1 nM) on cGMP production for a 10-minute stimulation. \*\*\*P < 0.001 as compared to control buffer (PBS).

**Figure 2. Effect of several pathway inhibitors on VEGF-induced cGMP production.** BAEC were pretreated with IBMX (500  $\mu$ M; 10 minutes), and with inhibitors or antagonists (up to 60 minutes) prior to VEGF stimulation in a DMEM / 5 mM  $\text{CaCl}_2$  solution. cGMP production was detected by a RIA kit. Effect of VEGF (1 nM) on cGMP production upon a pretreatment with (A) eNOS inhibitor (L-NAME, 100  $\mu$ M) or PLC pathway inhibitors (U73122, 10  $\mu$ M; U73343, 10  $\mu$ M; GF109203X, 5  $\mu$ M; Ro318220, 1  $\mu$ M or W-7, 250  $\mu$ M). (B) cGMP synthesis upon stimulation with VEGF (1 nM) or A23187 (10  $\mu$ M) on cGMP in a 5 mM  $\text{CaCl}_2$ . Effect of VEGF (1 nM) on cGMP production upon a pretreatment with two chelators of calcium (EGTA/AM 100  $\mu$ M or BAPTA/AM 10  $\mu$ M) in a  $\text{CaCl}_2$ -free solution. Effect of VEGF (1 nM) on cGMP production upon a pretreatment with (C) two PI3K inhibitors (Wortmannin, 500 nM or LY294002, 50  $\mu$ M), (D) PAF mediator inhibitors (SB203580, 10  $\mu$ M; PD98059, 10  $\mu$ M or SB203347, 10  $\mu$ M) or PAF receptor antagonists (BN52021 10  $\mu$ M; LAU8080, 100 nM or CV3988, 1  $\mu$ M). Effect of PAF



(100 nM or 1  $\mu$ M) on cGMP production. \*\*\*P < 0.001 as compared to control buffer (PBS), †††P < 0.001 as compared to VEGF (1 nM), \*P < 0.05 as compared to control buffer (PBS) in a DMEM CaCl<sub>2</sub> free solution and †P < 0.05 as compared to VEGF (1 nM) in a DMEM CaCl<sub>2</sub> free solution.

**Figure 3. VEGF effect on eNOS phosphorylation at Serine 1177.** Confluent BAEC were stimulated with agonists, cells were lysed and proteins were separated on a 7.5% SDS-PAGE. Western blot analysis was performed with rabbit polyclonal anti-phospho-eNOS (Ser<sup>1177</sup>) antibodies. (A) Western blot analysis of VEGF time-dependent effect on eNOS activation. Studies (B-E) were performed with the same inhibitors described in Figure 2.

**Figure 4. VEGF effect on Akt phosphorylation at Serine 473.** Confluent BAEC were stimulated with agonists, cells were lysed and proteins separated on a 7.5% SDS-PAGE. Western blot analysis was performed with rabbit polyclonal anti-phospho-Akt (Ser<sup>473</sup>) antibodies. Studies (A-E) were performed as detailed in Figure 3.

**Figure 5. Effect of IBMX pretreatment on VEGF-induced immediate cGMP synthesis.** Confluent BAEC were incubated 10 minutes in a DMEM 5 mM CaCl<sub>2</sub> solution. IBMX (500  $\mu$ M) was added for different periods of time (0, 2.5, 5, 10 min) prior to a 10 minute-stimulation with VEGF (1 nM). Cells were scraped, proteins lyophilized and cGMP production detected by a RIA kit. \*\*\*P < 0.001 as compared to control buffer (PBS).

**Figure 6. Effect of PI3K and PKC inhibitors on VEGF-induced immediate and delayed cGMP synthesis.** Immediate cGMP synthesis was measured as described in Figure 2. Delayed cGMP synthesis was performed using confluent BAEC incubated 10 minutes with PKC inhibitors (GF109203X, 5  $\mu$ M or Ro318220, 1  $\mu$ M) or PI3K inhibitors (Wortmannin, 500 nM or LY294002, 50  $\mu$ M) in a DMEM 5 mM CaCl<sub>2</sub> solution prior to VEGF (1 nM) stimulation. IBMX (500  $\mu$ M) was added at 5 minutes after VEGF stimulation and the experiment was stopped 30 minutes after VEGF stimulation. In another set of experiments and under the same conditions (IBMX added 5 minutes after VEGF stimulation), we quantified cGMP synthesis produced between time 5 and 10 minutes (data not shown) and discarded this amount from total delayed cGMP synthesis. Therefore, in figure 6 (black columns) we show delayed cGMP synthesis observed between 10 and 30 minutes after VEGF stimulation. \*\*\*P < 0.001 as compared to control buffer (PBS) for immediate cGMP synthesis, \*P < 0.05 as compared to control buffer (PBS) for delayed cGMP synthesis and †P < 0.05 as compared to VEGF (1 nM) for delayed cGMP.

**Figure 7. Western blot analysis of PAFR expression.** Confluent BAEC were lysed and proteins were separated on a 10% SDS-PAGE. Western blot analysis was performed with goat polyclonal anti-PAFR antibodies. We detected a band at 39 kDa which corresponds to PAFR molecular weight.

**Figure 8. Immunofluorescence analysis of PAFR.** BAEC at 50% confluence were fixed and either permeabilized (P) with Triton X-100 or non-permeabilized (NP). Goat polyclonal anti-PAFR antibodies were used to detect PAFR expression and analysis was made with confocal microscopy. PAF expression on non-permeabilized BAEC (A) or permeabilized BAEC (C). Control PAF expression using a normal non-specific goat IgG on non-permeabilized BAEC (B) and permeabilized BAEC (D).

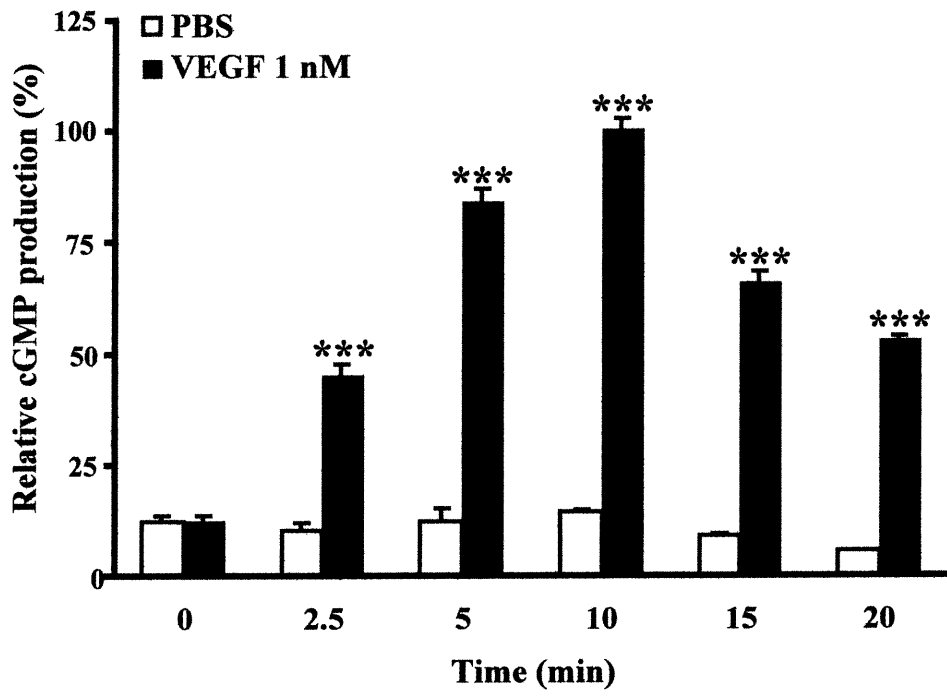
**Figure 9. Effect of VEGF-induced PAF synthesis on EC migration.** BAEC were trypsinized and resuspended ( $1 \times 10^6$  cells /ml) in DMEM, 1% FBS, and antibiotics. PBS or PAFR antagonists (BN52021 10  $\mu$ M; LAU8080, 100 nM or CV3988, 1  $\mu$ M) were added in the higher chamber of the modified Boyden chamber apparatus, and the lower chamber was filled with DMEM, 1% FBS, and antibiotics with or without VEGF (1 nM). Five hours postincubation at 37°C, the migrated cells were stained and counted by using a microscope adapted to a digitized video camera. The values are means of migrating cells/mm<sup>2</sup> from six chambers for each treatment. \*P < 0.05 as compared to their respective control buffer (PBS) and †P < 0.05 as compared to VEGF (1 nM).

**Figure 10. Effect of VEGF-induced nitric oxide on PAF synthesis.** BAEC were grown to confluence. The media was replaced by 1 ml of HBSS-HEPES (10 mM) +  $\text{CaCl}_2$  (5 mM). Inhibitors were added 15 minutes prior to stimulation. VEGF (1 nM) was added to stimulate BAEC: alone as a control, with L-NAME (100  $\mu\text{M}$ ) pretreatment or in addition with the exogenous NO donor SNP (500  $\mu\text{M}$ ). L-NAME (100  $\mu\text{M}$ ) and SNP (500  $\mu\text{M}$ ) were added without VEGF to evaluate their effect on basal PAF synthesis. \*\*\* $P < 0.001$  as compared to control buffer (PBS).

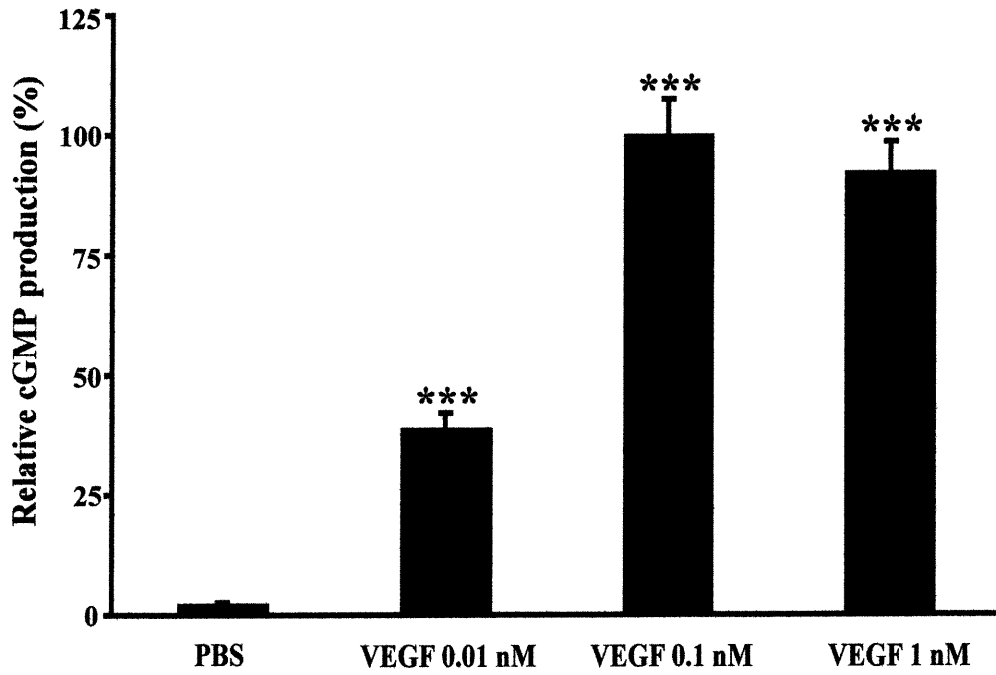
**Figure 11. Proposed intracellular pathways for the induction of NO and PAF synthesis by VEGF in endothelial cells.** VEGF induces immediate NO synthesis through the PLC- $\text{Ca}^{2+}$ /CaM pathway and the induction of delayed NO synthesis implies Akt and PKC activation. In addition, NO and PAF synthesis mediated by VEGF involves two independent pathways.

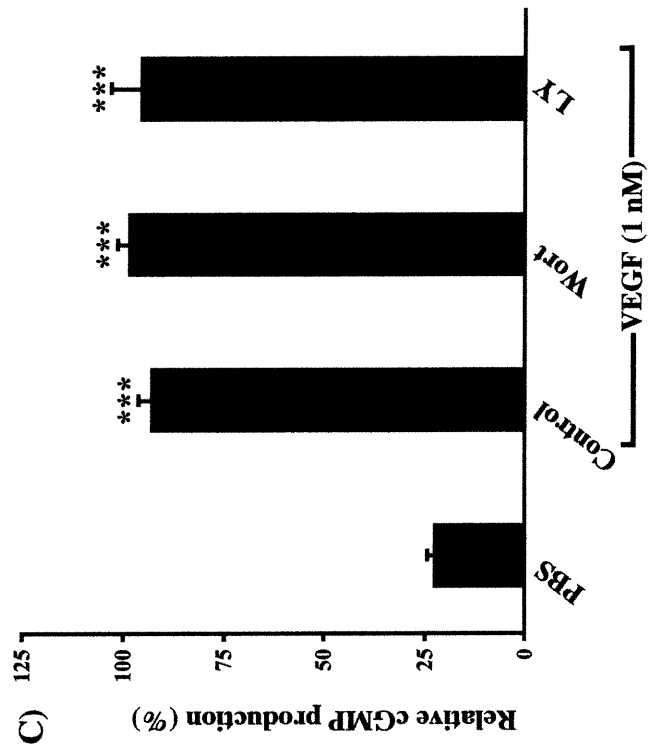
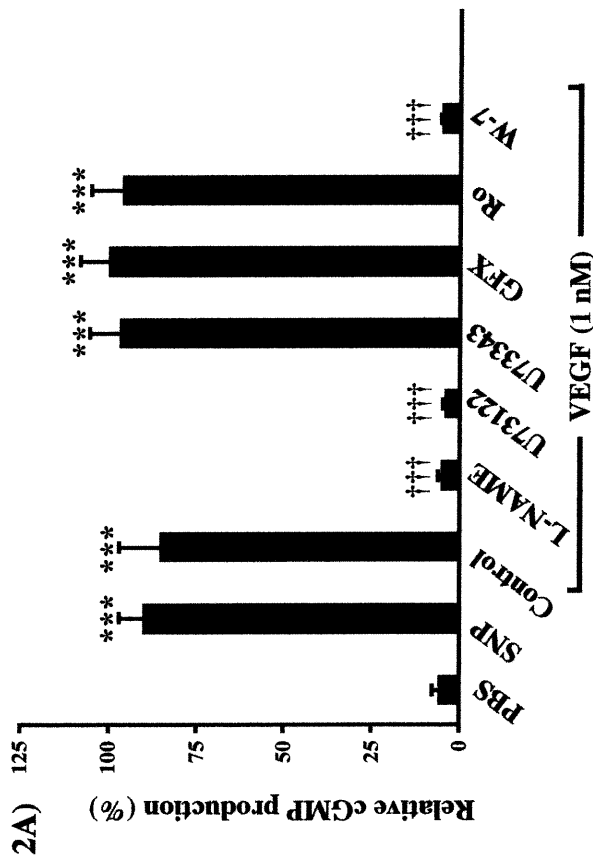
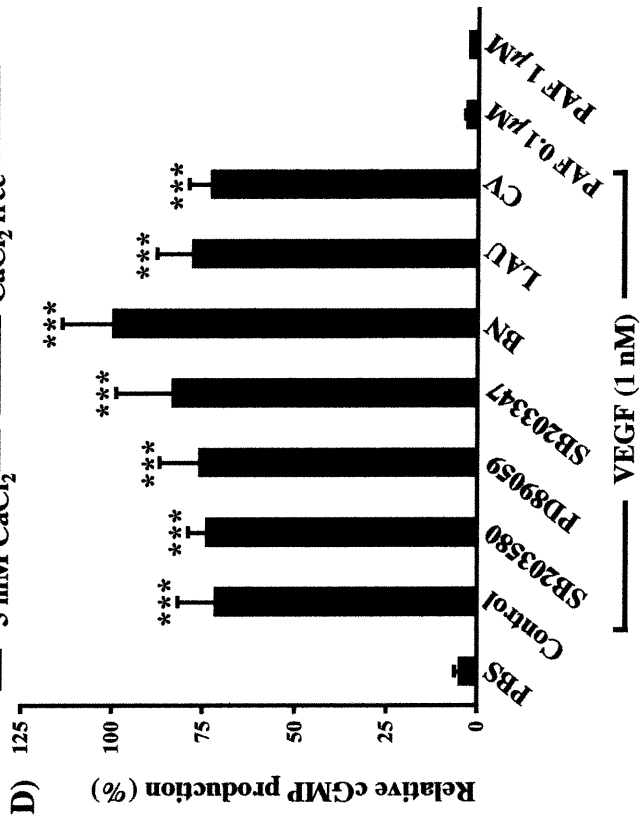
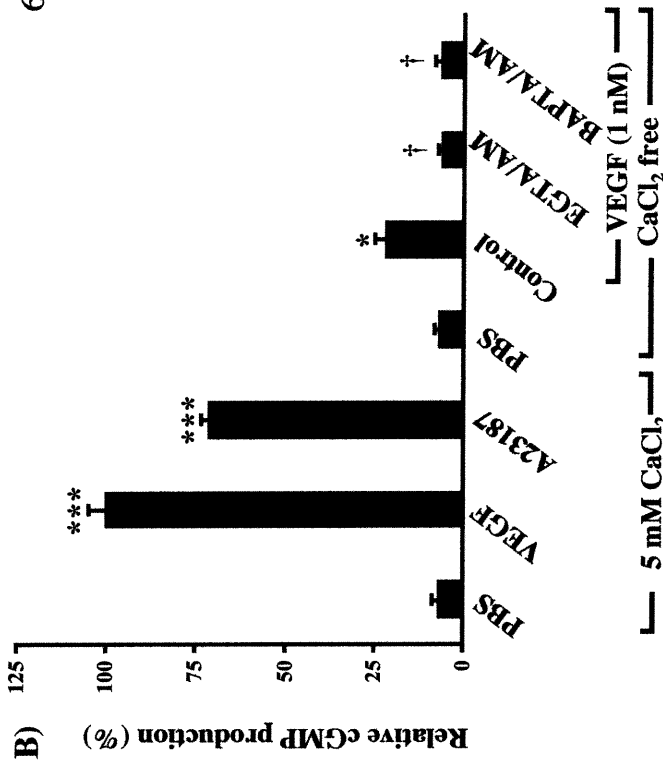
1A)

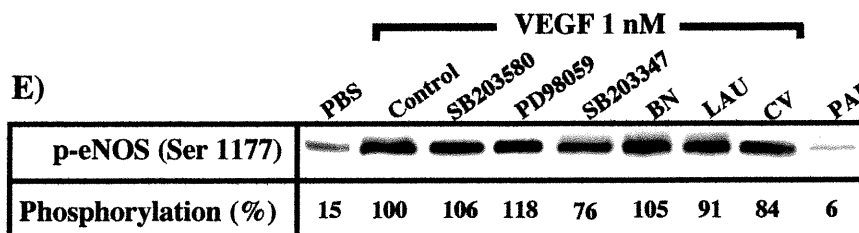
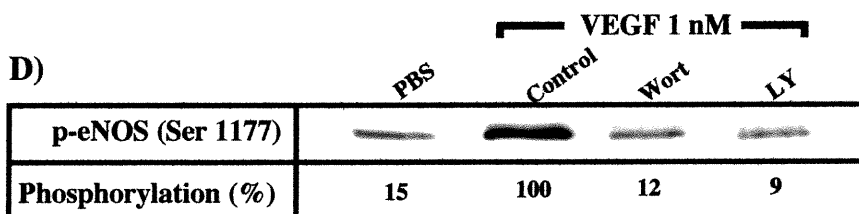
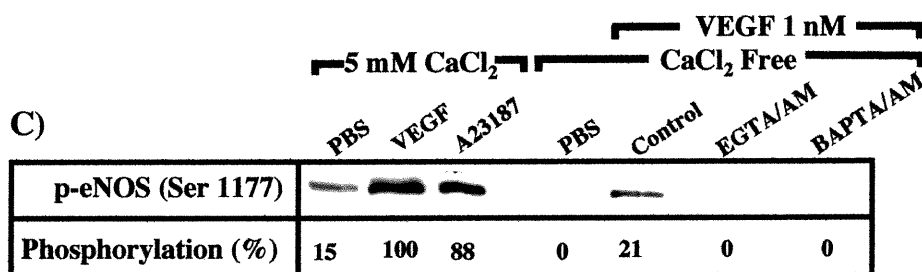
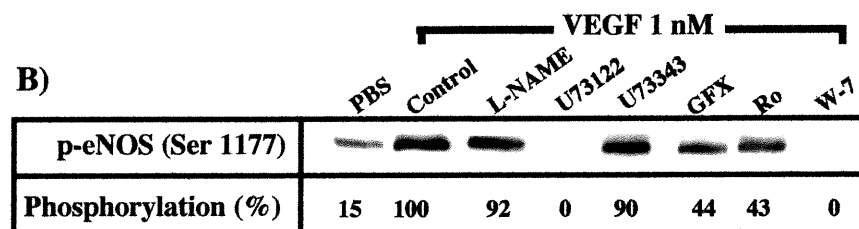
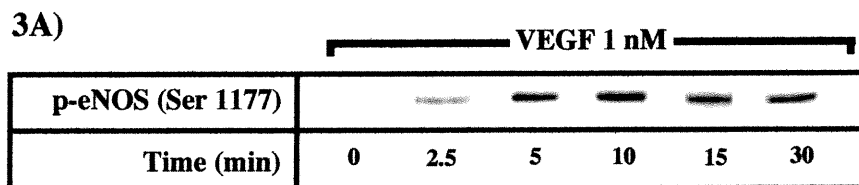
63

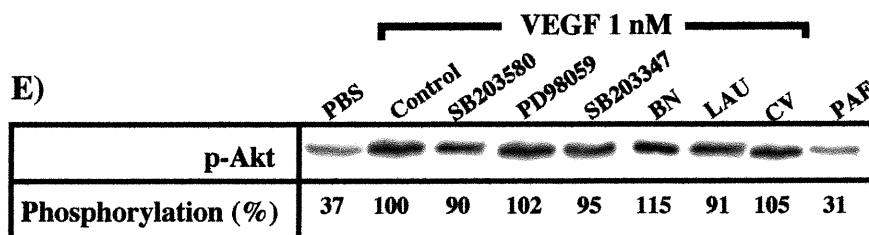
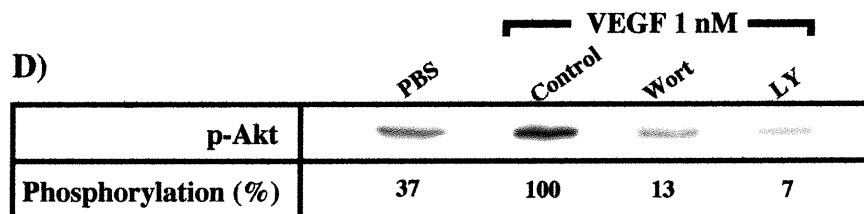
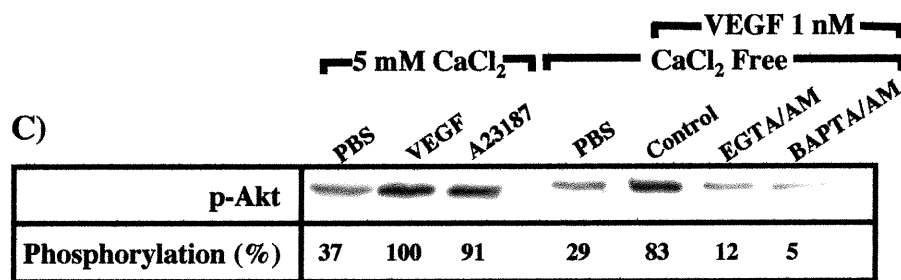
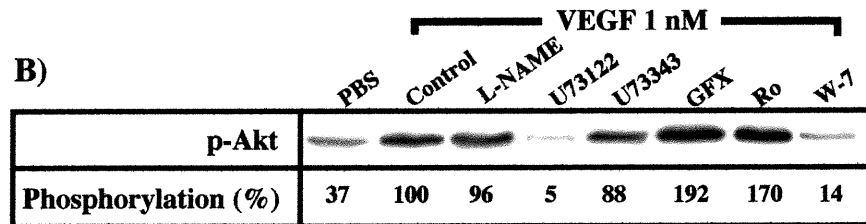
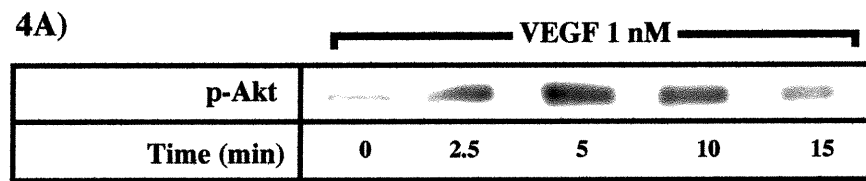


B)



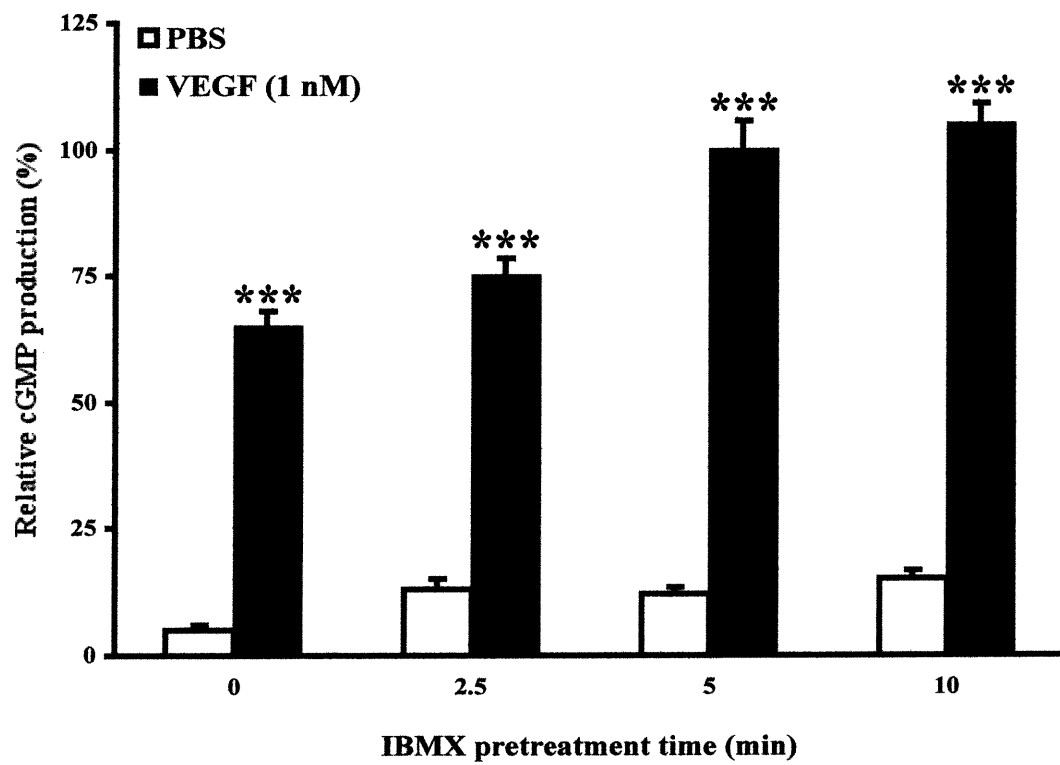




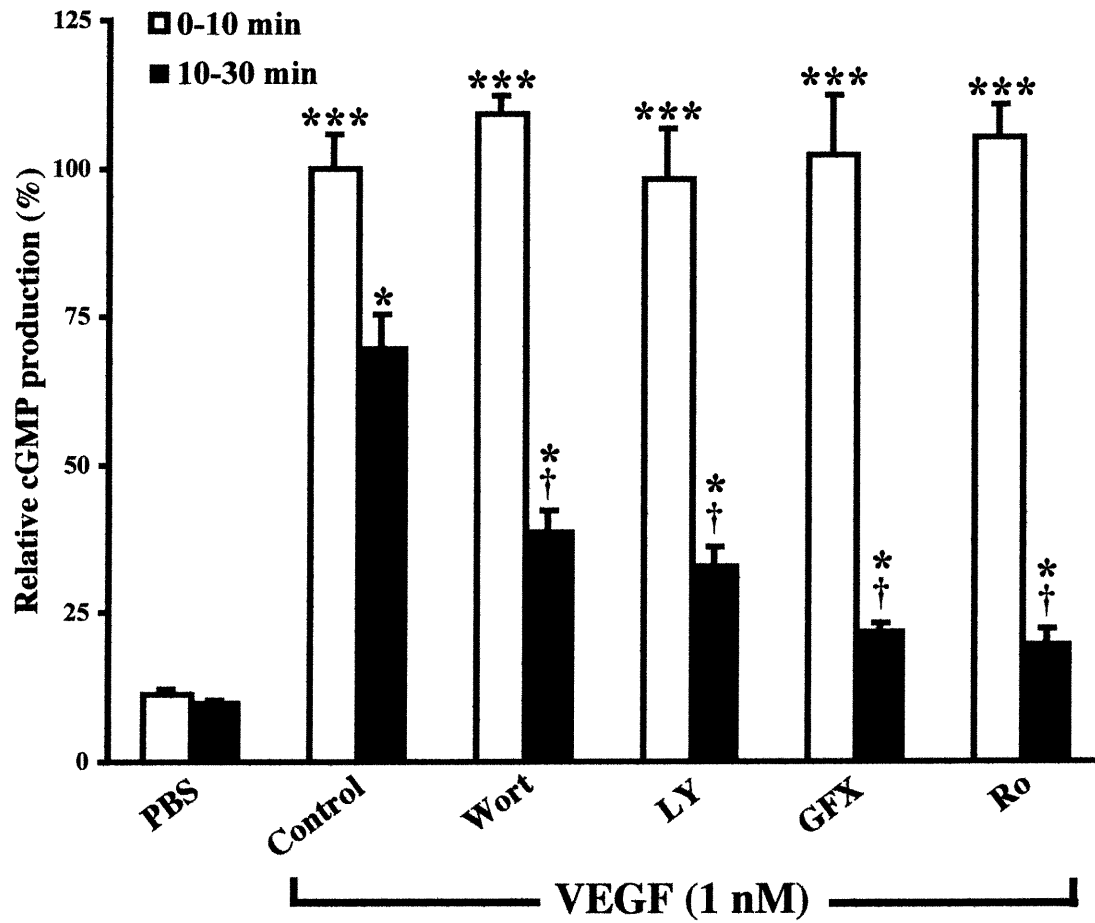




5)



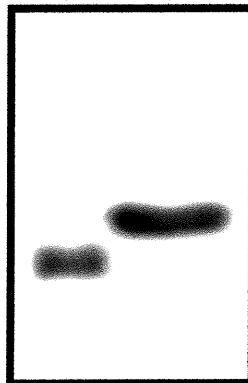
6)



7)

Molecular weight marker  
BAEC

PAFR → 39 kDa -  
30 kDa -

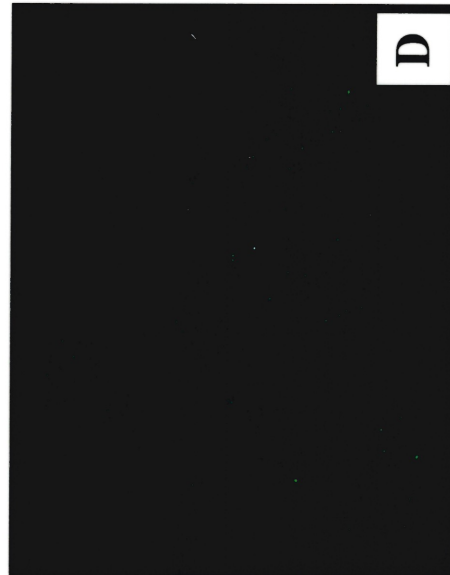
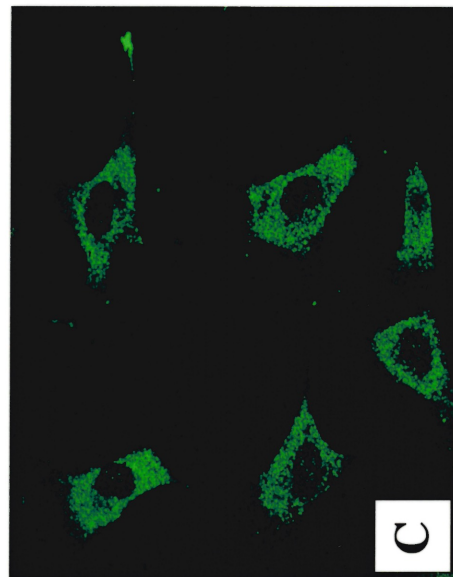
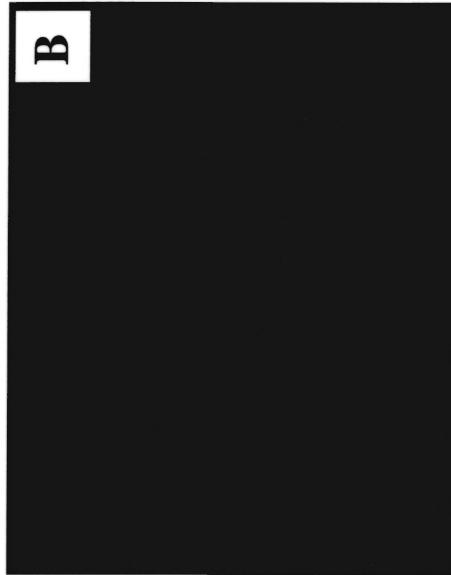
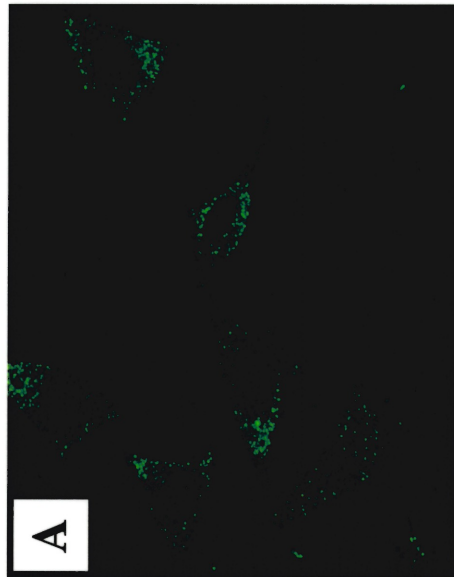


8)

anti-PAFR Ab

IgG

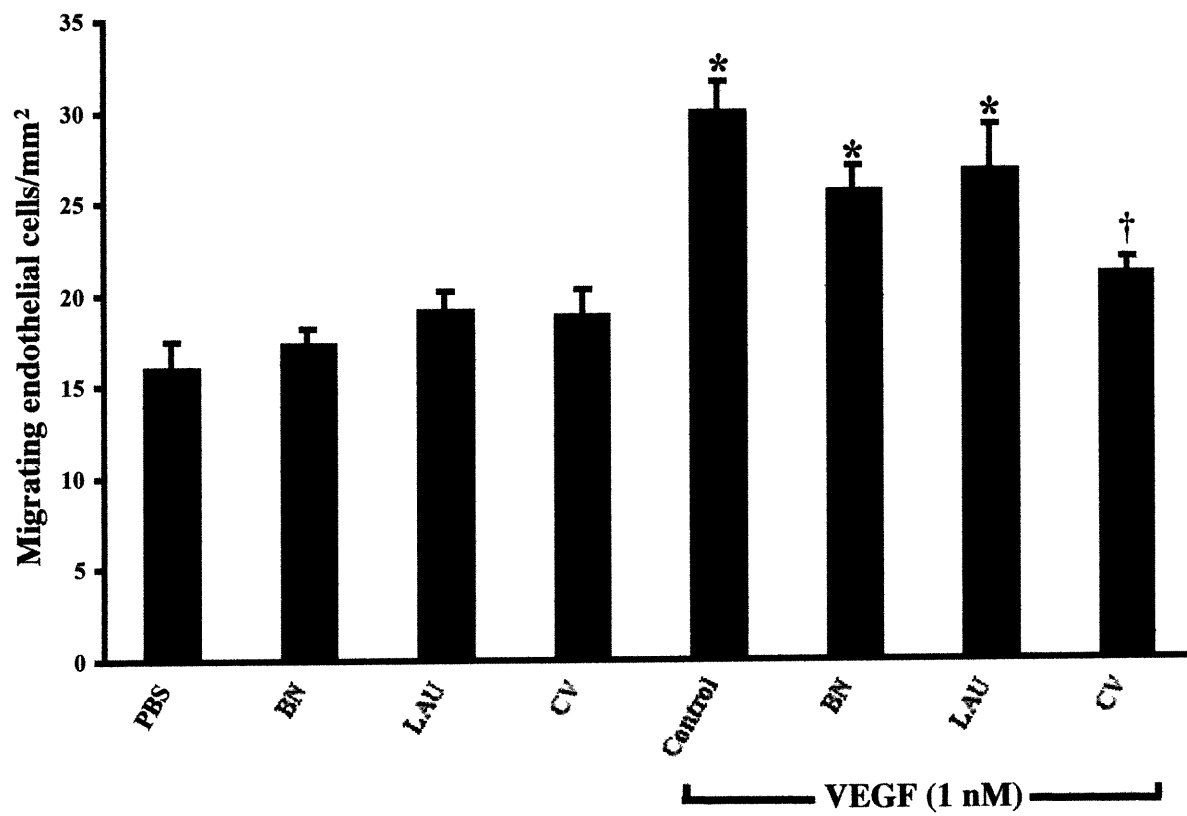
70



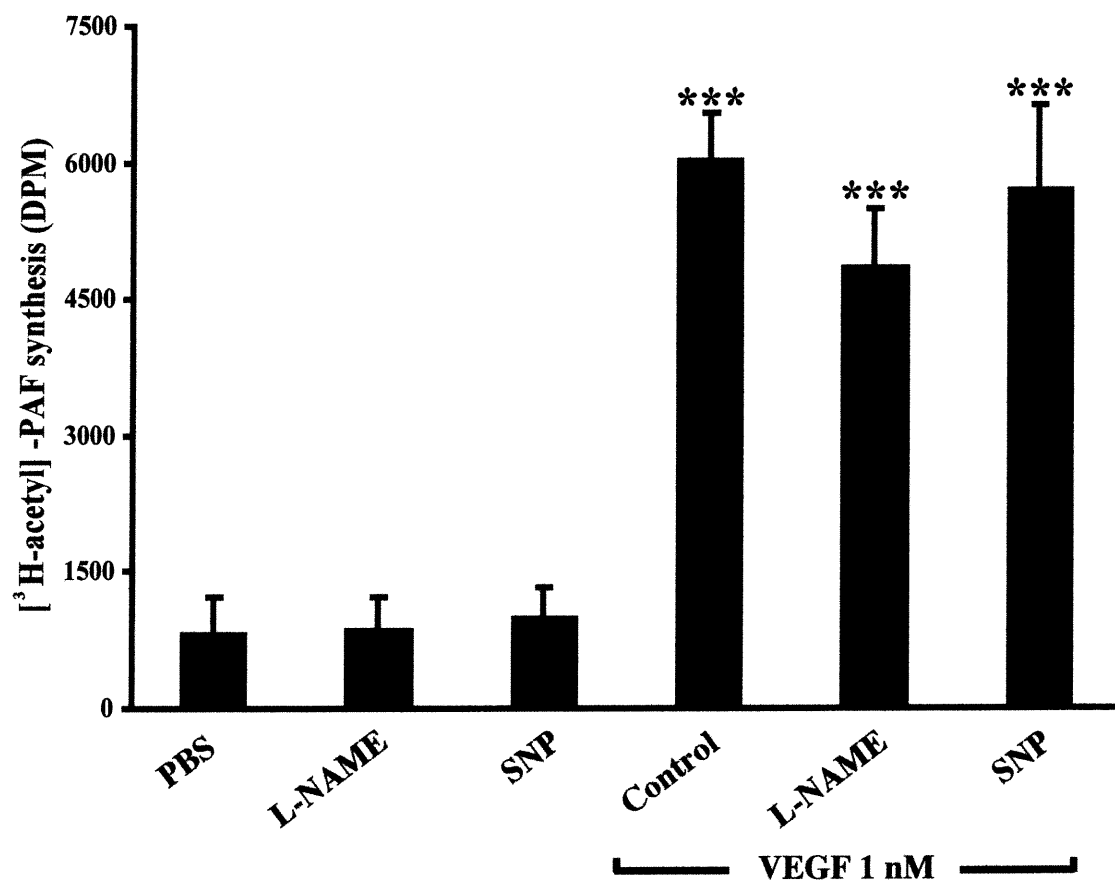
NP

P

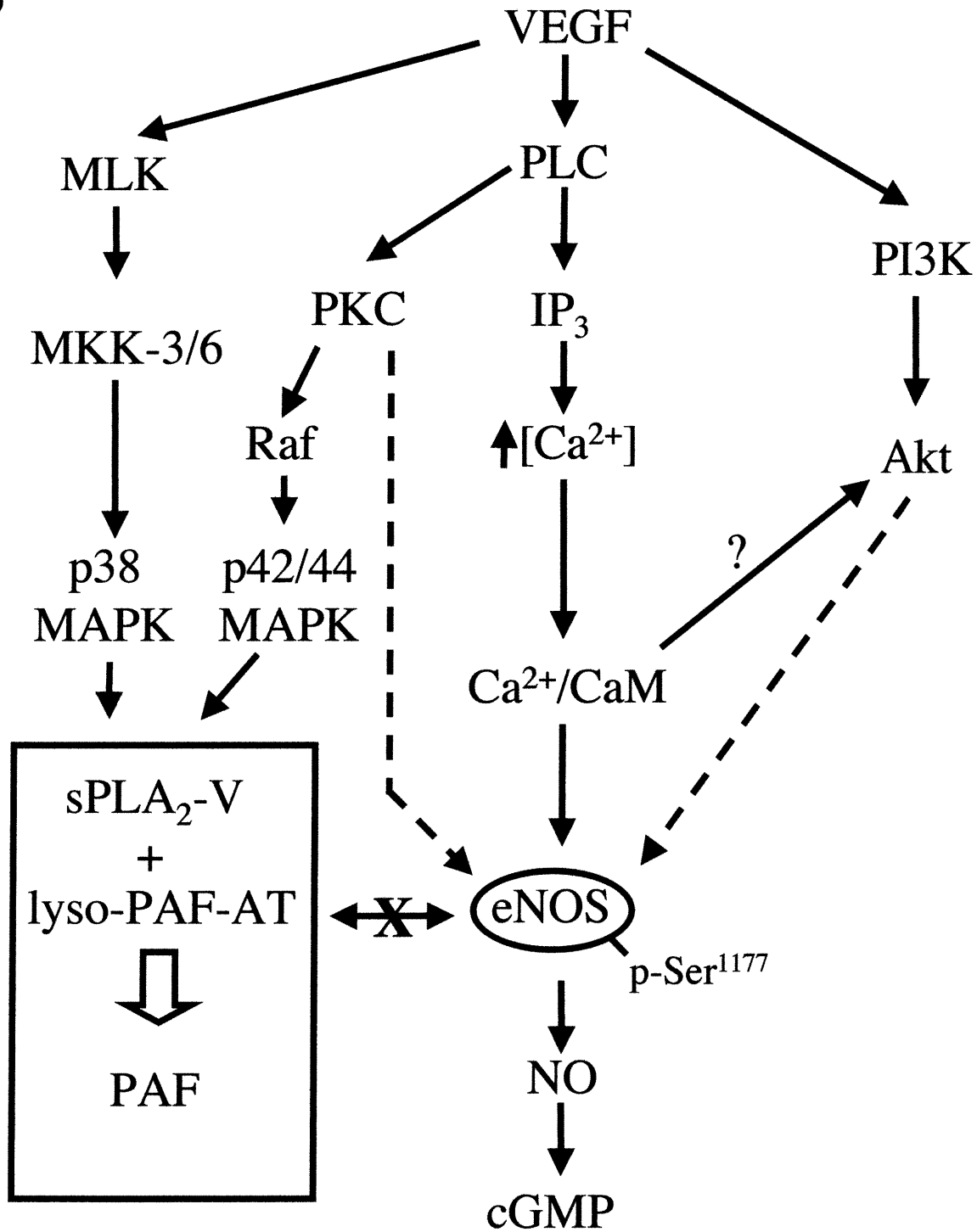
9)



10)



11)



— Immediate effect on NO synthesis  
 - - - Delayed effect on NO synthesis

### 3.0. DISCUSSION

Au cours des dernières années, plusieurs études ont analysé les mécanismes par lesquels certains agonistes tels que l'insuline, la bradykinine et le VEGF, médient l'activation de la eNOS. Toutefois, certaines ambiguïtés ont été soulevées et plus particulièrement en ce qui a trait au rôle joué par la PKC et l'Akt dans l'activation de la eNOS induite par le VEGF.

Néanmoins, il est important de souligner que la majorité des articles publiés lors des dernières années ont démontré un rôle de premier plan pour la protéine Akt au niveau de l'activation et de la phosphorylation de la eNOS. Toutefois, deux articles récents (62, 70) ont démontré que Akt n'avait pas ou peu d'importance dans l'activation de la eNOS. En analysant l'article du groupe du Dr Frelin (62), nous pouvons constater que le VEGF de même que la bradykinine augmentent la production du NO basale de façon considérable. Toutefois, l'emploi de la Wortmannin ne bloque que très légèrement l'augmentation de la production du NO basale engendrée par une stimulation avec le VEGF ou la bradykinine pour une période de 10 minutes. Je crois qu'il aurait été important dans cette étude d'évaluer l'effet du VEGF et de la bradykinine sur la production du NO pour une période de temps tardive (par exemple, entre 10 et 30 minutes). Ainsi, il est possible de croire que la Wortmannin aurait eu un effet inhibiteur beaucoup plus prononcé sur la production tardive du NO induite par le VEGF ou la bradykinine. Cette observation est aussi valide pour l'article du groupe du Dr Busse (70). En effet, dans cette étude, une stimulation des CE par la bradykinine ou l'histamine pour une période de 3 minutes induit une augmentation marquée de la



production de GMPc et un prétraitement avec la Wortmannin ne prévient pas cette augmentation. Par conséquent, il est permis de spéculer qu'une stimulation tardive des CE par ces agonistes pourraient impliquer l'activation de Akt pour induire la synthèse du NO.

Par ailleurs, deux études ont démontré des résultats complètement opposés quant au rôle joué par la PKC dans l'activation de la eNOS induite par le VEGF (46, 61). Premièrement, le groupe du Dr Kemp (61) démontre que le VEGF induit une phosphorylation de la Ser<sup>1177</sup> accompagnée d'une déphosphorylation de la Thr<sup>495</sup>, ce qui a pour effet d'activer la eNOS. L'emploi d'un inhibiteur de la PKC (Ro318220) induit une hyper phosphorylation de la Ser<sup>1177</sup> et une hyper déphosphorylation de la Thr<sup>495</sup> de la eNOS suite à une stimulation par le VEGF. Ces résultats démontrent une régulation négative de la eNOS par la PKC. D'un autre côté, le groupe du Dr Caldwell (46) emploie un autre inhibiteur de la PKC (GF109203X) et ce dernier bloque complètement l'augmentation de la production de GMPc induite par le VEGF pour une période de 5 minutes. Ces résultats démontrent un rôle positif de la PKC dans la régulation de la eNOS. Il est difficile d'évaluer la source pouvant conduire à ces résultats opposés puisque dans les deux cas les auteurs ont employé les BAEC pour effectuer leurs expériences (le groupe du Dr Kemp a aussi utilisé les HUVEC). Toutefois, le groupe du Dr Kemp (61) n'a pas démontré l'effet direct du VEGF ( $\pm$  inhibiteurs) sur la production du NO, en utilisant, par exemple, la quantification de la synthèse de GMPc ou la quantification de la production de nitrite/nitrate. De plus, ces derniers appuient leurs résultats en partie sur la déphosphorylation de la Thr<sup>495</sup>, ce qui

demeure controversé puisque cette technique n'est pas reproductible chez tous les groupes de recherche. Le fait que deux inhibiteurs de la PKC différents (GF109203X et Ro318220) ont été utilisés auraient pu constituer une source de conflit. Toutefois, dans notre étude, ces deux mêmes inhibiteurs ont été employés et les résultats obtenus sont similaires. Finalement, il est possible de croire que les différences observées proviennent de la méthodologie employée pour traiter et stimuler les cellules. Par exemple, le groupe du Dr Kemp prétraite les cellules avec de la calmoduline, ce qui, à mon avis, peut influencer la régulation des voies de signalisation intracellulaire comparativement à une expérience où les cellules ne sont pas prétraitées avec de la calmoduline.

Dans l'étude présente, nous avons voulu déterminer la contribution de l'Akt, de la PKC, de la PLC et du calcium, sur l'activation de la eNOS en mesurant la phosphorylation de la Ser<sup>1177</sup> et en quantifiant la synthèse immédiate et tardive de NO/GMPc. De plus, comme le VEGF induit la synthèse du PAF et du NO et que ces deux médiateurs sont impliqués tant dans l'effet inflammatoire qu'angiogénique du VEGF, nous avons voulu déterminer s'il existait une interaction de synthèse entre ces deux molécules.

### 3.1. Formation du complexe Ca<sup>2+</sup>/CaM et activation de la eNOS

Il est bien connu que la eNOS peut être régulée par la relâche de calcium intracellulaire qui peut être induite par une multitude d'agonistes tels que la bradykinine, la

sérotonine, le VEGF et l'histamine (57). Le mécanisme par lequel le VEGF induit la relâche de calcium intracellulaire fait suite à l'activation de la PLC. La PLC possède la capacité d'induire la synthèse de DAG et d'IP<sub>3</sub>. Ce dernier promouvoit la relâche de calcium intracellulaire en activant les canaux calciques du réticulum endoplasmique. Dans l'étude présente, nous avons démontré qu'un prétraitement avec un inhibiteur de la PLC (U73122) bloquait totalement la phosphorylation sur la Ser<sup>1177</sup> de la eNOS et la synthèse de GMPc induite par le VEGF confirmant ainsi le rôle essentiel de la PLC. La contribution du calcium intracellulaire fut davantage supportée par le fait qu'une stimulation avec un ionophore calcique (A23187), était presque aussi efficace que le VEGF pour induire la phosphorylation sur la Ser<sup>1177</sup> de la eNOS et la synthèse de GMPc. De plus, dans un milieu dépourvu de calcium extracellulaire, le VEGF a induit une augmentation de la phosphorylation sur la Ser<sup>1177</sup> de la eNOS et de la synthèse de GMPc, mais de façon beaucoup moindre que dans un milieu contenant 5 mM de CaCl<sub>2</sub>. Ces données illustrent que la relâche de calcium intracellulaire est suffisante pour médier en partie l'activation de la eNOS et pour synthétiser le GMPc, mais que, ces effets sont potentialisés par l'entrée de calcium extracellulaire dans les cellules endothéliales.

### 3.2. La synthèse immédiate de GMPc est Akt-indépendante

Dans notre étude, nous avons observé que l'inhibition de l'activation de la PLC, la prévention de la formation du complexe Ca<sup>2+</sup>/CaM ou l'utilisation de chélateurs calciques ont bloqué en totalité la phosphorylation de Akt médiée par le VEGF. Ces

données suggèrent que la phosphorylation de Akt est dépendante de la formation du complexe  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ . Comme il a été précédemment rapporté (68), nous avons aussi démontré que la phosphorylation de Akt pouvait être médiée par l'activation de la PI3K induite par le VEGF. En effet, un prétraitement avec les inhibiteurs Wortmannin ou LY294002 a empêché la phosphorylation de Akt induite par le VEGF. Par conséquent, nos données suggèrent que la phosphorylation de Akt requiert une élévation du calcium intracellulaire et l'activation de la PI3K. Nos résultats sont supportés par de récentes études dans lesquelles il a été démontré que la phosphorylation de Akt peut être induite par l'activation de la " $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ -dependent protein kinase kinase" (CaM-KK) et qu'un prétraitement avec un antagoniste de la CaM prévient la phosphorylation de Akt médiée par l'insuline (106-108).

Il est intéressant de noter que l'inhibition de la phosphorylation de Akt par le complexe  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  a bloqué en totalité la production immédiate de GMPc tandis que la prévention de la phosphorylation de Akt par les inhibiteurs de la PI3K n'a pas atténué la synthèse immédiate de GMPc. Dans la section précédente, nous avons défini le rôle essentiel joué par le complexe  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  pour la phosphorylation de la eNOS de même que pour la synthèse de GMPc. Par conséquent, nos résultats suggèrent que la synthèse immédiate de GMPc nécessite l'interaction entre la eNOS et le complexe  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ , et que l'activation de Akt n'est pas requise pour l'induction initiale de la production de GMPc.

Enfin, il est important de souligner le fait que les deux inhibiteurs de la PKC ont augmenté de façon significative la phosphorylation de Akt suite à une stimulation par le VEGF. À première vue, cette observation est intrigante puisque cela suggère une régulation directe ou indirecte de PKC sur Akt. Toutefois, il est possible d'émettre une explication en se basant sur des faits tirés de la littérature. Pour parvenir à mon hypothèse, il m'est important de faire un rappel des voies de signalisation activées par la PI3K. Premièrement, le rôle essentiel de la PI3K réside dans sa capacité à réguler tant la survie que la mort cellulaire. De plus, une défaillance dans les voies de signalisation engendrées par la PI3K est associée à des maladies telles que le diabète et le cancer. Pour toutes ces raisons, la recherche des différentes protéines activées par la PI3K s'est largement approfondie au cours des dernières années. Un groupe de protéines de type sérine/théonine kinases (Akt, protéine kinase A et G, etc) se sont avérés comme étant les principaux médiateurs de la PI3K (111). Toutefois, la plupart des membres de cette famille nécessitent une phosphorylation pour être pleinement actifs. Par conséquent, les investigations ont focalisé sur la recherche d'une kinase pouvant médier ces phosphorylations suite à l'activation de la PI3K. En 1997, cette protéine fut découverte et nommée "phosphoinositide-dependent kinase-1" (PDK-1) (112).

La phosphorylation de Akt par PDK-1 est régulée par le changement conformationnel de Akt. Spécifiquement, Akt possède un domaine nommé "pleckstrin homology" (PH) via lequel Akt peut interagir avec les molécules lipidiques activées par PI3K, c'est-à-dire la phosphatidylinositol (PtdIns)(3,4)P<sub>2</sub> et la PtdIns(3,4,5)P<sub>2</sub>.

Cette interaction mène subséquemment à la phosphorylation de Akt au niveau de la Ser<sup>473</sup> et de la Thr<sup>308</sup> par PDK-1 (113). La phosphorylation de Akt sur la Thr<sup>308</sup> par PDK-1 est très bien définie dans la littérature. Toutefois, le mécanisme de la phosphorylation sur Ser<sup>473</sup> est moins claire et il semble que PDK-1 nécessite la présence d'une autre protéine nommé PDK-2 (114).

D'autre part, il a été démontré que PDK-1 possède aussi la capacité de phosphoryler la plupart des isoformes de la PKC par un mécanisme similaire à celui observé pour la phosphorylation de Akt (115). Par conséquent, nous suggérons que l'emploi des inhibiteurs de la PKC ont eu pour effet d'augmenter la disponibilité de la PDK-1, ce qui, subséquemment conduit à une augmentation au niveau de la phosphorylation de Akt.

### 3.3. La synthèse tardive de GMPC est PKC- et Akt-dépendante

Mise à part la synthèse d'IP<sub>3</sub> et la relâche de calcium intracellulaire, la PLC promouvoit également l'activation de la PKC qui fait suite à la synthèse de DAG. La PKC est une enzyme calcium-dépendante et sa contribution au niveau de la régulation de la eNOS demeure controversée. En effet, une étude antérieure a démontré qu'un traitement avec un inhibiteur de la PKC bloquait en totalité la synthèse de GMPC, alors qu'une étude a établi que la PKC phosphorylait la Thr<sup>495</sup> et déphosphorylait la Ser<sup>1177</sup> de la eNOS exerçant ainsi une action inhibitrice sur l'activité enzymatique de la eNOS (61). Dans notre étude, nous avons trouvé qu'en dépit du fait que deux inhibiteurs

indépendant de la PKC (GF109203X ou Ro3188220) ont atténué la phosphorylation sur la Ser<sup>1177</sup> de la eNOS de 66% et 67% respectivement, ils n'ont pas démontré d'action inhibitrice sur la synthèse immédiate de GMPc. Il est intéressant de noter qu'une étude récente a établi que la synthèse immédiate du NO pouvait être médiée exclusivement par la relâche de calcium intracellulaire et que la phosphorylation de la eNOS par des messagers intracellulaires tels que Akt et Hsp90 étaient responsables de la synthèse tardive du NO. Par conséquent, nous avons également quantifié la synthèse tardive de GMPc (10-30 min) suite à une stimulation au VEGF et nous avons déterminé que l'utilisation des deux inhibiteurs de la PKC (GF109203X ou Ro3188220) atténuait la synthèse tardive de cGMP induite par le VEGF par 80% et 84% respectivement. Ce résultat confirme un rôle positif joué par la PKC au niveau de la régulation de la eNOS, ce qui est en accord avec deux rapports antérieurs (46, 70).

Par ailleurs, il a été précédemment démontré à l'aide d'inhibiteurs de la PI3K, que la prévention de l'activation de Akt réduisait partiellement la synthèse de GMPc médiée par le VEGF (68). Parallèlement, plusieurs rapports ont établi que Akt possédait la capacité d'induire la phosphorylation sur la Ser<sup>1177</sup> de la eNOS (63, 64, 69). En revanche, deux études récentes ont démontré que l'inhibition de PI3K bloquait peu ou pas la synthèse du NO (62, 70). Nos résultats ont démontré que deux inhibiteurs de la PI3K (Wortmannin ou LY294002) bloquaient totalement la phosphorylation sur la Ser<sup>1177</sup> de la eNOS même si ces derniers n'ont pas inhibé la synthèse immédiate de GMPc induite par le VEGF. Toutefois, ces deux mêmes inhibiteurs ont atténué la production tardive de GMPc médiée par le VEGF de 52% et 62% respectivement. De

récentes études laissent supposer que l'effet tardif de Akt sur la synthèse du NO est imputable à la phosphorylation sur la Ser<sup>1177</sup> de la eNOS. En effet, cette phosphorylation serait responsable d'une diminution de la dissociation de la calmoduline une fois que la concentration en calcium intracellulaire retourne à son niveau basal (63-66).

Il est intéressant de noter que l'inhibition de la synthèse tardive de GMPc médiée par les deux inhibiteurs de la PKC était plus efficace que celle observée avec les inhibiteurs de la PI3K bien que ces derniers aient médié une inhibition plus importante sur la phosphorylation de la Ser<sup>1177</sup> de la eNOS. Néanmoins, nos résultats sont en accord avec une étude récente qui a démontré que Ro318220 (inhibiteur de la PKC) a un effet inhibiteur supérieur à celui de la Wortmannin (inhibiteur de la PI3K) sur la synthèse de NO induite par le VEGF (70). De plus, un rapport antérieur a démontré que la séquence d'événements temporelle menant à l'activation de la eNOS suite à une stimulation par le VEGF impliquait respectivement l'activation de KDR-PLC-Ca<sup>2+</sup>-PKC (109). En se basant sur cette étude, nous suggérons que l'interaction entre la PKC et la eNOS précède et facilite l'action subséquente de l'Akt. Cette hypothèse pourrait expliquer pourquoi il y a une plus grande inhibition de la synthèse tardive de GMPc induite par le VEGF par les inhibiteurs de la PKC même si les inhibiteurs de la PI3K ont montré un effet supérieur sur la prévention de la phosphorylation de eNOS induite par le VEGF.



### 3.4. Absence d'interaction entre la synthèse de PAF et de NO induite par le VEGF

Par la suite, nous avons voulu déterminer le rôle du PAF sur la synthèse du NO médiée par le VEGF puisque ces deux médiateurs participent aux effets tant inflammatoires qu'angiogéniques du VEGF (79-81, 83, 84). Un prétraitement avec des inhibiteurs de la synthèse de PAF (SB203580, PD98059 ou SB203347) ou avec des antagonistes du récepteur du PAF (BN52021, LAU8080 ou CV3988) n'ont pas bloqué la phosphorylation sur la Ser<sup>1177</sup> de la eNOS et sur la synthèse de GMPc médiée par le VEGF. Ainsi, nos résultats suggèrent que le PAF ne contribue pas à la synthèse du NO induite par le VEGF. En contrepartie, nous avons également étudié la contribution du NO sur la synthèse du PAF induite par le VEGF. Nous avons démontré qu'un prétraitement avec L-NAME n'a pas atténué la synthèse du PAF médiée par le VEGF et aussi que l'ajout d'un donneur exogène de NO (SNP) n'a pas augmenté la production basale du PAF. Par conséquent, nos résultats suggèrent qu'il n'y a pas d'interaction entre la synthèse du NO et du PAF médiée par le VEGF.

### 3.5. Critique de la méthodologie

Dans l'étude présente, nous avons évalué les voies de signalisation activées par le VEGF menant à la synthèse de NO. Toutefois, étant donné que le NO lui-même est extrêmement difficile à mesurer, nous avons quantifié la production de GMPc.

Cependant, la mesure de la production de GMPc comporte quelques désavantages. En effet, il existe au moins deux sortes de récepteur capable de synthétiser le GMPc : la guanylate cyclase soluble et la guanylate cyclase particulaire. Le NO active la guanylate cyclase soluble et l'ANP, quant à lui, active la guanylate cyclase particulaire. Dans les deux cas, l'activation de la guanylate cyclase résulte en la conversion du GTP en GMPc. Ainsi, dans notre étude, il était important d'évaluer la source du GMPc observé. Par conséquent, nous avons confirmé la validité de notre approche en stimulant les CE avec un donneur exogène du NO (SNP), ce qui a résulté en une augmentation de la production de GMPc comparable à celle observée avec le VEGF. De plus, l'utilisation du L-NAME a complètement bloqué l'augmentation de la production de GMPc induite par le VEGF confirmant ainsi que le GMPc observé est bel et bien le résultat de la stimulation de la guanylate cyclase soluble par le NO. Un autre inconvénient lorsque l'on mesure la production de GMPc provient du fait que l'on doit prétraiter les cellules avec le IBMX, un inhibiteur des phosphodiesterases, pour empêcher la dégradation du GMPc. Une étude récente (61) a démontré que le IBMX par lui-même peut stimuler la phosphorylation de la eNOS sur la Ser<sup>1177</sup>. Dans notre étude, nous avons comparé la production de GMPc basale des CE avec celle obtenue après une stimulation des CE avec le IBMX (500  $\mu$ M) seul pour une période de 10 minutes (résultats non présentés). Les cellules traitées avec le IBMX ont démontré une très faible augmentation de la production de GMPc basale. Dans de futures expériences, il serait intéressant de confirmer nos résultats avec une autre méthode, qui ne nécessite pas de prétraitement avec le IBMX (par exemple, la quantification des nitrites et des nitrates). Néanmoins, je crois que l'effet du IBMX observé est trop

minime pour influencer les mécanismes intracellulaires induits par le VEGF. De plus, nos analyses de type Western (sans IBMX) obtenus pour la phosphorylation de la eNOS sur la Ser<sup>1177</sup> supportent ceux obtenus pour la quantification du GMPc. Par ailleurs, chacune des analyses de type Western présentée dans cette étude ont été effectuée un minimum de quatre fois pour confirmer la validité de nos résultats. Un essai protéique de type Bradford a été effectué pour s'assurer que la quantité de protéines appliquée dans les puits étaient égales. Néanmoins, je reconnais qu'il aurait été judicieux de rajouter une protéine dont l'expression ne varie pas en fonction des traitements tel que le GAPDH. Par ailleurs, les concentrations des inhibiteurs et des antagonistes utilisés ont été choisies par le biais d'une recherche dans la littérature.

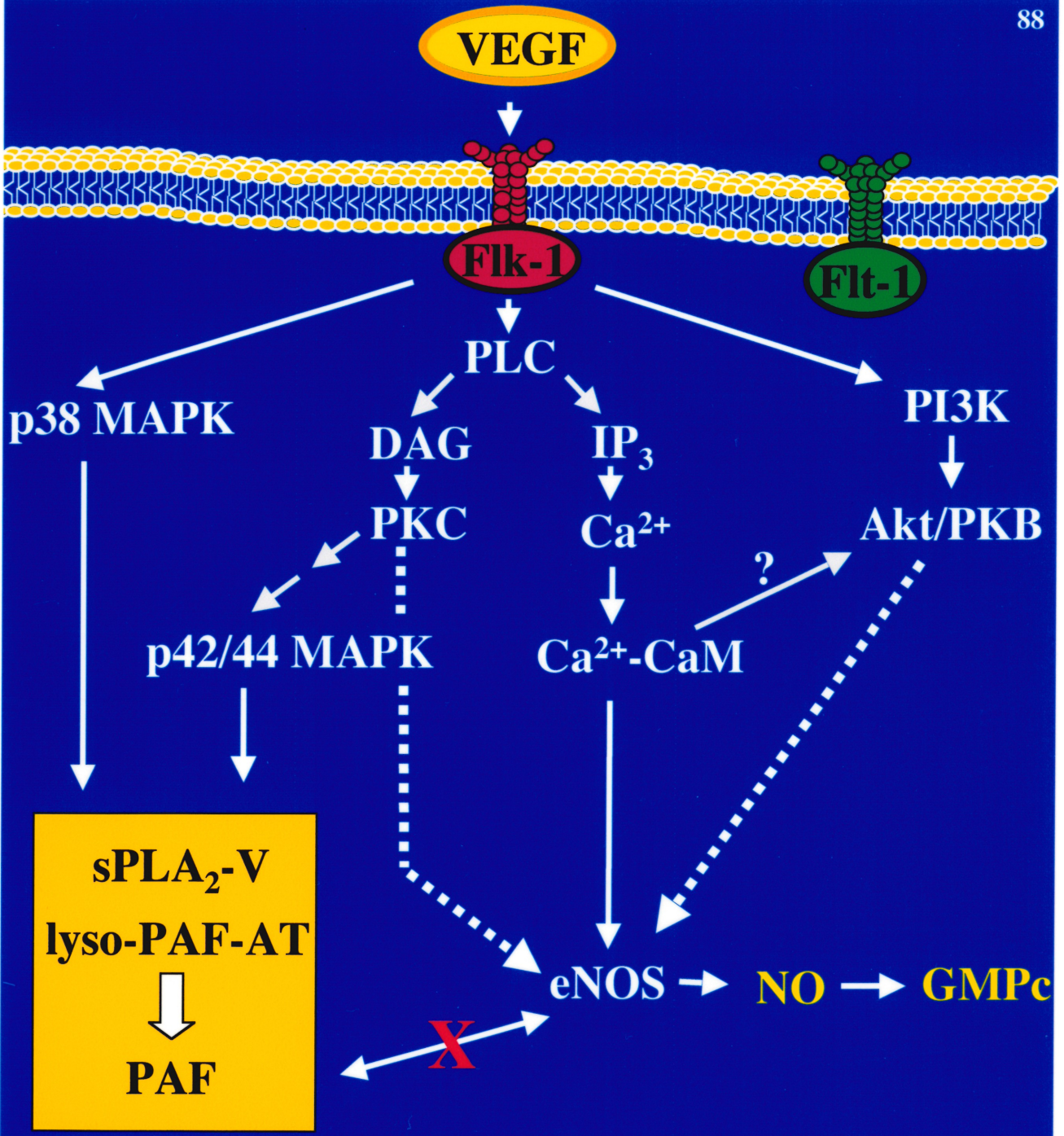
Brièvement, je crois qu'il y a plusieurs avenues intéressantes pour de futures expériences basées sur ce projet. Premièrement, je considère qu'il serait important d'investiguer plus en profondeur la relation entre les protéines Akt, PKC et PDK-1. De plus, il a été démontré que les phosphatases PP1 et PP2A sont associées avec la eNOS (61). Par conséquent, nous pourrions évaluer le rôle de ces phosphatases dans une étude future. Finalement, il serait aussi intéressant d'étudier si l'absence d'interaction entre le NO et le PAF est encore présente dans un modèle *in vivo*.

#### 4. CONCLUSION

Nous avons démontré que la synthèse immédiate du NO induite par le VEGF est médiée via l'activation de la voie PLC/Ca<sup>2+</sup>/CaM. Nous avons également démontré que le VEGF conduit à une synthèse tardive du NO qui requiert la contribution de la PKC et de Akt. Finalement, nous avons établi qu'il n'y a pas d'interaction entre la synthèse du NO et du PAF induite par le VEGF (Fig. 5).

**Figure 5. Mécanisme proposé pour l'activation de la eNOS induit par le VEGF.**

Nos résultats suggèrent que la synthèse immédiate du NO induite par le VEGF est médiée via l'activation de la voie PLC/Ca<sup>2+</sup>/CaM et que le VEGF conduit également à une synthèse tardive du NO impliquant la contribution de PKC et de Akt. Finalement, toutes nos données ont démontré qu'il n'y a pas d'interaction entre la synthèse du NO et du PAF induite par le VEGF.



Effet immédiat ( — ) & tardif ( ····· ) sur la synthèse du NO

Figure 5

## 5.0. RÉFÉRENCES

1. Lucher TF, and VanHoutte PM. The endothelium, modulator of cardiovascular function. CRC press, New York 228, 1990.
2. Warrer JB. The endothelium: an introduction to current research. Wiley-Liss, New York 317, 1990.
3. Hertig AT. *Contrib Embryol* 25: 37, 1935.
4. Clark ER, and Clark EL. Microscopic observations on the growth of blood capillaries in the living mammal. *Am J Anat* 64: 251-301, 1939.
5. Pepper MS. Manipulating angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17: 605-619, 1997.
6. Folkman J. Clinical applications of research angiogenesis. *N Engl J Med* 333: 1757-1763, 1995.
7. Sandison JC. Healing. *Anat Rec* 54: 105, 1932.
8. Brown GC, Magargal LE, and Federman JL. Ischaemia and neovascularization. *Trans Ophthalmol Soc* 100: 377-380, 1980.
9. Folkman J, and Klagsbrun M. Angiogenic Factors. *Science* 235: 442-447, 1997.
10. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 285: 1182-1186, 1971.
11. Michaelson IC. The mode of development of the vascular system of the retina with some observations on its significance for certain retinal disorder. *Trans Ophthalmol Soc UK* 68: 137-180, 1998.
12. Ferrara N. Vascular Endothelial Growth Factor: the trigger for neovascularisation in the eye. *Lab Invest* 72: 615-618, 1995.
13. Adamis AP, Miller JW, Bernal M-T, D'Amico D, Folkman J, Yeo T-K, and Yeo KT. Increased vascular endothelial growth factor in the vitreous of eyes with proliferative diabetic retinopathy. *Am J Ophthalmol* 118: 445-450, 1994.
14. Millauer B, Shawver LK, Plate KH, Riseau W, and Ullrich A. Glioblastoma growth is inhibited in vivo by a negative dominant of Flk-1 mutant. *Nature* 367: 576-579, 1994.



15. Kim KJ, Li B, Winer J, Armanini M, Gillett N, and Phillips HS. Inhibition of VEGF-induced angiogenesis suppresses tumor growth in vivo. *Nature* 362: 841-844, 1993.
16. Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, and Dvorak HF. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 219: 983-985.
17. Tisher E, Mitchell R, Hartmann T, Silva M, Gospodarowicz D, Fiddes J, and Abraham J. The human gene for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 266: 11947-11954, 1991.
18. Vincenti V, Cassano C, Rocchi M, Persico G. Assignment of the vascular endothelial growth factor gene to the human chromosome 6p21.3. *Circulation* 93: 1493-1495, 1996.
19. Leung DW, Cachianes G, Kuang W-J, Goedde DV, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 246: 1306-1309, 1989.
20. Keck PJ, Hauser SD, Krivi G, Sanzo K, Warren T, Feder J, and Connolly DT. Vascular endothelial growth factor, an endothelial cell mitogen related to platelet-derived growth factor. *Science* 246: 1309-1312, 1989.
21. Houck KA, Ferrara N, Winer J, Cachianes G, Li B, and Leung DW. The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterisation of alternative splicing of mRNA. *Mol Endocrinol* 51: 1806-1814, 1991.
22. Gitay-Goren H, Soker S, Vlodavsky I, and Neufeld G. The binding of vascular endothelial growth factor to its receptors is dependent on cell surface-associated heparin-like molecules. *J Biol Chem* 267: 6093-6098, 1992.
23. Achen MG, Jeltsch M, Kukk E, Makinen T, Vitali A, Wilks AF, Alitalo K, and Stackman SA. Vascular endothelial growth factor D (VEGF-D) is a ligand for the tyrosine kinases VEGF receptor 2 (Flk1) and VEGF receptor 3 (Flt4). *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 543-548, 1998.
24. Maglione D, Guerriero V, Viglietto G, Delli-Bovi P, and Persico MG. Isolation of a human placenta cDNA coding for a protein related to the vascular endothelial growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 9267-9271, 1991.
25. Ferrara N, and Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endoc Rev* 17: 4-25, 1997.



26. Ahmed A, Dunk C, Kniss D, and Wilkes M. Role of VEGF receptor-1 (Flt-1) in mediating calcium-dependent nitric oxide release and limiting DNA synthesis in human trophoblast cells. *Laboratory Investigations* 76: 779-791, 1997.
27. Pepper MS, Ferrara N, Orci L, Montesano R. Potent synergism between vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in the induction of angiogenesis in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 189: 824-831, 1992.
28. Ferrara N, and Henzel WJ. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 161: 851-858, 1989.
29. Connolly DT, Heuvelam DM, Nelson R, Olander JV, Eppley BL, Delfino JJ, Siegel NR, Leimgruber RM, and Feder J. Tumor vascular permeability factor stimulates endothelial cell growth and angiogenesis. *J Clin Invest* 84: 1470-1478, 1989.
30. Clauss M, Gerlach M, Gerlach H, Brett J, Wang F, Familetti PC, Pan Y-C, Olander JV, Connolly DT, and Stern D. Vascular permeability factor: a tumor-derived polypeptide that induces endothelial cell and monocyte procoagulant activity, and promotes monocyte migration. *J Exp Med* 172: 1535-1545, 1990.
31. Jakeman LB, Winer J, Bennet GL, Altar CA, and Ferrara N. Binding sites for vascular endothelial growth factor are localized on endothelial cells in adult rat tissues. *J Clin Invest* 89: 244-253, 1992.
32. Jakeman LB, Armanini M, Phillips HS, and Ferrara N. Developmental expression of binding sites and mRNA for vascular endothelial growth factor suggests a role for this protein in vasculogenesis and angiogenesis. *Endocrinology* 133: 848-859, 1993.
33. De Vries C, Escobedo JA, Ueno H, Houck KA, Ferrara N, and Williams LT. The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science* 255: 989-991, 1992.
34. Terman BI, Vermazen MD, Carrion ME, Dimitrow D, Armellino DC, Gospodarowicz D, and Bohlen P. Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial growth factor. *Biochem Biophys Res Commun*: 210: 298-305, 1992.
35. Shibuya M, Yamaguchi S, Yamane A, Ikada T, Tojo T, Matsushime H, and Sato M. Nucleotide sequence and expression of a novel human receptor-type tyrosine kinase (flt) closely related to the fms family. *Oncogene* 8: 519-527, 1990.
36. Terman BI, Carrion ME, Kovacs E, Rasmussen BA, Eddy RL, and Shows TB. Identification of a new endothelial cell growth factor receptor tyrosine kinase. *Oncogene* 6: 519-524, 1991.

37. Waltenberger J, Claesson-Welsh L, Siegbahn A, Shibuya M, and Heldin C-H. Different signal transduction properties of KDR and Flt-1, two receptors for the vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 269: 26988-26995, 1994.
38. Seetharam L, Gotoh N, Maru Y, Neufeld G, Yamaguchi S, and Shibuya M. A unique signal transduction pathway for the Flt tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Oncogene* 10: 135-147, 1995.
39. Plate KH, Breier G, Weich H, Mennel HD, and Risau W. Vascular endothelial growth factor and glioma angiogenesis: coordinate induction of VEGF receptors, distribution of VEGF protein and possible in vivo regulatory mechanisms. *Int J Cancer* 59: 520-529, 1994.
40. Brown LF, Berse B, Jackman RW, Tognazzi K, Guidi AJ, Dvorak HF, Senger DR, Connolly JL, and Schnitt SJ. *Human Pathol* 26: 86-91, 1995.
41. Li J, Brown LF, Hibberd MG, Grossman JD, Morgan JP, and Simons M. VEGF, Flk-1 and Flt-1 expression in a rat myocardial infarction model of angiogenesis. *Am J Physiol* 39: H1803-H1811, 1996.
42. Gilbert RE, Vranes D, Berka JL, Kelly DJ, Cox A, Wu LL, Stacker SA, and Cooper ME. Vascular endothelial growth factor and its receptors in control and diabetic rat eyes. *Lab Invest* 78: 1017-1027, 1998.
43. Fong GH, Rossant J, Gertenstein M, and Breitman M. Role of Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulation of assembly of vascular endothelium. *Nature* 376: 66-67, 1995.
44. Shalabi F, Rossant J, Yamaguchi TP, Gertenstein M, Wu X-F, Breitman ML, and Schuh AC. Failure of blood island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature* 376: 62-66, 1995.
45. Kroll J, and Waltenberger J. A novel function of VEGF receptor-2 (KDR): rapid release of nitric oxide in response to VEGF-A stimulation in endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*: 265 636-639, 1999.
46. He H, Venema VJ, Gu X, Venema RC, Marrero MB, and Caldwell RB. Vascular endothelial growth factor signals endothelial cell production of nitric oxide and prostacyclin through Flk-1/KDR activation of c-Src. *J Biol Chem* 274: 25130-25135, 1999.
47. Furchgott RF, and Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288: 373-376, 1980.

48. Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, and Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 9265-9269, 1987.
49. Palmer RM, Ferrige AG, and Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327: 524-526, 1987.
50. Garthwaite J, Charles SL, and Chess-Williams R. Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain. *Nature* 336: 385-388, 1988.
51. Hibbs JB, Vavrin Z, and Taintor RR. L-arginine is required for expression of the activated macrophage effector mechanism causing selective metabolic inhibition in target cells. *J Immunol* 138: 550-565, 1987.
52. Gross SS, and Wolin MS. Nitric oxide: pathophysiological mechanisms. *Annu Rev Physiol* 57: 737-769, 1995.
53. Sessa WC. The nitric oxide synthase family of proteins. *J Vasc Res* 31: 131-143, 1994.
54. Endoh M, Maiese K, and Wagner J. Expression of the inducible form of nitric oxide synthase by reactive astrocytes after transient global ischemia. *Brain Res* 651: 92-100, 1994.
55. Andrew PJ, and Mayer B. Enzymatic function of nitric oxide synthases. *Cardiovasc Res* 43: 521-531, 1999.
56. Nathan CG, and Hibbs JB Jr. Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Curr Opin Immunol* 3: 65-70, 1991.
57. Govers R, and Ravelink TJ. Cellular regulation of endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol, Review* 280: F193-F206, 2001.
58. Vasquez-Vivar J, Kalyanaraman B, Martasek P, Hogg N, Masters BSS, Karoui H, Tordo P, and Pritchard KA. Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 9220-9225, 1998.
59. Wever RMF, van Dam T, van Rijn HJ, de Groot F, and Rabelink TJ. Tetrahydrobiopterin regulates superoxide and nitric oxide generation by recombinant endothelial nitric oxide synthase. *Biochem Biophys Res Commun* 237: 340-344, 1997.
60. Michel JB, Feron O, Sacks D, and Michel T. Reciprocal regulation of endothelial nitric-oxide synthase by Ca<sup>2+</sup>-calmodulin and caveolin. *J Biol Chem* 272: 15583-15586, 1997.

61. Michell BJ, Chen Z-P, Tiganis T, Stapleton D, Katsis F, Power DA, Sim AT and Kemp BE. Coordinated control of endothelial nitric-oxide synthase phosphorylation by protein kinase C and the cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 276: 17625-17628, 2001.
62. Fleming I, Fisslthaler B, Dimmeler S, Kemp BE, and Busse R. Phosphorylation of Thr495 regulates Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-dependent endothelial nitric oxide synthase activity. *Circ Res* 88: e68-e75, 2001.
63. Fulton D, Gratton J-P, McCabe TJ, Fontana J, Fujio Y, Walsh K, Franke TF, Papapetropoulos A, and Sessa WC. Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature* 399: 597-601, 1999.
64. Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, and Zeiher AM. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* 399: 601-605, 1999.
65. Gratton J-P, Fontana J, O'Connor DS, Garcia-Cardena G, McCabe TJ, and Sessa WC. Reconstitution of an endothelial nitric-oxide synthase (eNOS), hsp90, and caveolin-1 complex in vitro. *J Biol Chem* 275: 22268-22272, 2000.
66. McCabe TJ, Fulton D, Roman LJ, and Sessa WC. Enhanced electron flux and reduced calmodulin dissociation may explain "calcium-independent" eNOS activation by phosphorylation. *J Biol Chem* 275: 6123-6128, 2000.
67. Fulton D, Gratton J-P, and Sessa WC. Post-translational control of endothelial nitric oxide synthase: why isn't calcium/calmodulin enough? *J Pharmacol Exp Ther* 299: 818-824, 2001.
68. Papapetropoulos A, Garcia-Cardena G, Madri JA, Sessa WC. Nitric oxide production contributes to the angiogenic properties of vascular endothelial growth factor in human endothelial cells. *J Clin Invest* 100: 3131-3139, 1997.
69. Michell BJ, Griffiths JE, Mitchelhill KI, Rodriguez-Crespo I, Tiganis T, Bozinovski S, Ortiz de Montellano PR, Kemp BE, and Pearson RB. The Akt kinase signals directly to endothelial nitric oxide synthase. *Cur Biol* 9: 845-848, 1999.
70. Thuringer D, Maulon L, and Frelin C. Rapid transactivation of the VEGF receptor KDR/Flk-1 by the bradykinin B2 receptor contributes to eNOS activation in cardiac capillary endothelial cells. *J Biol Chem* 277: 2028-2032, 2001.
71. Brouet A, Sonveaux P, Dessy C, Balligand J-L, and Feron O. Hsp90 ensures the transition from the early Ca<sup>2+</sup>-dependent to the late phosphorylation-dependent activation of the endothelial nitric-oxide synthase in vascular endothelial growth factor-exposed endothelial cells. *J Biol Chem* 276: 32663-32669, 2001.

72. Stamler JS, Simon DI, Osborne JA, Mullins ME, Jaraki O, Michel T, Singel DJ, and Loscalzo J. S-nitrosylation of proteins with nitric oxide: synthesis and characterization of biologically active compounds. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 444-448, 1992.
73. Gardiner SM, Compton AM, Bennett T, Palmer RM, and Moncada S. Regional haemodynamic changes during oral ingestion of NG-monomethyl-L-arginine or NG-nitro-L-arginine methyl ester in conscious Brattleboro rats. *Br J Pharmacol* 101: 10-12, 1990.
74. Vane JR, Anggard EE, and Botting RM. Regulatory functions of the vascular endothelium. *N Engl J Med* 323: 27-36, 1990.
75. Ziche M, Morbidelli L, Masini E, Amerini S, Granger HJ, Maggi CA, Geppetti P, and Ledda F. Nitric oxide mediates angiogenesis in vivo and endothelial growth and migration in vitro promoted by substance P. *J Clin Invest* 94: 2036-2044, 1994.
76. Ziche M, Jones J, and Gullino PM. Role of prostaglandin E1 and copper in angiogenesis. *J Natl Cancer Inst* 69: 475-482, 1982.
77. Ben Ezra D. Neovascuogenic ability of prostaglandins, growth factors and synthetic chemoattractants. *Am J Ophthalmol* 86: 455-461, 1978.
78. Ziada AM, Hudlicka O, Tyler KR, and Wright AJ. The effect of long-term vasodilatation on capillary growth and performance in rabbit heart and skeletal muscle. *Cardiovasc Res* 18: 724-732, 1984.
79. Murohara T, Horowitz JR, Silver M, Tsurumi Y, Chen D, Sullivan A, and Isner JM. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor enhances vascular permeability via nitric oxide and prostacyclin. *Circulation*: 97: 99-107, 1998.
80. Lakshminarayanan S, Antonetti DA, Gardner TW, and Tarbell JM. Effect of VEGF on retinal microvascular endothelial hydraulic conductivity: The role of NO. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41: 4256-4261, 2000.
81. Lal BK, Varma S, Pappas PJ, Hobson RW II, and Duran WN. VEGF increases permeability of the endothelial cell monolayer by activation of PKB/Akt, endothelial nitric-oxide synthase, and MAP kinase pathways. *Microvasc Res* 62: 252-262, 2001.
82. Ku DD, Zaleski JK, Liu S, and Brock TA. Vascular endothelial growth factor induces EDRF-dependent relaxation in coronary arteries. *Am J Physiol* 265: H586-H592, 1993.
83. Ziche M, Morbidelli L, Choudhuri R, Zhang H-T, Donnini S, Granger HJ, and Bicknell R. Nitric oxide synthase lies downstream from vascular growth factor-

induced but not basic fibroblast growth factor-induced angiogenesis. *J Clin Invest* 99: 2625-2634, 1997.

84. Bussolati B, Dunk C, Grohman M, Kontos CD, Mason J, and Ahmed A. Vascular endothelial growth factor receptor-1 modulates vascular growth factor-mediated angiogenesis via nitric oxide. *Am J Physiol* 159: 993-1008, 2001.

85. Morbidelli L, Chang CH, Douglas JG, Granger HJ, Ledda F, and Ziche M. Nitric oxide mediates mitogenic effect of VEGF on coronary venular endothelium. *Am J Physiol* 270: H411-H415, 1996.

86. Laitinen M, Zachary I, Breier G, Pakkanen T, Hakkinen T, Luoma J, Abedi H, Risau W, Soma M, Laakso M, Martin JF, Yla-Herttuala S. VEGF gene transfer reduces intimal thickening via increased production of nitric oxide in carotid arteries. *Hum Gene Ther* 8: 1737-1744, 1997.

87. Giraudet P. *La réaction inflammatoire: physiopathologie, exploration clinique*. Vigot, Paris 260, 1984.

88. Henson PM. Release of vasoactive amines from rabbit platelets induced by antiplatelet antibody in the presence or absence of complement. *J Immunol* 104: 924-934, 1970.

89. Wykle RL, Malone B, and Snyder F. Enzymatic synthesis of 1-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine, a hypotensive and platelet aggregating lipid. *J Biol Chem* 255: 10256-10260, 1980.

90. Barnes PJ, Chung KF, and Page CP. Platelet-activating factor as a mediator of allergic disease. *J Allergic Clin Immunol* 81: 919-934, 1988.

91. Prescott SM, Zimmerman GA, and McIntyre TM. Human endothelial cells in culture produce platelet-activating factor when stimulated with thrombin. *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 3534-3538, 1984.

92. Morley J, Page CP, and Pual W. Inflammatory actions of PAF acether in guinea pig skin. *Br J Pharmacol* 80: 503-509, 1983.

93. Handley DA, Arbeeny CM, Lee ML, van Valen RG, and Saunders RN. Effect of platelet-activating factor on endothelial permeability to macromolecules. *Immunopharmacology* 8: 137-144, 1984.

94. Montrucchio G, Alloatti G, and Camussi G. Role of platelet-activating factor in cardiovascular pathophysiology. *Physiological Reviews* 80: 1669-1699, 2000.

95. Snyder F. *Platelet-activating factor and related lipids*. Plenum Press, New York 471, 1987.

96. Lee T-C, Leniham DJ, Malone B, Roddy L, and Wasserman SI. Increased biosynthesis of platelet-activating factor in activated human eosinophils. *J Biol Chem* 259: 5526-5530, 1984.
97. Albert DH, and Snyder F. Biosynthesis of 1-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine from 1-alkyl-2-acyl-sn-glycero-3-phosphocholine by rat alveolar macrophages. Phospholipase A<sub>2</sub> and acetyltransferase activities during phagocytosis and ionophore activation. *J Biol Chem* 258: 97-102, 1983.
98. Bernatchez PN, Soker S, and Sirois MG. Vascular endothelial growth factor on endothelial cell proliferation, migration, and platelet-activating factor synthesis is Flk-1-dependent. *J Biol Chem* 274: 31047-31054, 1999.
99. Bernatchez PN, Allen BG, Gélinas DS, Guillemette G, and Sirois MG. Regulation of VEGF-induced endothelial cell PAF synthesis: role of p42/44 MAPK, p38 MAPK and PI3K pathways. *Br J Pharmacol* 134: 1253-1262, 2001.
100. Bernatchez PN, Winstead MV, Dennis EA, and Sirois MG. VEGF stimulation of endothelial cell PAF synthesis is mediated by group V 14 kDa secretory phospholipase A<sub>2</sub>. *Br J Pharmacol* 134: 197-205, 2001.
101. Jackson JR, Seed MP, Kircher CH, Willoughby DA, and Winkler JD. The codependence of angiogenesis and chronic inflammation. *FASEB J* 11: 457-465, 1997.
102. Unemori EN, Ferrara N, Bauer EA, and Amento EP. Vascular endothelial growth factor induces interstitial collagenase expression in human endothelial cells. *J Cell Physiol* 153: 557-562, 1992.
103. Sirois MG, and Edelman ER. VEGF effect on vascular permeability is mediated by synthesis of platelet-activating factor. *Am J Physiol* 272: H2746-H2756, 1997.
104. Montrucchio G, Lupia E, Battaglia E, Del Sorbo L, Boccellino M, Emanuelli G, and Camussi G. Platelet-activating factor enhances vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell motility and neoangiogenesis in a murine matrigel model. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20: 80-88, 2000.
105. Effects of platelet activating factor (PAF) and other vasoconstrictors on a model of angiogenesis in the mouse. *Int J Exp Pathol* 73: 503-513, 1992.
106. Yano S, Tokumitsu H, and Soderling TR. Calcium promotes cell survival through CaM-K Kinase activation of the protein-kinase-B pathway. *Nature* 396: 584-587, 1998.
107. Yang C, Watson RT, Elmendorf JS, Sacks DB, and Pessin JE. Calmodulin antagonists inhibit insulin-stimulated GLUT4 (Glucose Transporter 4) translocation by

preventing the formation of phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate in 3T3L1 adipocytes. *Mol Endo* 14: 317-326, 2000.

108. Tokumitsu H, and Soderling TR. Requirements for calcium and calmodulin kinase activation cascade. *J Biol Chem* 271: 5617-5622, 1996.

109. Wu HM, Yuan Y, Zawieja DC, Tinsley J, and Granger HJ. Role of phospholipase C, protein kinase C, and calcium in VEGF-induced venular hyperpermeability. *Am J Physiol* 276: H535-H542, 1999.

110. Chakder S, Bandyopadhyay A, and Rattan S. Neuronal NOS gene expression in gastrointestinal myenteric neurons and smooth muscle cells. *Am J Physiol* 273: C1868-1875, 1997.

111. Toker A, and Newton AC. Cellular signaling: Pivoting around PDK-1. *Cell* 103: 185-188, 2000.

112. Alessi DR, James SR, Downes CP, Holmes AB, Gaffney PR, Reese CB, and Cohen P. Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase  $\beta$ alpha. *Curr Biol* 7: 261-269, 1997.

113. Vanhaesebroeck B, and Alessi DR. The PI3K-PDK-1 connection: more than just a road to PKB. *Biochem J* 346: 561-576, 2000.

114. Toker A, and Newton AC. Akt/protein kinase B is regulated by autophosphorylation at the hypothetical PDK-2 site. *J Biol Chem* 275: 8271-8274, 2000.

115. Storz P, and Toker. 3'-phosphoinositide-dependent kinase-1 (PDK-1) in PI 3-kinase signaling. *Front Biosci* 7: d886-902, 2002.

116. Fontana J, Fulton, Chen Y, Fairchild TA, McCabe TJ, Fujita N, Tsuruo T, and Sessa WC. Domain mapping studies reveal that the M domain of Hsp90 serves as a molecular scaffold to regulate Akt-dependent phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase and NO release. *Circ Res* 90: 866-873, 2002.