

**Direction des bibliothèques**

**AVIS**

Ce document a été numérisé par la Division de la gestion des documents et des archives de l'Université de Montréal.

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

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

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

**NOTICE**

This document was digitized by the Records Management & Archives Division of Université de Montréal.

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

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

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

Université de Montréal

**La protéine adaptatrice Gab1 est requise pour la migration et le réarrangement adéquat du cytosquelette des cellules endothéliales en réponse au VEGF**

Présenté par  
Raphaëlle Stenne



Programme de biologie moléculaire  
Faculté des études supérieures

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
En vue de l'obtention du grade de Maître ès sciences (M.Sc.)



Novembre 2007  
© Raphaëlle Stenné

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé

**La protéine adaptatrice Gab1 est requise pour la migration et le réarrangement adéquat du cytosquelette des cellules endothéliales en réponse au VEGF**

Présenté par

Raphaëlle Stenne

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Anne-Marie Mes-Masson  
Président-rapporteur

Isabelle Royal  
Directeur de recherche

Louise Larose  
Membre du jury

## Résumé français

Le VEGF (*vascular endothelial growth factor*) est un promoteur majeur de l'angiogenèse. Il favorise notamment la survie des cellules endothéliales en induisant l'activation d'un récepteur à activité tyrosine kinase (RTK), le VEGFR2 (*vascular endothelial growth factor receptor*), qui entraîne par la suite une cascade de signalisation médiant la prolifération et la migration cellulaire. Notre laboratoire a antérieurement identifié la protéine adaptatrice Gab1 comme médiateur essentiel de la migration cellulaire et de la formation de capillaires induits par le VEGF. Malgré tout, l'implication de Gab1 dans la réorganisation du cytosquelette induite par le VEGF, étape essentielle de la migration cellulaire, reste inconnue. Nous avons démontré que la protéine adaptatrice Gab1 est essentielle à la réorganisation du cytosquelette d'actine des cellules endothéliales en réponse au VEGF. La déplétion de cette protéine entraîne la perte des lamellipodes normalement observées dans les cellules endothéliales suite à une stimulation au VEGF ainsi qu'une augmentation des fibres de tension dans ces mêmes conditions. L'utilisation d'ARNis ciblant Gab1 semble aussi influencer l'état d'activation des RhoGTPases Rho et Rac. Finalement, l'expression de Gab1 dans les cellules HEK293 potentie l'activation de Rac en aval de VEGFR2. L'expression des mutants de Gab1 dans les HEK293 perturbe la cinétique d'activation de Rac. Notre travail identifie Gab1 comme médiateur de la réorganisation du cytosquelette d'actine des cellules endothéliales en réponse au VEGF.

Mots clés : VEGF, VEGFR2, Gab1, cytosquelette, RhoGTPases, HMVECs, migration.

## Résumé anglais

VEGF (*Vascular endothelial growth factor*) is a major promoter of angiogenesis. In particular, VEGF favors endothelial cell survival by the activation of the VEGFR2 (*Vascular endothelial growth factor*) receptor tyrosine kinase, which induces signaling events that mediate cell migration and proliferation. Our laboratory has identified the adaptor protein Gab1 as an essential mediator of endothelial cell migration and capillary formation in response to VEGF. However, the impact of Gab1 on VEGF dependant-cytoskeletal rearrangement, an essential step of cellular migration, remains unknown. We have demonstrated that the adaptor protein Gab1 is essential for VEGF-induced actin reorganization in endothelial cells. The silencing of Gab1 using small interfering RNAs impairs the lamellipodial formation normally seen in endothelial cells in response to VEGF, while enhancing stress fiber formation. Moreover, the inhibition of Gab1 expression seems to interfere with the activation state of the RhoGTPases Rac and Rho. Finally, expression of Gab1 in HEK293 enhances VEGFR2-dependant Rac1 activation whereas expression of Gab1 mutants perturb Rac1 activation kinetics. Our work thus identifies Gab1 as a regulatory component of actin cytoskeletal reorganization of endothelial cells in response to VEGF.

Key words: VEGF, VEGFR2, Gab1, cytoskeleton, RhoGTPases, HMVECs, migration.

## TABLE DES MATIÈRES

Résumé français.....	ii
Résumé anglais.....	iii
Table des matières.....	iv
Liste des figures.....	vi
Liste des abréviations.....	viii
Remerciements.....	x
Chapitre 1 - INTRODUCTION.....	1
1.1- L'angiogenèse.....	1
1.1.1. Le VEGF est un inducteur de l'angiogenèse normale et pathologique.....	1
1.1.2. Description des facteurs de croissance VEGF et des récepteurs VEGFR.....	4
1.1.3. Voies signalitiques associées au VEGFR2.....	7
1.1.4. Description de la protéine adaptatrice Gab1.....	8
1.2 - La migration cellulaire.....	10
1.2.1. Description des étapes de la migration cellulaire.....	10
1.2.2. Régulation des RhoGTPases.....	12
1.2.3. Régulation des GEFs et des GAPs.....	14
1.3- Cascades de signalisations associées à la migration des cellules endothéliales en réponse au VEGF.....	16
1.4 - Hypothèse de travail.....	18
Chapitre 2 - MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	19
Chapitre 3 - RÉSULTATS.....	24

Chapitre 4 - DISCUSSION.....42

RÉFÉRENCES.....48

## LISTE DES FIGURES

Figure 1.	Étapes de l'angiogenèse tumorale induite par le facteur de croissance VEGF.....	3
Figure 2.	La famille des VEGFRs et leurs ligands spécifiques.....	4
Figure 3.	Représentation de la structure du VEGFR2.....	5
Figure 4.	Rôle et activités biologiques associées aux deux récepteurs du VEGF dans le contexte d'angiogenèse.....	6
Figure 5.	Domaines caractéristiques de la protéine adaptatrice Gab1 et ses principaux partenaires d'interaction.....	8
Figure 6.	Description des étapes clés de la migration cellulaire.....	11
Figure 7.	Mécanisme de régulation des RhoGTPases assurant une réponse biologique adéquate.....	13
Figure 8.	Redistribution de l'actine dans les cellules HMVECs suite à une stimulation au VEGF.....	25
Figure 9.	L'atténuation de l'expression de Gab1 dans les HMVECs entraîne une augmentation des fibres de tension et une diminution de la formation de lamellipodes en réponse au VEGF.....	27
Figure 10.	La surexpression de Gab1 entraîne une augmentation de l'activation de Rac1 en réponse au VEGF.....	29
Figure 11.	La déplétion de Gab1 altère les niveaux d'activation des GTPases Rac et Rho dans les cellules HMVECs en réponse au VEGF.....	31
Figure 12.	L'inhibition de Gab1 n'entraîne pas une fluctuation de l'activité de Rac dans les cellules HMVECs en réponse au VEGF.....	32
Figure 13.	La relocalisation de Rac1 à la membrane est atténuée en absence de Gab1.....	35
Figure 14.	La déplétion de Gab1 dans les cellules endothéliales promouvoit la localisation cytosolique de Vav2.....	37
Figure 15.	La localisation de DOCK180 à la membrane est inhibée en absence de Gab1.....	39



Figure 16. Les mutants de Gab1 entraînent une perturbation de la cinétique d'activation de Rac1 en réponse au VEGF.....	41
---	----

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

BAEC	Bovine aortic endothelial cells
BSA	Bovine serum albumin
CZH1	Conserved zizimin homology domain
DH	Dbl homology
DHR1	DOCK homology region 1
DMEM	Dulbecco's modified eagle's medium
EGF	Epidermal growth factor
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FAK	Focal adhesion kinase
FBS	Fetal bovine serum
FGF	Fibroblast growth factor
GAP	GTPase activating protein
GDI	Guanine nucleotide dissociation inhibitor
GEF	Guanine nucleotide exchange factor
HGF	Hepatocyte growth factor
HIFs	Hypoxia inducible factors
HMVEC	Human microvascular endothelial cells
HRP	Horseradish peroxidase
HSP	Heat shock protein
IL-8	Interleukin-8
LIMK1	LIM kinase1
MAPKAP2/MK2	Mitogen-activated protein kinase kinase activated protein kinase 2
MDCK	Madin-Darby canine kidney
PBS	Phosphate buffered saline
PH	Pleckstrin homology
PIGF	Placenta growth factor
PIP3	Phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate
RTK	Tyrosine kinases receptors
SAPK	Stress activated protein kinase

SFKs	Src family kinases
SH	Src Homology
svVEGF	Snake venom VEGF
TBST	Tris-buffered saline tween 20
TGF	Transforming growth factor
TNF- $\alpha$	Tumor necrosis factor- $\alpha$
VEGF	Vascular endothelial growth factor
Wasp	Wiskott-Aldrich syndrome protein
WAVE2	Wasp family Verprolin-homologous protein

## REMERCIEMENTS

On s'engage dans la maîtrise avec une naïveté et une curiosité semblable à celle d'un enfant arrivant aux portes du merveilleux monde de Walt Disney. Certes la biologie, est un univers peuplé de millions de personnages différents qui tous sont là pour maintenir un équilibre vital ; un peu à l'image de Mickey et Minnie qui assurent le bon fonctionnement de notre imagination nécessaire à notre équilibre mental. Malgré tout, autant cela est enivrant, autant cela est exigeant. Comprendre les rouages de l'intouchable est équivalent à comprendre les règles de l'imagination qui en fait, n'existent peut être même pas. Il s'agit donc d'être capable de garder les deux pieds sur Terre (!!!!) car sinon.....la folie n'est pas si lointaine.....Pour se faire, je tiens à remercier mes inconditionnels parents sans qui, je ne me serais pas posée toutes ces questions.....Ensuite, ma directrice de recherche, Isabelle Royal, qui a su transformer ma naïveté en réalisme pragmatique.....une arme essentielle pour le maintien de l'objectivité et finalement, mes partenaires de labo qui ont su faire perdurer l'atmosphère féérique entourant cette recherche..... !

# Chapitre 1. INTRODUCTION

## 1.1 L'angiogenèse

### 1.1.1 Le VEGF est un inducteur de l'angiogenèse normale et pathologique

L'angiogenèse, le processus de formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de ceux préexistants, est hautement régulée chez les organismes multicellulaires (1-3). En situation normale, elle est associée avec le développement, la réparation des tissus et le système reproducteur féminin (3,4). Lorsqu'il y a perte de régulation, l'angiogenèse peut être augmentée de manière excessive et favoriser le développement de certaines pathologies telles que le psoriasis, les angiomes, l'arthrite rhumatoïde, les rétinopathies et le cancer (3, 5-7). L'existence de facteurs angiogéniques a initialement été postulée suite à l'observation d'une forte néovascularisation induite par la transplantation de tumeurs (8). Il a été par la suite démontré que les tissus normaux pouvaient être une source d'activité angiogénique. Plusieurs molécules ont été impliquées comme régulateurs positifs de l'angiogenèse notamment le FGF (*fibroblast growth factor*), le TGF (*transforming growth factor*), le HGF (*hepatocyte growth factor*), le VEGF (*vascular endothelial growth factor*), le TNF- $\alpha$  (*tumor necrosis factor*), l'angiogénine, l'IL-8 (*interleukin*) et les angiopoïétines.

Le VEGF a été à l'origine identifié comme un facteur de perméabilité vasculaire nommé VPF secrété par des cellules tumorales (9). Par la suite, il a été découvert que le VPF était un facteur de croissance spécifique aux cellules endothéliales, d'où son nom actuel de VEGF (10). Finalement, le rôle fondamental du VEGF dans la vasculogenèse embryonnaire et l'angiogenèse s'est confirmé lors d'études d'inactivation allélique (11, 12).

L'expression de VEGF est augmentée rapidement dans les tissus hypoxiques, fournissant ainsi un mécanisme pour assister la réoxygénation tissulaire en stimulant l'angiogenèse. Ce procédé physiologique est souvent employé par les cellules tumorales pour promouvoir la formation d'un nouveau réseau vasculaire consacré à l'alimentation en oxygène et nutriments des cellules cancéreuses leur permettant ainsi de proliférer et de se métastasier. Ainsi, en réponse à la détection d'un gradient de VEGF secrété par la tumeur, les cellules endothéliales initient la dégradation de la membrane basale. Ce phénomène permet aux cellules endothéliales de proliférer et par la suite de migrer vers la source du stimulus. Finalement, il y a formation de nouveaux capillaires sanguins au site de la tumeur favorisant la croissance de cette dernière ainsi que le développement des métastases (Figure 1). À la lumière de ces connaissances, plusieurs thérapies tumorales basées sur la neutralisation des activités du VEGF à l'aide d'anticorps et de ses récepteurs à la surface des cellules endothéliales à l'aide de petites molécules inhibitrices ont été développées. Malgré tout, une meilleure compréhension de la signalisation induite par VEGF est importante pour préserver les voies de signalisation essentielles à la survie des vaisseaux sanguins dans les tissus normaux en contexte thérapeutique.

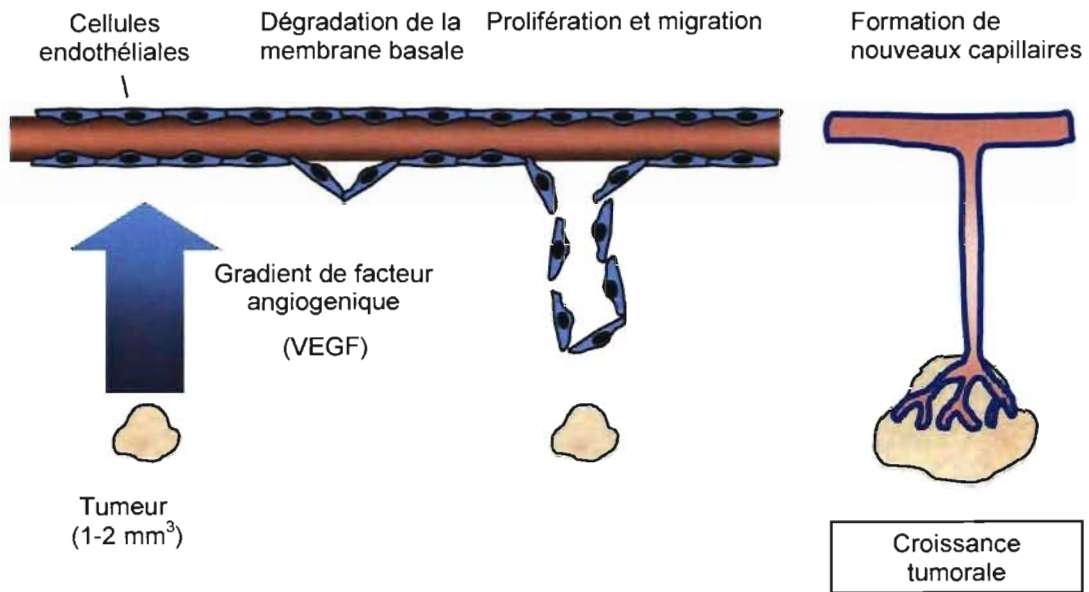


Figure 1. Étapes de l'angiogenèse tumorale induite par le facteur de croissance VEGF.

### 1.1.2. Description des facteurs de croissance VEGF et des récepteurs VEGFR

La famille des VEGF comprend un ensemble de plusieurs gènes soit le PIGF (*placenta growth factor*), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, svVEGF (*snake venom*) et la VEGF-A. Ce dernier est principalement associé avec l'angiogenèse tumorale et indique souvent un mauvais pronostic. Le VEGF-A possède plus de neuf sous-types résultant d'un épissage alternatif d'un seul gène. L'isoforme 165, encore une fois, est la forme qui corrèle le mieux avec la progression tumorale (13). La régulation de l'expression du VEGF-A dépend de plusieurs éléments, notamment du niveau d'oxygène et de la présence de facteur de croissance. Dans un premier temps, une faible dose d'oxygène favorise l'expression de l'ARN messager du VEGF-A via la stabilisation d'HIFs (*hypoxia inducible factors*) qui lient spécifiquement des éléments promoteurs présents dans la région promotrice du VEGF-A (14). Ce facteur de croissance induit plusieurs activités biologiques, notamment la survie, la prolifération, la migration et la perméabilité des cellules endothéliales. Ces activités sont médiées suite à l'activation de deux récepteurs spécifiques, soient le VEGFR1 et le VEGFR2, qui sont tous deux retrouvés à la surface des cellules endothéliales (Figure 2).

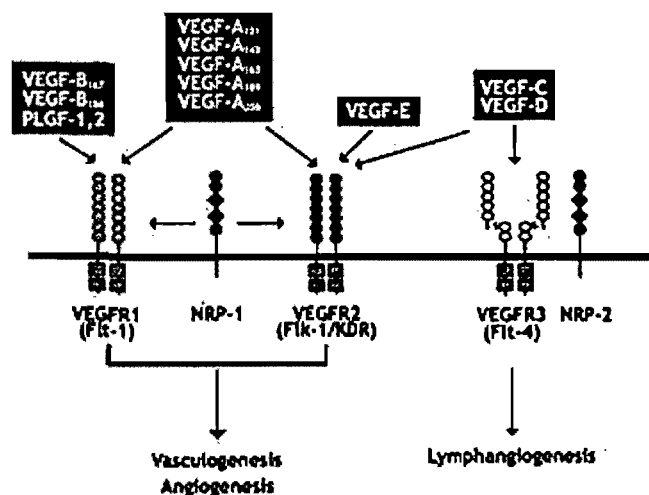


Figure 2. La famille des VEGFRs et leurs ligands spécifiques.



Ces récepteurs font parties de la famille des récepteurs tyrosine kinases (RTKs) et sont composés d'un domaine extracellulaire contenant 7 domaines immunoglobulines, d'une région transmembranaire et d'une portion intracellulaire incluant une séquence consensus tyrosine kinase interrompue par une insertion (15, 16) (Figure 3).

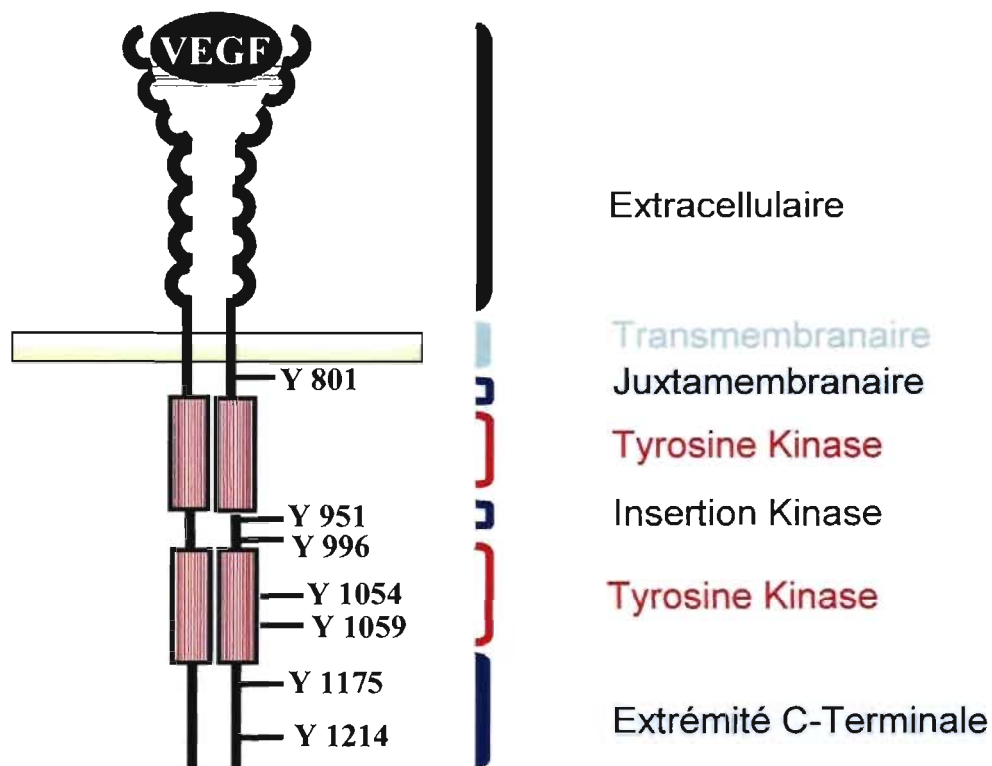


Figure 3. Représentation de la structure du VEGFR2

Le VEGFR3 est aussi retrouvé dans cette famille sans être un récepteur pour le VEGF-A (17). En plus des VEGFR1 et 2, le VEGF-A interagit aussi avec des corécepteurs, les neuropilines. Plusieurs études ont démontré que les VEGFR1 et 2 sont essentiels au niveau du développement ; l'ablation génétique de VEGFR2 est caractérisée par une absence de vasculogénèse tandis que celle de VEGFR1 entraîne une croissance excessive des cellules endothéliales (18-21). L'hyperprolifération de ces cellules ne semble pas être médiée via le domaine kinase du VEGFR1 puisque la délétion de ce dernier n'entraîne aucun impact sur le développement. Ainsi, dans le cadre de l'angiogenèse, le VEGFR1 servirait de régulateur négatif du VEGFR2 en faisant compétition à ce dernier pour le ligand, VEGF-A, tandis que le VEGFR2 serait le principal médiateur de la signalisation

des phénomènes biologiques (prolifération, migration, invasion, survie) des cellules endothéliales. L'activité de ces récepteurs est donc régulée par la disponibilité des ligands (figure 4).

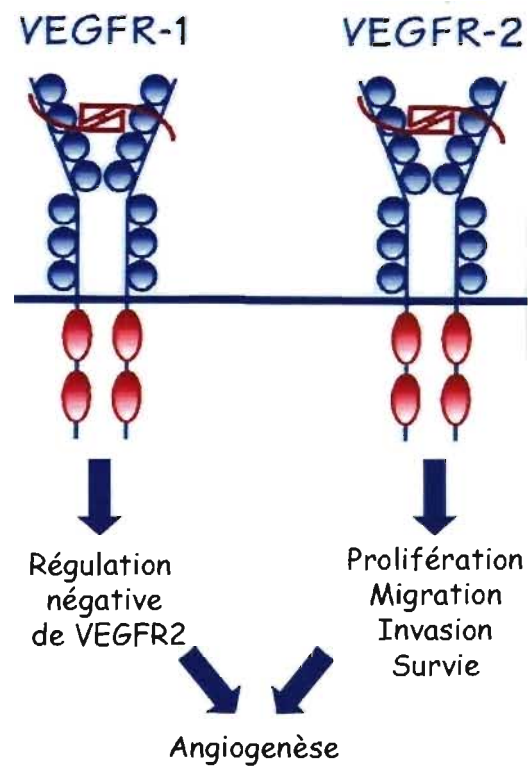


Figure 4. Rôle et activités biologiques associées aux deux récepteurs du VEGF-A dans le contexte d'angiogenèse.

### 1.1.3. Voies de signalisation associées au VEGFR2

L'activation du VEGFR2 résulte d'un changement de conformation, conséquence de la liaison avec le VEGF, qui entraîne l'autophosphorylation de plusieurs sites incluant la Tyr1054 et la Tyr1059 retrouvées dans la boucle d'activation du domaine kinase, la Tyr951 et la Tyr996 situées dans l'insertion du domaine kinase et la Tyr1175 ainsi que la Tyr1214 localisées dans la queue C-terminale (23-27). Ces sites phosphorylés stimulent ensuite l'activation d'une cascade de signalisation menant à la promotion de la prolifération, de la migration et de la survie des cellules endothéliales (Figure 4).

La plupart des effets biologiques du VEGF (l'appellation VEGF est utilisée pour signifier VEGF-A) ont été associés à la stimulation du VEGFR2. Notamment, la croissance des cellules endothéliales a lieu suite à l'activation de la PLC $\gamma$  et de la voie des MAPKs en réponse à une stimulation au VEGF. Les effets de survie du VEGF sur les cellules endothéliales impliquent l'activation de la voie PI3K-Akt (28). Cette voie est aussi impliquée dans l'activation de la protéine eNOS, qui est associée au phénomène de perméabilité causé par le VEGF, ainsi que dans l'activation de la protéine kinase FAK (*focal adhesion kinase*). De plus, le VEGF induit dans les cellules endothéliales la phosphorylation des protéines de la famille de Src (29), des protéines adaptatrices Grb2, Shc, Shb et VRAP/Tsad, de la tyrosine phosphatase SHP2 (29,30) et de la sérine/thréonine kinase p38 (31-35). Malgré tout, les interactions moléculaires avec VEGFR2 responsables de l'initiation de certaines chaînes de signalisation dont celles menant à l'activation de la PI3K demeurent vagues. Dans ce contexte, des études de notre laboratoire se sont penchées sur l'implication potentielle d'une protéine adaptatrice Gab1 reconnue comme modulateur des voies MAPK et PI3K (36). De même qu'une récente publication de notre laboratoire a démontré le rôle critique de Gab1 dans la promotion de la voie PI3K, ERK, de la migration et de la formation de capillaires en réponse au VEGF (37).

### 1.1.4. Description de la protéine adaptatrice Gab1

L'ADNc qui code pour la protéine Gab1 a été cloné suite à une étude de détection de protéines phosphorylées liant Grb2 en réponse à l'EGF (*epidermal growth factor*) et l'insuline (38). Gab1 a aussi été identifié comme médiateur de la morphogénèse épithéliale et la formation de tubules rénaux suite à l'activation du récepteur Met/HGF (*hepatocyte growth factor*) (39). L'ablation de la protéine Gab1 entraîne la létalité au niveau embryonnaire et cause des défauts majeurs dans le développement du placenta, du cœur, de la peau et des muscles (40). D'un point de vue structural, Gab1 possède un domaine PH (*pleckstrin homology*) lui permettant d'interagir avec des lipides membranaires spécifiques, les PIP3 (*phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate*) dérivés de l'activité de la kinase PI3K. Cette protéine possède aussi un certain nombre de régions riches en tyrosines et en prolines qui permettent son interaction avec les domaines SH (*Src Homology*) 2 et 3 des molécules de signalisation telles que Grb2, PI3K, PLC $\gamma$  et SHP2 (Figure 5).

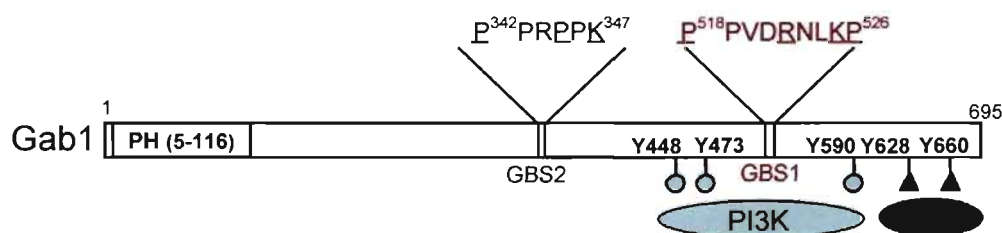


Figure 5. Domaines caractéristiques de la protéine adaptatrice Gab1 et ses principaux partenaires d'interaction.

Suite à l'activation du récepteur VEGFR2, Gab1 est phosphorylée sur tyrosine et sert ainsi de molécule d'amarrage pour l'assemblage de complexes multiprotéiques. Gab1 a été décrit comme un activateur critique des voies PI3K/Akt et SHP2/ERK1/2 dans plusieurs systèmes biologiques et il s'agit d'un important acteur dans plusieurs processus biologiques induits par les RTKs tels que la survie cellulaire, la différenciation et la morphogénèse (36, 41-43). Il a été démontré qu'en réponse au HGF, Gab1 a la capacité de médier l'activation d'ERK1/2 et la PI3K et qu'elle est nécessaire à la formation de

tubules par les cellules MDCK (*Madin-Darby canine kidney*) cultivées dans des gels de collagène (44-46). De plus, il a été démontré que Gab1 était impliquée dans la médiation d'événements biologiques et biochimiques induits par le VEGF via son association avec le récepteur VEGFR2 dans les cellules endothéliales (37). En effet, Gab1 promouvoit l'activation optimale des voies de signalisation essentielles à la réponse angiogéniques des cellules endothéliales (PLC $\gamma$ , ERK1/2, Src et Akt). De plus, notre laboratoire a démontré son importance dans la médiation de la migration des cellules endothéliales en réponse au VEGF, une étape cruciale dans le processus de l'angiogénèse. La surexpression de Gab1 potentialise la migration *in vitro* des cellules BAE dans les chambres de Boyden en réponse au VEGF ainsi qu'en réponse au HGF. D'autre part, l'inhibition spécifique de l'expression Gab1 via l'utilisation d'ARNi bloque la migration induite par le VEGF dans l'essai de la chambre de Boyden ainsi que dans le contexte d'égratignure des cellules HMVEC (*human microvascular endothelial cells*). De plus, la protéine adaptatrice Gab1, dont le domaine de liaison à la protéine SHP2 ou PI3K ont été respectivement supprimés, inhibe la migration *in vitro* des cellules BAE en réponse au VEGF comparativement à la protéine sauvage, démontrant le rôle crucial de ces 2 protéines associées. PI3K et SHP2 étant impliqués dans l'activation des voies Akt et MAPK, nos résultats suggèrent que Gab1 médie la migration des cellules endothéliales en réponse au VEGF principalement via l'activation de ces deux voies.

## 1.2 La migration cellulaire

### 1.2.1. Description des étapes de la migration cellulaire

Dans les organismes multicellulaires, la migration cellulaire est essentielle au développement normal et est requise pour répondre aux dommages tissulaires et aux infections tout au long de la période d'une vie. La migration cellulaire est aussi présente dans les maladies chroniques humaines telles que le cancer, l'athérosclérose et dans les maladies inflammatoires chroniques telle l'arthrite rhumatoïde. Ainsi, la prévention de la migration de certains types cellulaires pourrait inhiber de façon significative la progression de ces maladies. La migration cellulaire est un phénomène qui peut être décomposé en cinq grandes étapes dont la plupart sont régulées par un membre spécifique de la grande famille des RhoGTPases (Figure 6) (47). La première étape consiste en la formation de petites protrusions cellulaires (filopodes). Ces protrusions permettent à la cellule de « sentir » son environnement, ce qui lui donne ensuite la possibilité de définir la direction de son mouvement. Cette étape est généralement régulée par la RhoGTPase Cdc42. Ensuite, une fois la direction du mouvement établie, il y a formation d'un nouveau type de protrusions cellulaires, les lamellipodes, dans l'orientation choisie. Cette étape est régulée par la RhoGTPase Rac. En troisième lieu, il y a formation de nouveaux points d'attachement entre le sommet de la protrusion et la matrice extracellulaire. Cette étape, contrairement aux autres, n'est pas régulée par une RhoGTPase spécifique mais plutôt par des effecteurs activés par ces petites molécules. Quatrièmement, il y aura contraction de la cellule via la formation de fibres de tension sous le contrôle de la RhoGTPase Rho. Finalement, avant le déplacement complet, il y a dissolution des points d'attachement situés à l'arrière de la cellule et rétraction de la queue cellulaire vers le nouveau point d'attachement grâce aux câbles formés à l'étape précédente. Cette étape n'est pas régulée par une RhoGTPase spécifique mais par plusieurs effecteurs tels que PAK, PIX, paxillin, FAK, Src et la famille de protéines GIT. Jusqu'à maintenant le comportement migratoire d'une cellule semble dépendre de la balance entre Rho et Rac. Étant donné que la force d'attachement de la cellule à la matrice extracellulaire corrèle avec une activité de Rho élevée (48) et que Rac induit le

renouvellement des points d'adhésions focales directement par l'activation de PAK (49) et indirectement en bloquant l'activation de Rho (50), l'inhibition de la migration pourrait résulter d'un trop fort attachement de la cellule à la matrice pouvant être causé par un déficit de la balance Rho/Rac.

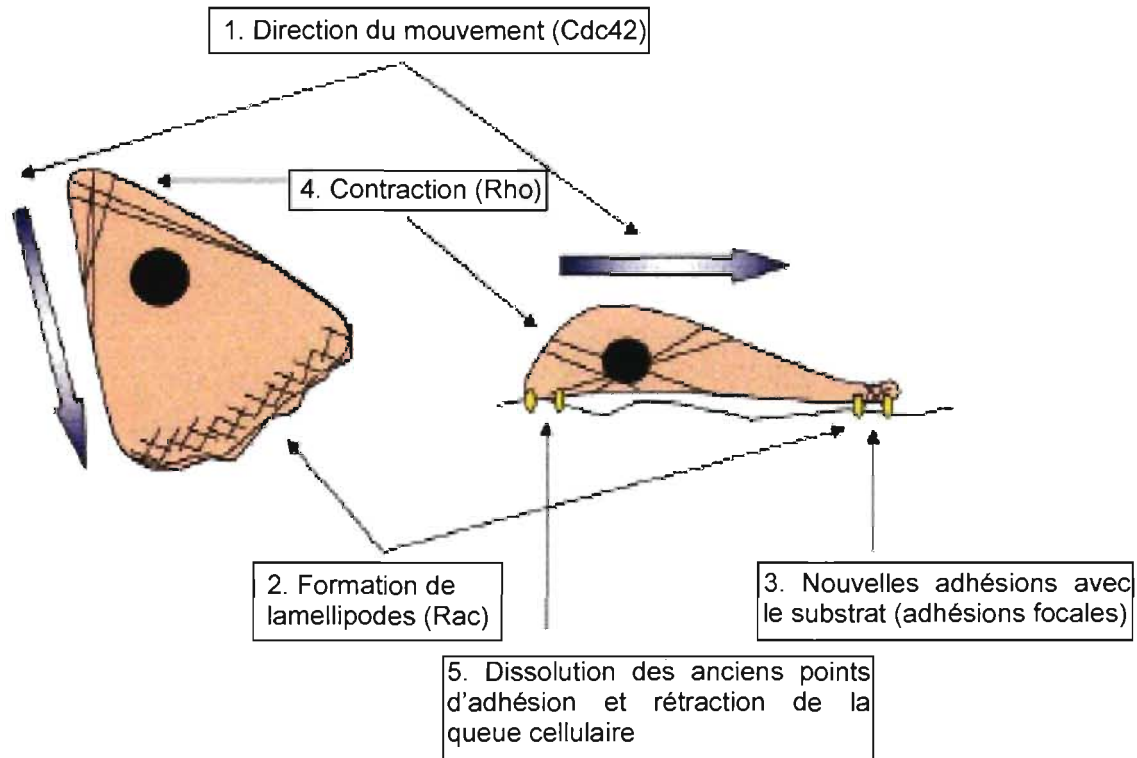


Figure 6. Description des étapes clés de la migration cellulaire  
Tirée de : [www.ircm.qc.ca/Nathalie Lamarche](http://www.ircm.qc.ca/Nathalie%20Lamarche).

### 1.2.2. Régulation des RhoGTPases

Les RhoGTPases sont régulées par trois familles de protéines, soit les GEFs (*guanine nucleotide exchange factor*), les GAPs (*GTPase activating protein*) et les GDIs (*Rho guanine nucleotide dissociation inhibitors*) et, jusqu'à présent, plus de 85 GEFs et 70 GAPs ont été répertoriées (51). De façon générale, les RhoGTPases se retrouvent sous deux formes : sous forme active quand elles sont liées au GTP, ou sous forme inactive lorsque liées au GDP (Figure 7). D'une part, les GEFs interagissent avec la forme inactive et catalysent la dissociation du GDP, ce qui permet la liaison du GTP. Cette interaction peut par contre être inhibée si la RhoGTPase, dans son état inactif, est liée à un GDI (52). Spécifiquement, les GDIs contrôlent le partitionnement des GTPases entre le cytosol et les compartiments membranaires (53). La liaison au GTP induit un changement structural de la GTPase ce qui lui permet d'interagir avec des protéines effectrices situées en aval. Dans plusieurs cas, la liaison du GTP à la GTPase cause la dissociation de la GEF, ce qui lui permet de promouvoir l'échange du phosphate GDP-GTP sur plusieurs RhoGTPases (54).

À l'opposé, les GAPs permettent aux GTPases de revenir sous leurs formes inactives car elles stimulent l'activité GTPase intrinsèque des RhoGTPases, ce qui entraîne l'hydrolyse d'un phosphate et donc la transformation du GTP en GDP (55, 56). Généralement, une dérégulation de l'état d'activation des RhoGTPases est plus souvent associée à l'activation d'une GEF plutôt qu'à l'inactivation d'une GAP.



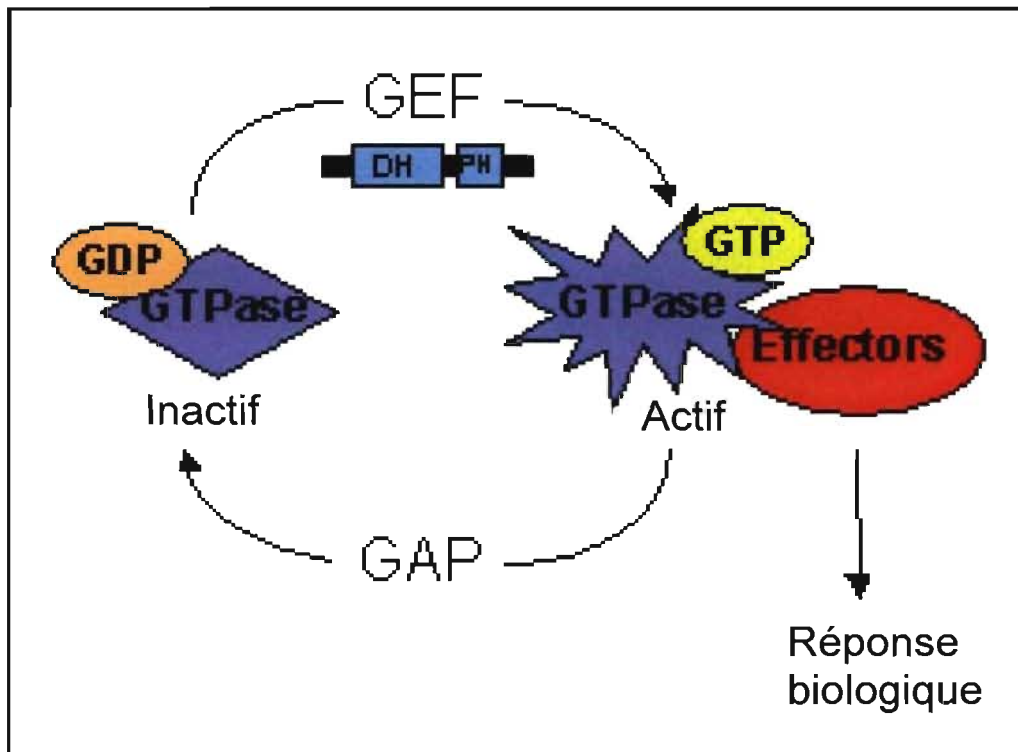


Figure 7 : Mécanisme de régulation des RhoGTPases assurant une réponse biologique adéquate

Tirée de : [forum.crbm.cnrs.fr/~debant/pics/GEF.gi](http://forum.crbm.cnrs.fr/~debant/pics/GEF.gi)

### 1.2.3. Régulation des GEFs et des GAPs

À leur tour, les GEFs et les GAPs sont elles aussi régulées. Il existe aujourd'hui deux familles de GEFs, soit la famille Dbl qui est la mieux caractérisée, et la famille Zizimin-1/DOCK180. Les GEFs de la famille Dbl possèdent un domaine PH et un domaine DH (*Dbl homology*) médiant l'activité GEF, ainsi que plusieurs domaines fonctionnels ou d'interaction protéiques servant d'échafaudage en facilitant la connexion des GTPases actives avec leurs effecteurs (56-58). Le domaine PH est essentiel au recrutement des GEFs aux zones membranaires riches en PIP<sub>3</sub>, résultat de l'activation de la PI3K, où elles vont être en mesure d'interagir avec leur substrat (GTPase). La présence des phospholipides membranaires représente donc une forme de régulation des GEFs.

Un autre mécanisme de régulation est la phosphorylation sur tyrosine en réponse à différents facteurs solubles. Ce mécanisme a été observé pour plusieurs GEFs, notamment pour Vav2. Cette protéine possède plusieurs substrats (Rac et Rho) et peut être phosphorylée sur tyrosine de façon intégrine dépendante. Par contre, il semblerait que ces sites de phosphorylation réguleraient de façon différentielle (activation ou répression) son statut (59,60).

Une autre famille de GEF contenant 11 membres, soit les DOCK, a aussi été caractérisée. Les membres de cette famille possèdent non pas les domaines PH et DH mais plutôt des domaines CZH1/DHR1 (*conserved zizimin homology domain/DOCK homology region*) et CZH2/DHR2. Le domaine CZH2/DHR2 est l'unité fonctionnelle car elle catalyse l'activité d'échange de nucléotide des substrats GTPases (61,62). Contrairement à la famille Dbl, dont les membres ne sont pas retrouvés chez les plantes, les membres de Zizimin-1/DOCK180 sont retrouvés chez les champignons, les plantes et les animaux (63,64). Trois membres de cette famille, DOCK180, DOCK2 et 3, ont la capacité d'activer Rac dans un contexte de régulation d'adhésion cellulaire, d'étalement, de migration et de phagocytose (63-65). De plus, la protéine DOCK180 présente aussi une activité GEF ciblant Cdc42 (54).

Les GAPs sont aussi régulées via plusieurs mécanismes : les interactions protéiques, la phosphorylation et la translocation membranaire. Elles ont la spécificité de

pouvoir induire l'activité GTPase intrinsèque des RhoGTPases. P190 RhoGap est jusqu'à présent la GAP la mieux connue. Cette GAP a une expression ubiquitaire et est composée d'un domaine de liaison au GTP en N-terminal, d'un domaine central similaire aux récepteurs glucocorticoïdes et d'un domaine GAP en C-terminus (66). Elle serait activée par phosphorylation ce qui lui permettrait d'inactiver RhoA suite à l'adhésion de la cellule à la matrice (67,68). Une autre forme de régulation lui est aussi attribuée ; la présence de lipides tels que les phosphatidylsérines et les phosphatidylinositols à la membrane semblerait dicter sa spécificité vers Rac ou Rho (69).

### 1.3 Cascades de signalisations associées à la migration des cellules endothéliales en réponse au VEGF

Comme mentionné précédemment, le VEGF est un important inducteur de la migration des cellules endothéliales. Malgré tout, peu de voies de signalisation menant à l'activation des Rho GTPases en aval de ce facteur de croissance sont connues. L'effet des RhoGTPases Rho, Rac et Cdc42 a été étudié quant à leur capacité à induire une réorganisation de l'actine ainsi que la migration en réponse au VEGF. Jusqu'à présent, Rac1 a été associée à plusieurs phénomènes soit la régulation de l'expression génique, la progression du cycle cellulaire et le réarrangement du cytosquelette d'actine (70). De plus, il a été démontré que Rac1 est essentielle à l'induction de la migration en réponse au VEGF contrairement aux autres GTPases. Également, une étude rapporte que Rac serait activée en amont d'Akt (71), ce qui suggère un mécanisme d'activation indépendant des lipides PIP3 (activation de la PI3K). La formation de fibres de tension et la migration des cellules endothéliales en réponse au VEGF serait par ailleurs le résultat de deux mécanismes indépendants : le premier impliquerait l'activation de Cdc42 et entraînerait l'activation de p38/SAPK (*stress activated protein kinase*) 2. P38 phosphorylerait ensuite HSP (*Heat shock protein*) 27, un facteur de polymérisation d'actine, le tout résultant en un remodelage de l'actine en fibres de tension (72). Le deuxième impliquerait la phosphorylation de FAK (*focal adhesion kinase*), un substrat de RhoA impliqué dans l'assemblage de nouveaux points d'adhésion, de manière HSP90 dépendante (72). Similaire à l'étude précédente, une autre publication du même groupe rapporte l'implication de p38 dans l'induction de la migration des cellules endothéliales en réponse au VEGF. En complément, elle a démontré que la protéine HSP27 est phosphorylée par la MAPKAP 2/MK2 (*mitogen-activated protein kinase kinase activated protein kinase 2*), une cible de la p38 (73). Un autre groupe de recherche rapporte aussi la présence d'un mécanisme complémentaire impliquant l'activation de la LIMK1 (*LIM kinase1*), une cible de la MK2, entraînant aussi la phosphorylation et donc l'activation de la cofilin, le tout menant également à la formation de fibres de tension et la migration cellulaire (74)

Une autre protéine s'est avérée importante dans la migration induite par le VEGF: WAVE2 (*Wasp-Wiskott-Aldrich syndrome protein family Verprolin-homologous protein*). Cette protéine est un substrat de Rac et est essentielle à la polymérisation d'actine et par conséquent à la formation de lamellipodes. Il a été rapporté que les cellules endothéliales déficientes en WAVE2 étaient incapables de former des lamellipodes dans la direction du mouvement cellulaire et qu'elles ne s'organisaient pas en capillaires, un indice important pointant un dysfonctionnement dans la migration. L'absence de WAVE 2 n'affecte cependant pas la polarisation des cellules. (75)

À nouveau, une autre GTPase faisant cette fois-ci partie de la grande famille des RasGTPases, est également requise dans l'induction de la migration des cellules endothéliales induite par le VEGF. En effet, un mutant de ARF6 semble bloquer ce phénomène en chambre de Boyden. Quoique le mécanisme menant à cet effet reste méconnu, ARF6 semblerait être impliqué dans l'activation de Rac de façon VEGF dépendante ainsi qu'à la phosphorylation maximale du VEGFR2 (76).

Une autre famille de protéines, les SFKs (*Src family kinases*), est essentielle à la migration des cellules endothéliales en réponse au VEGF. L'inhibition de l'expression de Yes via la transfection d'ARNi bloque de façon significative la migration, contrairement à la déplétion de Fyn qui semble la promouvoir. Finalement, l'inhibition des trois kinases (Src, Fyn et Yes) altère considérablement ce phénomène (77).

Pour terminer, une molécule initialement impliquée dans la guidance axonale a été associée à la migration des cellules endothéliales comme régulateur négatif. Cette étude suggère que la sémaphorine4 réprime la migration des cellules endothéliales induite par le VEGF via la régulation négative de Rac (78).

## 1.4. Hypothèse de travail

Étant donné le rôle critique joué par les RhoGTPases dans la régulation de la migration des cellules endothéliales en réponse au VEGF, nous avons postulé que la protéine adaptatrice Gab1 pourrait être impliquée dans la médiation de la réorganisation du cytosquelette d'actine et l'activation des RhoGTPases. Par cette étude, nous démontrons qu'une inhibition de Gab1 vient perturber les changements du cytosquelette induits par le VEGF. De plus, nous proposons que ces effets observés pourraient être le résultat d'une dérégulation de la RhoGTPase Rac1 qui a été préalablement démontrée comme étant activée par le VEGF. De façon consistante avec ces observations, nos résultats démontrent un rôle critique de Gab1 dans le phénomène d'activation des RhoGTPases ainsi que de la réorganisation du cytosquelette d'actine dépendants du VEGF dans les cellules endothéliales

## Chapitre 2. Matériel et méthodes

### *Anticorps et Réactifs*

Les anticorps reconnaissants Gab1 et Myc ont été obtenus d'Upstate/GE Healthcare. L'anti-phosphotyrosine PY99, VEGFR2 (clone A3 pour l'immunodétection) et RhoA ont été achetés chez Santa Cruz Biotechnology, Inc. L'anticorps HA a été obtenu de BAbco. L'anticorps Rac1 provient de chez BD Transduction Laboratories. Les anticorps Vav2 et DOCK180 proviennent respectivement des laboratoires du Dr. Sarita Sasty (Sealy Center for Cancer Cell Biology, University of Texas, Galveston) et du Dr. Jean-François Côté (IRCM, Montréal). L'anti-lapin et l'anti-souris conjugués à la horseradish peroxidase (HRP) proviennent de chez Cell Signaling Technology Inc. Le VEGF et le CSF ont été achetés chez R&D Systems.

### *Culture Cellulaire*

Les cellules endothéliales microvasculaires humaines (HMVEC) (passages 3-7; Clonetics/Cambrex) ont été cultivées dans du EBM-2 complété avec 5% de sérum fœtal bovin (FBS), EGF, VEGF, FGF, héparine, IGF-1, hydrocortisone et acide ascorbique (EGM-2-MV bullet kit; Clonetics/Cambrex). Les cellules HEK 293 ont été cultivées dans du DMEM high glucose (Invitrogen) contenant 10% de FBS (Invitrogen) et 50 µg/ml de gentamycine.

### *Vecteurs d'expression*

Les vecteurs encodant le cDNA sauvage de souris Gab1 marqué de l'épitope HA (dans le plasmide pCDNA 1.1) ainsi que les mutants HA-Gab1 $\Delta$ PI3K (Y448F/Y473F/Y590F) (gracieuseté du Dr. Morag Park, McGill University, Montréal, Canada) et HAGab1 $\Delta$ SHP2 (Y628F/Y660F) ont été décrits précédemment (44,37,79). Le vecteur encodant le récepteur chimérique CSF-VEGFR2 (dans le plasmide pShuttle-CMV) a été généré au laboratoire tel que décrit (44) et les vecteurs pRK5-MycRacV12 et pRK5-MycRacG12 ont été obtenus du Dr. Nathalie Lamarche-Vane (McGill University).

### *Transfection d'ADN, stimulation et lyse cellulaire*

Les cellules HEK293 ( $9 \times 10^5$  à  $1 \times 10^6$ ) ont étéensemencées et transfectées 24h plus tard avec 10  $\mu\text{g}$  de CSF-VEGFR2 et 5  $\mu\text{g}$  de vecteur vide (pcDNA1.1) ou de HAGab1 de type sauvage ou muté en utilisant la méthode de précipitation à l'aide du calcium phosphate. Les cellules ont été cultivées en absence de sérum le lendemain pour environ 16h. Les cellules ont ensuite été incubées avec du CSF (50ng/ml) à 37°C pour les temps indiqués puis lavées avec du PBS contenant 1mM de sodium vanadate (Nav). Les cellules ont été par la suite lysées dans 500  $\mu\text{l}$  de solution contenant 50 mM HEPES, 150 mM NaCl, 10% (v/v) glycérol, 0.5% (v/v) Triton X-100, 0.5% (v/v) Nonidet P-40, 1 mM phénylméthylsulfonyl fluoride, 1 mM sodium vanadate, 5 mM fluorure de sodium, 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  aprotinine et 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  leupeptine (Roche Applied Science).

### *Transfection d'ARNi*

Les HMVECs ( $6.1 \times 10^5$ ) ont étéensemencées dans des plats de 60 mm le jour précédent la transfection. Une combinaison de 4 oligos contrôles non spécifiques et 4 oligos ciblant Gab1 (Smart Pools) ont été achetés chez Upstate/Dharmacon. Les transfections d'ARNi (200 nM de concentration finale) ont été effectuées dans du DMEM high glucose à l'aide des réactifs Targefect selon les recommandations du manufacturier (Targeting Systems Inc). Après 2h d'incubation, les cellules ont été rincées deux fois au PBS et ensuite incubées dans du milieu complet EBM-2 (complémenté avec le bullet kit EGM-2-MV) pour 48h. Ensuite, les cellules ont été sevrées dans du milieu EBM pendant 4hrs et utilisées pour des analyses biochimiques ou soumises à des essais d'ELISA.

### *Immunobuvardage de type Western*

Les protéines précipitées ou les extraits protéiques totaux (40-50  $\mu\text{g}$ ) ont été séparés par SDS-PAGE et transférés sur des membranes de nitocellulose Hybond ECL (Amersham Biosciences). Les membranes ont été bloquées dans une solution de 3% (p/v) d'albumine de sérum bovin (BSA) dans du TBST (10 mM Tris-HCL pH 7.4, 2.5 mM EDTA, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20) pour 1h (ou selon les spécificités recommandées pour chaque anticorps). Les protéines ont été détectées par immunobuvardage de type Western avec les anticorps primaires appropriés et les anticorps secondaires correspondants conjugués à



la HRP en utilisant la solution de détection ECL ou Lumilightplus selon les recommandations du manufacturier (Amersham Biosciences ou Roche Applied Science respectivement).

### *Immunofluorescence*

Les HMVECs ont été transfectées avec des ARNi comme décrit ci-haut. Les cellules ( $7.5 \times 10^4$ ) ont étéensemencées sur des lamelles recouvertes de gélatine 24h post transfection. Le lendemain, les cellules ont été sevrées dans du milieu EBM, 4h avant la stimulation au VEGF (10 ng/ml). Les cellules ont été par la suite fixées dans la formaldéhyde 3.7% (diluée dans du PBS 1x) pendant 10 min et perméabilisées dans 0.05% triton X-100/PBS 1x pendant 15 min. Elles ont ensuite été incubées pendant 30 min avec de la phalloïdine (1 :150) conjuguée au fluorochrome Alexa Fluor 546 (Molecular Probes, Invitrogen) pour la détection des filaments d'actine ou pendant 1 heure avec l'anticorps ciblant Vav2, DOCK180 ou Rac1 (1 :150). Les lamelles servant à la détection de filaments d'actine ont ensuite été lavées et montées à l'aide du réactif Prolong antifade contenant du 4', 6-diamidino-2-phenylindole (Molecular Probes), tandis que les autres ont été incubées pendant 30 minutes avec l'anticorps secondaire couplé au fluorochrome Alexa 488 pour DOCK180 et Vav2 ou Cy3 (1:1000) pour Rac1 avant d'être aussi fixées et montées. Les cellules ont été photographiées avec une caméra Olympus Q-Color CCD reliée au logiciel QCapture imaging system via un microscope Olympus BX51.

### *Préparation de protéines de fusion GST-CRIB*

Le domaine de la protéine PAK liant la GTPase Rac sous sa forme active (domaine CRIB) a été produit sous forme de protéine fusionnée à la GST dans la bactérie *Escherichia coli*. Les cellules transformées ont été cultivées pendant environ 3h30 jusqu'à l'obtention d'une  $DO_{600}$  de 0.5. Ensuite, les cellules ont été incubées pendant 3 heures à 37°C avec 0.1 mM d'isopropyl  $\beta$ -D-thiogalactopyranoside. Les cellules ont été lavées et resuspendues dans une solution de 100 mM Tris pH8, 100 mM NaCl et 1mM EDTA et soniquées. Après la sonication, les lysats ont été clarifiés par centrifugation et des aliquots de 500  $\mu$ l de surnageant ont aussitôt été congelés sur glace sèche et rangés à -80°C. L'équivalent de 15 $\mu$ g de GST-CRIB a ensuite été couplé à 30  $\mu$ l de billes de

sépharose couplées au glutathion à 4°C pour chaque échantillon de cellules à être testé. Après 30 min, les billes ont été lavées trois fois avec du tampon de lyse (50 mM HEPES, 150 mM NaCl, 10% (v/v) glycérol, 0.5% (v/v) Triton X-100, 0.5% (v/v) Nonidet P-40, 1 mM phénylméthylsulfonyl fluoride, 1 mM sodium vanadate, 5 mM fluorure de sodium, 10 µg/ml aprotinine et 10 µg/ml leupeptine) et utilisées pour l'essai d'activation de Rac1.

#### *Essai d'activation de la GTPase Rac1*

Quarante heures après la transfection, les cellules HEK293 ont été stimulées puis lavées à l'aide de PBS/Nav 1mM froid et lysées dans du tampon de lyse froid (50 mM HEPES, 150 mM NaCl, 10% (v/v) glycérol, 0.5% (v/v) Triton X-100, 0.5% (v/v) Nonidet P-40, 1 mM phénylméthylsulfonyl fluoride, 1 mM sodium vanadate, 5 mM fluorure de sodium, 10 µg/ml aprotinine et 10 µg/ml leupeptine). Les lysats ont été clarifiés par centrifugation et 0.8-1.1 mg de protéines ont été incubées pendant 45 min à 4°C avec 15 µg de protéines de fusion GST-PAK CRIB couplées à des billes GST-sépharose (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) dans deux volumes de tampon de liaison (25 mM Hépes pH 7.5, 30 mM MgCl<sub>2</sub>, 40 mM NaCl, 0.5% NP-40, 1mM DTT, 1 mM phénylméthylsulfonyl fluoride, 1 mM sodium vanadate, 5 mM fluorure de sodium, 10 µg/ml aprotinine et 10 µg/ml leupeptine). Les échantillons ont été lavés 3 fois dans du tampon de liaison, dénaturés avec du tampon Laemmli 1x (250 mM Tris/HCL pH6.8, 40% glycérol, 8% SDS, 100 mM DTT, 0.4% bleu de bromophénol) et immunodétectés à l'aide de l'anticorps monoclonal détectant Rac1 (BD Transduction laboratories). Les lysats totaux ont aussi été immunoblottés pour Rac1 ainsi que pour VEGFR2 et HAGab1 afin de déterminer leur niveau d'expression.

#### *Essai d'activation des GTPases via la méthode d'ELISA*

Les cellules HMVECs ont été traitées avec des ARNis CTL et ciblant Gab1 tel que décrit précédemment. Deux jours plus tard, les cellules ont été sevrées pendant 4h dans du milieu EBM avant d'être stimulées au VEGF (10ng/ml) à différents temps et utilisées dans un test ELISA proposé sous forme de trousse par la compagnie Cytoskeleton. Brièvement, les cellules ont ensuite été rincées avec du PBS/NAV 1mM froid et lysées. Une quantité égale de protéine a été déposée sur des puits contenant soit le domaine

CRIB de la protéine PAK (voir ci haut) ou le domaine d'un effecteur reconnaissant spécifiquement la GTPase RhoA sous sa forme active. Les puits ont été ensuite lavés de leur contenu en Rac/RhoA inactif avant d'être incubés avec un anticorps spécifique à Rac/RhoA. Après plusieurs lavages, les puits sont finalement incubés avec un anticorps secondaire approprié et la teneur en RhoGTPase active a été déterminée par absorbance (490 nm).

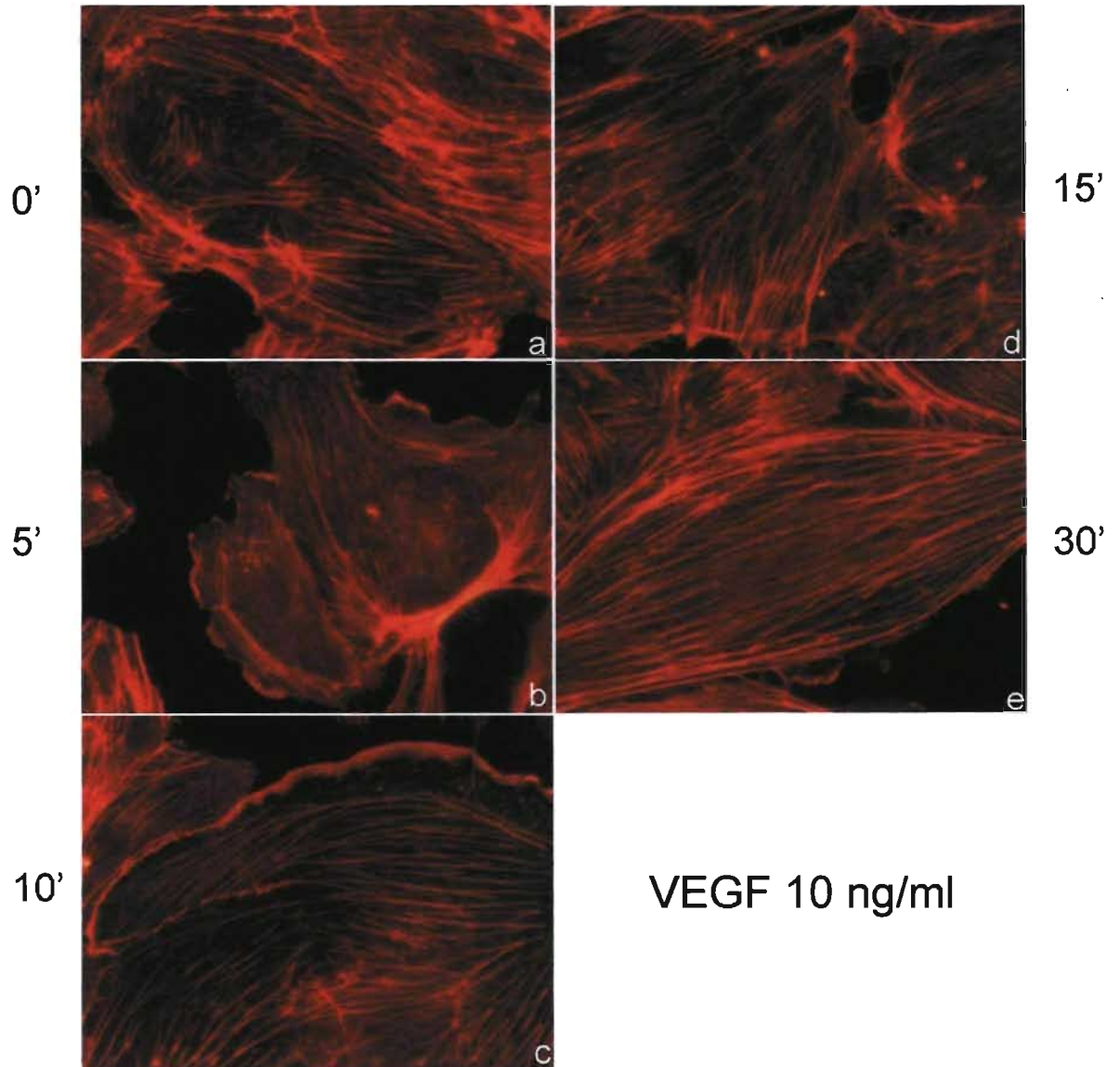
## Chapitre 3. Résultats

### *VEGF induit une redistribution d'actine dans les cellules HMVECs*

Le VEGF est reconnu pour sa capacité à induire des changements au niveau du cytosquelette d'actine. En effet, il induit la formation de lamellipodes dans les cellules endothéliales (80, 81) à de très fortes concentrations (50-100 ng/ml). De plus, il a été associé à la formation de fibres de tension à différents temps dans les cellules HUVECs et à des concentrations plus faibles (5 ng/ml) (73). Pour investiguer si les effets du VEGF sur la réorganisation d'actine dans les cellules HMVECs sont similaires à ceux préalablement observés, elles ont étéensemencées à faible confluence sur des lamelles de verre enduites de gélatine, déplétées en sérum pendant 4 h, puis stimulées au VEGF à une concentration (10 ng/ml) optimale pour leur migration. Elles ont été fixées, et ensuite l'actine a été marquée à l'aide de phalloïdine conjuguée au fluorochrome Alexa 546 et observée à l'aide d'un microscope à fluorescence. Dans les cellules non stimulées, les filaments d'actine sont organisés en fibres de tension (Fig. 8). Suite à une stimulation au VEGF, on peut observer une réorganisation majeure de l'actine qui est caractérisée par la formation de lamellipodes visibles à 5 min et atteignant un maximum à 10 min (Fig. 8 B, C). Ces lamellipodes disparaissent à 15 et 30 min et laissent place à la formation de fibres de tension (Fig. 8 D, E). Ces résultats suggèrent l'implication du VEGF dans la formation de lamellipodes et de fibres de tension dans les cellules HMVECs étant donné que des changements similaires ont été initialement observés pour d'autres types de cellules endothéliales en présence de ce facteur de croissance.

### *Gab1 médie la réorganisation du cytosquelette induite par le VEGF*

Une protéine adaptatrice nommée Gab1 a précédemment été identifiée comme partenaire de liaison à plusieurs RTKs, notamment aux VEGFR2 et PDGFR (*platelet-*



**Fig.8. Redistribution de l'actine dans les cellules HMVECs suite à une stimulation au VEGF.** Les HMVECs ont été déplétées en sérum pour 4h et stimulées aux temps indiqués avec 10 ng/ml de VEGF. Les cellules ont été fixées avec 3.7% de formaldéhyde, perméabilisées en présence de triton 0.1% et incubées avec de la phalloïdine conjuguée à l'Alexa Fluor 546 pour marquer les filaments d'actine. Les cellules ont été observées avec un microscope à fluorescence Olympus BX51 et les photos prises avec une caméra Q-Color5 CCD à un grossissement de 60X. Les résultats sont représentatifs de 3 expériences indépendantes.

*derived growth factor receptor*), deux récepteurs stimulant la migration et la réorganisation d'actine dans les cellules endothéliales (37, 82). Gab1 est une protéine qui a un impact sur la migration des cellules endothéliales en réponse au VEGF car lorsque son expression est inhibée, la migration est bloquée. Puisque la migration est associée à la régulation de la réorganisation d'actine (83), l'implication de Gab1 dans la médiation des changements provoqués par le VEGF sur le cytosquelette d'actine des cellules HMVECs a été évaluée. Pour ce faire, les cellules ont été traitées avec des ARNi ciblant Gab1 et des ARNi contrôles (CTL) avant d'être stimulées au VEGF à une dose (10ng/ml) induisant un maximum de migration. Les cellules ont ensuite été fixées et marquées à la phalloïdine conjuguée au fluorochrome Alexa 546 permettant la visualisation des filaments d'actine tel que mentionné précédemment. Les ARNis utilisés sont caractérisés par une forte efficacité et spécificité 48h après la transfection, tel que démontré précédemment dans le laboratoire (37). Suite à une stimulation au VEGF, les cellules traitées avec l'ARNi contrôles se comportent comme les cellules non traitées. En effet, la formation de lamellipodes est visible à partir de 5 min et atteint un maximum à 10 min. À 15 et 30 min, le cytosquelette est réorganisé en fibres de tension (Fig. 9 A, C, E, G). Par contre, les cellules HMVECs déplétées en Gab1 sont incapables de former des lamellipodes en réponse au VEGF et semblent contenir une quantité de fibres de tension plus importante que celle retrouvée dans les cellules contrôles, même en absence de facteur de croissance (Fig. 9 B, D, F, H). Combinés avec les données précédentes, ces résultats démontrent le rôle critique de Gab1 dans la médiation de la réorganisation du cytosquelette des cellules endothéliales en réponse au VEGF.

### *Gab1 promouvoit l'activation de Rac1 en réponse au VEGF dans les cellules HEK293*

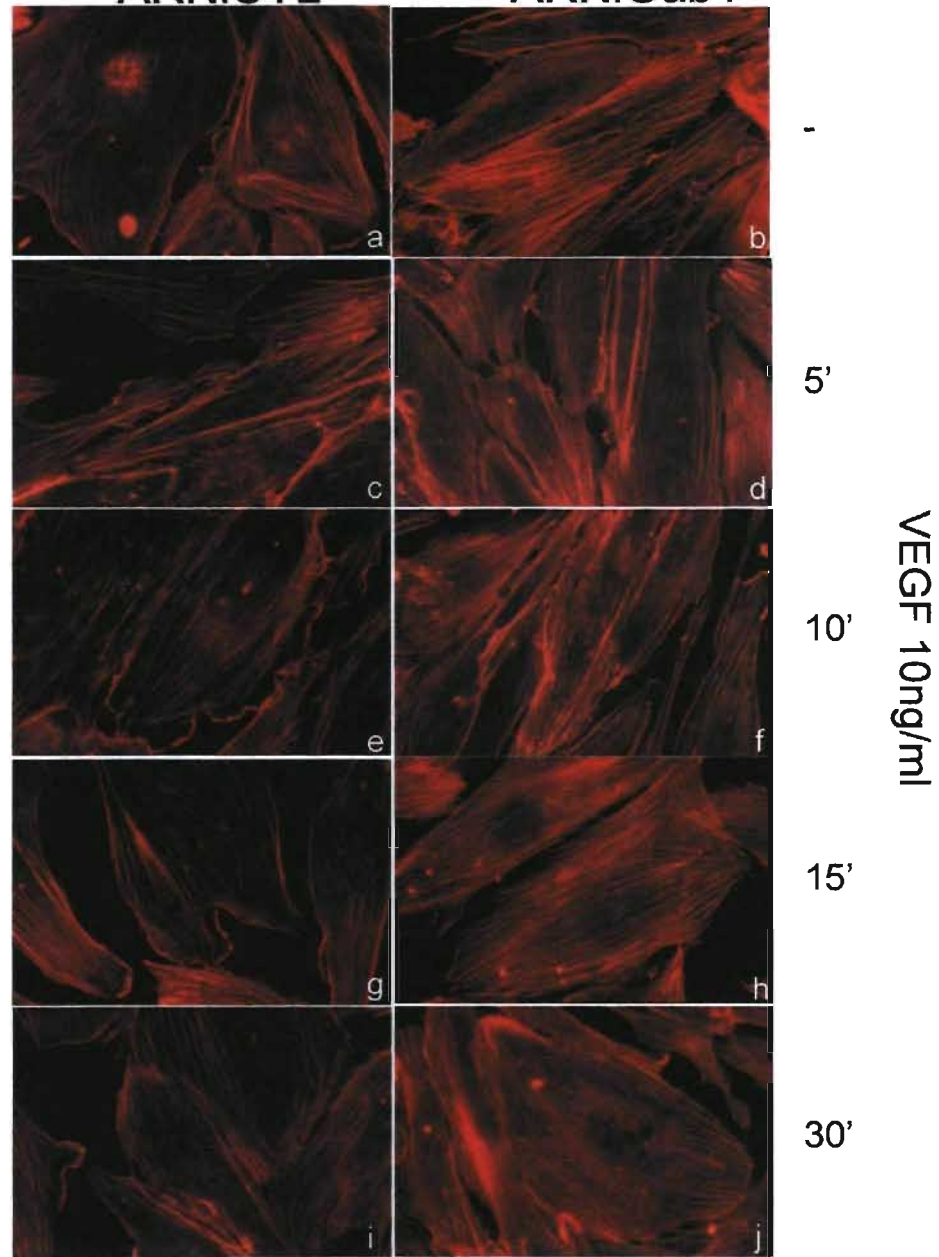
Tel que démontré, le VEGF induit un réarrangement du cytosquelette d'actine dans les cellules endothéliales (84). Les HMVECs, dont l'expression de la protéine Gab1 a été bloquée, sont incapables de former les lamellipodes telles qu'observées 10 min après stimulation par le VEGF et présentent un niveau de fibres de tension plus élevé (Fig. 9). La polymérisation et la dépolymérisation du cytosquelette d'actine suite à

A

ARNiCTL

ARNiGab1

27



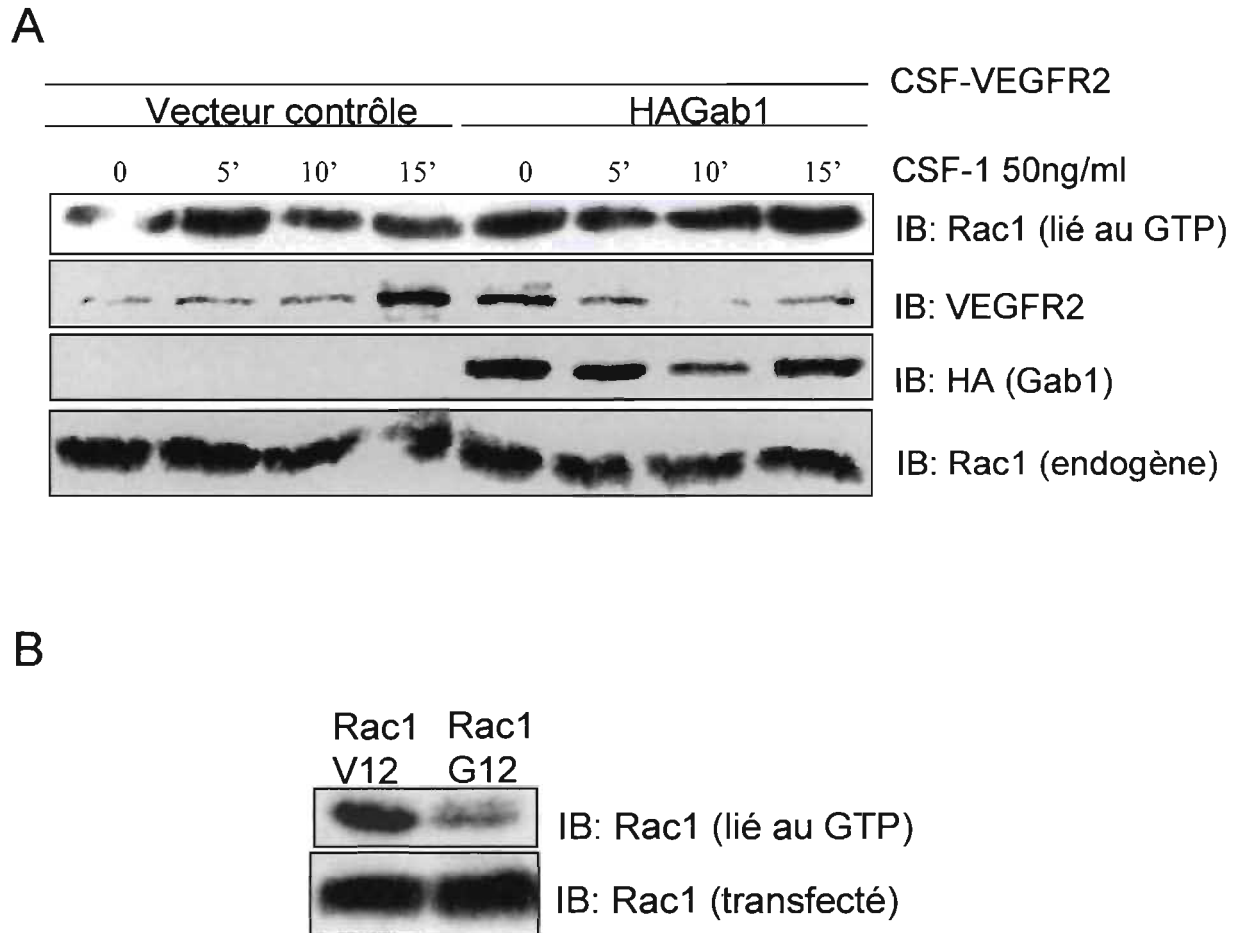
B



Fig.9. L'atténuation de l'expression de Gab1 dans les HMVECs entraîne une augmentation des fibres de tension et une diminution de la formation de lamellipodes en réponse au VEGF. A. Les HMVECs préalablement transfectées avec 200 nM d'ARNi contrôle (CTL) ou ciblant Gab1 ont été ensemencées sur des lamelles de verre enduites de gélatine. Les cellules ont été sevrées le lendemain pour une période de 3h et ensuite stimulées ou non (A,B) avec 10 ng/ml de VEGF pendant 5 min (C,D), 10 min (E,F), 15 min (G,H) et 30 min (I,J). Les cellules ont été fixées et l'actine filamentous a été détecté grâce à la phalloïdine couplée à l'Alexa Fluor 546. Les cellules ont été observées à l'aide d'un microscope à fluorescence Olympus BX51 et les photos prises avec la caméra Olympus Q-Color5 CCD à un grossissement de 60X. Les résultats sont représentatifs de 3 expériences indépendantes. B. Les niveaux d'expression de la protéine Gab1 endogène ont été déterminé par immunobuvardage de type Western sur 50  $\mu$ g de lysat cellulaire total.

l'activation d'un récepteur sont régulées par un des trois membres de la famille des petites RhoGTPases soit Rho, Rac ou Cdc42. Rac régule la formation de lamellipodes tandis que Rho induit la formation de fibres de tension. Pour déterminer si Gab1 médie la formation de lamellipodes via la régulation de Rac, nous avons tout d'abord évalué si l'expression de Gab1 entraîne une augmentation de l'état d'activation de Rac. Des cellules HEK293 ont été cotransfectées avec HA-Gab1 de type sauvage ou le vecteur vide en présence d'un vecteur encodant le récepteur chimérique CSF-1R fusionné aux domaines transmembranaire et intracellulaire du VEGFR2 et se comporte comme le VEGFR2 pleine longueur. Plus spécifiquement, les lysats protéiques ont été mis en contact avec une protéine de fusion composé du domaine CRIB de la protéine PAK (GST-CRIB), une protéine effectrice qui interagit uniquement qu'avec la protéine Rac sous sa forme active. Le complexe formé est ensuite purifié à l'aide de billes de sépharose couplées au glutathion. Les cellules préalablement transfectées ont été stimulées ou non pour différents temps au CSF avec une concentration de 50ng/ml, lysées, et une quantité égale de protéines a été soumise aux essais d'activation de Rac. Comme le démontre la figure 10, les cellules non stimulées présente un niveau basal d'activation de Rac1 et il est plus élevé en présence de Gab1. Suite à la stimulation des cellules transfectées avec le vecteur vide, on note une augmentation maximale de l'activation de Rac1 à 5 min, puis sa diminution à 10 et 15 min. À l'opposé, la transfection de Gab1 stimule l'activation de Rac1 jusqu'à un niveau maximum observé à 15 min. Ces résultats suggèrent que Gab1 potentie l'activation de Rac1 en aval du VEGFR2, et sont en accord avec les changements dans l'organisation d'actine préalablement observés dans les cellules HMVECs. En effet, la formation de lamellipodes est maximale après 10 min de stimulation au VEGF et est inhibée en absence de Gab1 (Fig. 9). Mises ensemble, ces données permettent de proposer que Gab1 joue un rôle important dans la transmission des signaux cellulaires du VEGF vers Rac1.





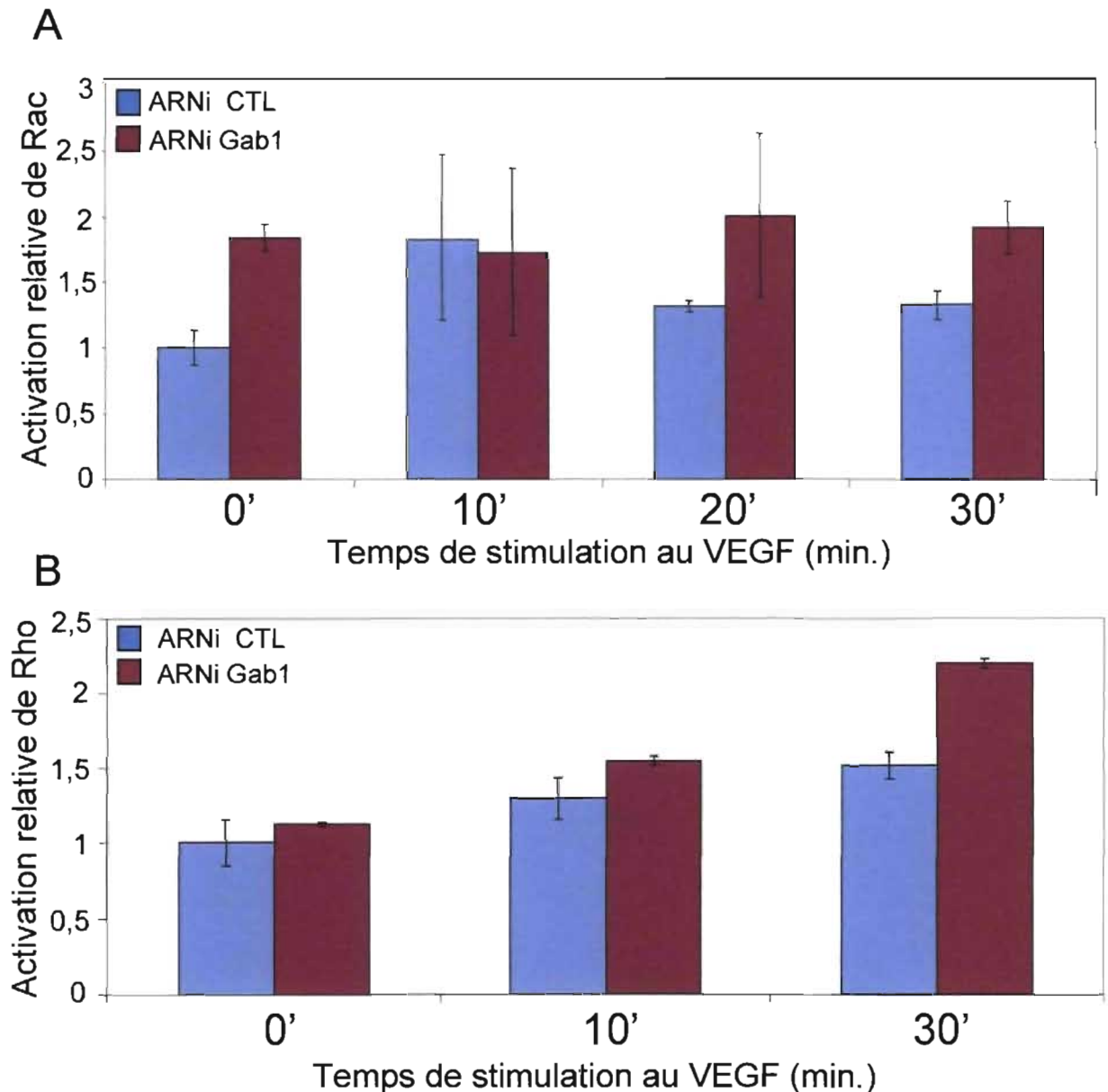
**Fig.10. La surexpression de Gab1 entraîne une augmentation de l'activation de Rac1 en réponse au VEGF.** A, Les cellules HEK293 ont étéensemencées et transfectées le lendemain avec les constructions indiquées par la méthode du calcium phosphate. Vingt-quatre heures plus tard, les cellules ont été sevrées pendant 16h et stimulées au CSF-1 (50ng/ml). Les lysats totaux des cellules ont été détectés pour l'expression des protéines CSF-VEGFR2, Gab1 marquées HA et Rac1 endogène. Dans le panneau supérieur, les résultats sont obtenus à partir de la précipitation de Rac1 chargé de GTP à l'aide de billes couplées au domaine CRIB de la protéine PAK, suivi de l'immunodétection avec l'anticorps anti-Rac1. B, Les lysats totaux sont détectés pour l'expression des protéines transfectées Rac1 V12 (constitutif actif) et G12 (sauvage). Le panneau supérieur illustre la même expérience que celle représentée par le panneau supérieur en A. Les résultats sont représentatifs de quatre expériences indépendantes.

*L'absence de Gab1 perturbe l'activation de Rac normalement observée en réponse au VEGF*

Il a récemment été rapporté que suite à sa stimulation, le VEGFR2 induisait l'activation de Rac1 dans les cellules endothéliales en favorisant la formation d'un complexe entre Vav2 et cette RhoGTPase (85). De même, nous avons rapporté que le VEGF induit la formation de lamellipodes dans les cellules endothéliales. De plus, la formation de ces lamellipodes est atténuée lorsque l'expression de la protéine adaptatrice Gab1 est inhibée (37) (Fig. 9). Connaissant déjà l'impact de Gab1 sur l'activation de Rac1 dans les cellules HEK293, l'impact de l'absence de Gab1 sur l'état de cette même RhoGTPase a été évalué en soumettant des cellules endothéliales traitées avec des ARNi ciblant Gab1 et stimulées au VEGF à un test ELISA basé sur l'essai d'activation des RhoGTPases décrit précédemment. Comme le démontre la figure 11-A, la stimulation des cellules contrôles induit une activation maximale de Rac1 10 min après l'ajout du VEGF. La quantité de protéines Rac1 actives revient à un niveau presque basal à 20 et 30 min après stimulation. Cependant, bien que l'activité basale dans les cellules déplétées en Gab1 soit augmentée à un niveau équivalent au niveau maximal induit par le VEGF dans les cellules contrôles, nous ne détectons pas d'activation médiée par VEGF dans ces cellules (Fig. 12). Ces observations sont consistantes avec l'incapacité démontrée des cellules déplétées en Gab1 à former autant de lamellipodes que les cellules traitées avec un ARNi contrôles en présence de VEGF (Fig. 9). Ces données suggèrent donc que l'expression de la protéine Gab1 est nécessaire pour induire l'activation optimale de Rac au temps requis dans les cellules HMVECs en réponse au VEGF.

*Une réduction de l'expression de Gab1 entraîne une hausse de l'activation de Rho dans les cellules endothéliales en réponse au VEGF.*

Les HMVECs dont l'expression de Gab1 a été inhibée présentent une augmentation de la quantité de fibres de tension, ce qui suggère une modulation de l'activité de Rho. Pour étudier l'importance de la protéine Gab1 endogène dans la régulation de Rho, les cellules HMVECs ont été transfectées avec un mélange de quatre



**Fig.11. La déplétion de Gab1 altère les niveaux d'activation des GTPases Rac et Rho dans les cellules HMVECs en réponse au VEGF.** Les cellules HMVECs ont été transfectées pendant 2h avec un ARNi contrôle (CTL) non spécifique ou un ARNi ciblant Gab1 avant d'être stimulées puis lysées 48h après. Les lysats protéiques des cellules CTL et déplétées en Gab1 ont ensuite été évalués pour leur contenu en Rac actif (A) et Rho actif (B) en présence de VEGF pour différents temps par l'intermédiaire d'un test ELISA. Les résultats sont représentatifs de la moyenne de trois expériences indépendantes pour le panneau A et d'une expérience préliminaire pour le panneau B.

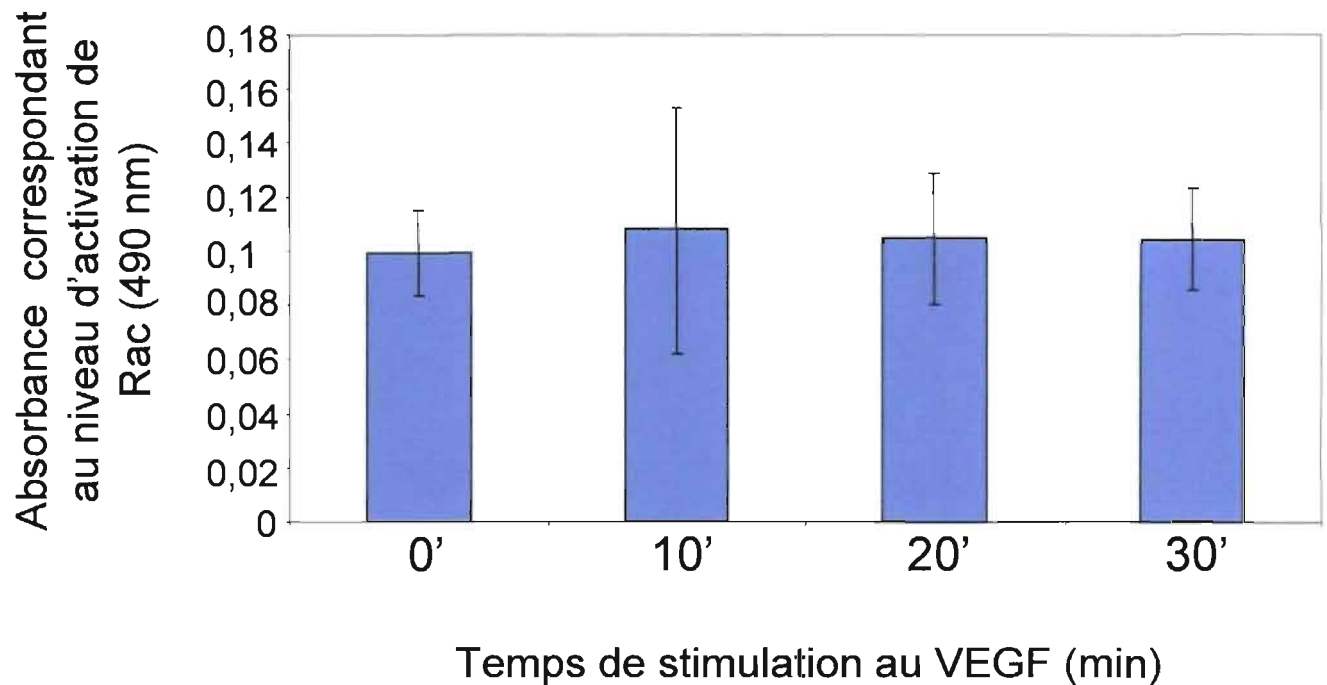


Fig.12. **L'inhibition de Gab1 n'entraîne pas une fluctuation de l'activité de Rac dans les cellules HMVECs en réponse au VEGF.** Les cellules HMVECs ont été préalablement transfectées pendant 2h avec 200 nM d'ARNi ciblant Gab1. Deux jours plus tard, les cellules sont sevrées pendant 4h avant d'être stimulées au VEGF et soumises au test d'ELISA rapportant la capacité de ces cellules à activer Rac. Les résultats sont représentatifs de la moyenne de trois expériences indépendantes.

ARNis spécifiques à Gab1 ou des ARNis contrôles. L'état d'activation de Rho des cellules déplétées en Gab1 a été évalué 48h plus tard utilisant à nouveau la méthode Élisa. Suite à la stimulation au VEGF, il y a une modeste augmentation de la quantité de Rho actif dans les cellules contrôles, ce qui correspond en terme de réorganisation d'actine à l'induction de la formation de fibres de tension qui est observée aux mêmes temps de stimulation (Figs. 8 et 9). Les cellules dont l'expression de Gab1 a été inhibée présentent également une activation de la protéine Rho, mais plus importante que celle détectée dans les cellules contrôles dans les mêmes conditions, surtout 30 min après stimulation (Fig. 11-B). Ces données convergent avec les observations précédentes, rapportant une prédominance en fibres de tension dans les cellules déplétées en Gab1 bien que ce phénotype semble en partie indépendant du VEGF. Ces résultats, ainsi que ceux illustrés par la figure 11, suggèrent donc l'importance de la protéine Gab1 endogène dans la régulation et la médiation de l'état d'activation de deux RhoGTPases importantes dans la migration des cellules endothéliales en réponse au VEGF.

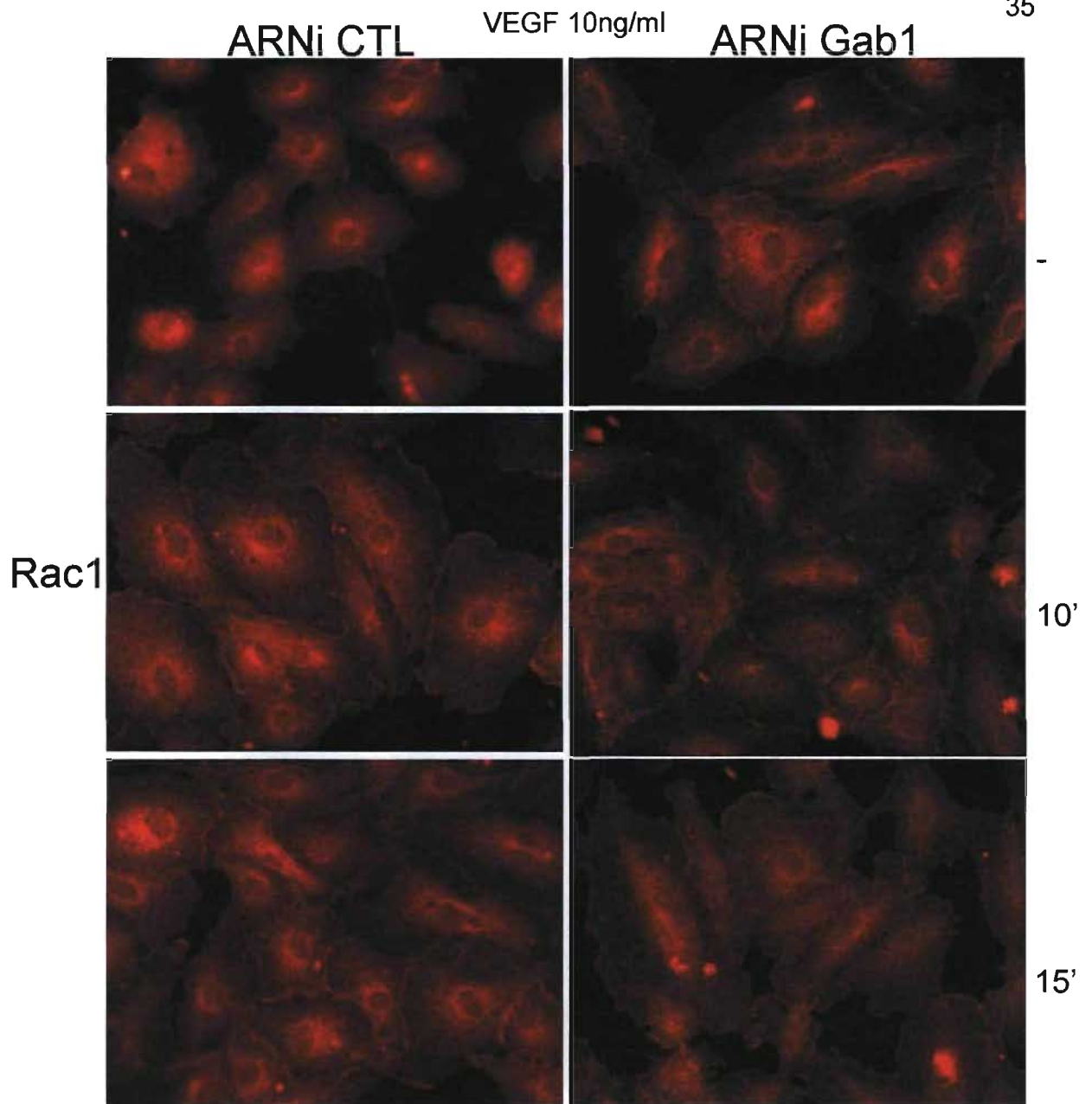
*La translocation de Rac1 vers la membrane en réponse au VEGF est atténuée en absence de Gab1*

Plusieurs activités biologiques sont régulées par les RhoGTPases. Notamment, Rac a été associé avec la migration et la perméabilité cellulaire ainsi qu'à plusieurs autres phénomènes (86). La perméabilité est souvent associée avec l'angiogenèse tumorale ; les cellules endothéliales qui ne forment pas de jonctions cellulaires étanches vont avoir tendance à laisser passer les cellules métastatiques vers la circulation sanguine plus facilement. Lors de la migration, Rac activé est responsable de la formation des lamellipodes à l'endroit guidant la direction du mouvement de la cellule. Rac est alors localisé à la membrane. Concernant la perméabilité, Rac est aussi retrouvé aux jonctions cellulaires/membrane où son activité serait associée avec la formation de jonctions et donc modulerait la capacité de ces dernières à laisser diffuser un substrat. Pour déterminer l'impact du VEGF sur la localisation de Rac1 dans les cellules endothéliales et l'influence de Gab1 sur cette localisation, des cellules HMVECs ont été traitées avec des ARNis contrôles et des ARNis ciblant Gab1 avant d'être stimulées au VEGF et fixées

à la formaldéhyde permettant ainsi le marquage de Rac1. Tel qu'illustré à la figure 13, les cellules endothéliales présentent un niveau basal de Rac1 localisé au niveau des jonctions cellulaires et dans l'espace périnucléaire. Suite à une stimulation de 10 et 15 min au VEGF, la présence de Rac1 aux jonctions est intensifiée et apparaît également au niveau des lamellipodes. Au contraire, les cellules dont l'expression de Gab1 a été inhibée ne présentent pas cette fluctuation. En effet, comme observé dans les cellules traitées avec un ARNi contrôles, il est possible de retrouver du Rac1 aux jonctions cellulaires des cellules traitées avec l'ARNi ciblant Gab1 non stimulées. Par contre, cette localisation est faible et ne semble ni s'intensifier ni diminuer en réponse au VEGF. Ces résultats semblent correspondre à ceux observés précédemment qui démontrent une augmentation de l'activation de Rac en réponse au VEGF (Fig. 12-A), phénomène qui n'est pas observé dans les cellules traitées avec l'ARNi ciblant Gab1 ; le niveau d'activation de Rac1 ne semble pas être affecté par la stimulation. L'ensemble de ces résultats suggère que Gab1 participe à l'activation et à la localisation de Rac1 dans les lamellipodes en réponse au VEGF.

#### *La localisation de Vav2 à la membrane n'est pas régulée par Gab1*

L'activité catalytique de Vav2 est régulée de plusieurs façons, notamment par son domaine PH qui a la capacité de lier les lipides membranaires PIP2 et PIP3 (60) ainsi que par sa phosphorylation induite notamment par des tyrosines kinases de la famille de Src (85). Une fois à la membrane, les GEFs rencontrent leurs substrats (RhoGTPases) et sont alors en mesure de promouvoir l'échange GDP-GTP et par conséquent, d'induire leur activation. Lorsque les GEFs sont localisées au cytosol, elles sont considérées comme inactives étant donné qu'elles sont localisées à un endroit qui diffère de celui où sont retrouvés leurs substrats. Puisque Gab1 est un médiateur de la voie PI3K- Akt en réponse au VEGF et qu'il affecte légèrement le niveau d'activation de Src (37), nous avons postulé que la déplétion de Gab1 pourrait entraîner la diminution de l'activation et du recrutement d'une GEF. De plus, connaissant l'influence du VEGF sur l'activation de Rac1 et sachant que Vav2 est connu comme activateur de cette dernière (87), la participation de cette GEF dans la cascade de signalisation située en aval du VEGFR2



**Fig.13. La relocalisation de Rac1 à la membrane est atténuée en absence de Gab1.** Les cellules HMVECs ont été transfectées pendant 2h avec 200 nM d'ARNi contrôle (CTL) non spécifique ou 200nM d'ARNi ciblant Gab1. Le lendemain de la transfection, les cellules sontensemencées sur des lamelles de verre enduites de gélatine. Vingt-quatre heures après, les cellules sont stimulées au VEGF avant d'être fixées et marquées pour la localisation de Rac1. Les cellules sont observées à l'aide d'un microscope à fluorescence Olympus BX51 et les photos sont prises avec une caméra Olympus Q-Color5 CCD. Les résultats sont représentatifs de deux expériences indépendantes.

dans les cellules déplétées en Gab1 a été questionnée. Comme observé à la figure 14, Vav2 présente initialement un patron de localisation cytosolique qui laisse présumer que cette GEF n'est pas à proximité de ses substrats, et donc qu'ils ne sont pas activés, et ce en présence ou non de Gab1. Ensuite, une modeste proportion de Vav2, dans les deux types de cellules, semble se localiser à la membrane suite à une stimulation de 10 minutes au VEGF, ce qui indiquerait un rapprochement de cette GEF avec ses substrats et donc une activation possible de Rac1. Cette observation corrèle avec l'induction au même moment de lamellipodes dans les cellules contrôles. Finalement, un patron cytosolique est recouvert au bout de 15 minutes de stimulation. Cependant, nous notons qu'en absence de Gab1, un patron ponctuel de Vav2, similaire à celui connu pour les points d'adhésions focales est majoritairement observé. Ces résultats montrent que Gab1 n'interfère pas avec le patron de localisation de Vav2 à la membrane des cellules endothéliales stimulées au VEGF. De plus, la phosphorylation de cette GEF n'est pas bloquée en absence de Gab1, mais plutôt légèrement augmentée, ce qui suggère que Gab1 n'est pas un médiateur de l'activation de Vav2 et que son absence pourrait même la promouvoir (Laboratoire I. Royal, résultat non publié).

*Gab1 promouvoit la présence de DOCK180 à la membrane des lamellipodes observées dans les cellules endothéliales suite à une stimulation au VEGF*

Il a déjà été rapporté que la capacité de Gab1 à induire des lamelles nécessitait sa liaison avec la protéine adaptatrice Crk, qui a aussi été récemment reconnue comme partenaire de liaison d'une GEF spécifique à Rac, DOCK180 (88,62). Étant donné que Vav2 ne semble pas être impliquée en aval de Gab1 dans les cellules endothéliales stimulées par le VEGF, le rôle potentiel de DOCK180 dans ce même contexte a été étudié. Comme mentionné précédemment, DOCK180 ne fait pas partie de la même famille que Vav2. En effet, cette GEF ne possède pas de domaine PH. Malgré tout, son activation corrèle avec sa localisation membranaire dépendante de la PI3K. Nous avons donc évalué la localisation de DOCK180 dans les cellules contrôles et déplétées en Gab1 suite à une stimulation au VEGF. Les cellules HMVECs ont été ensemencées, transfectées avec les ARNs et stimulées deux jours plus tard au VEGF (10ng/ml) pour en



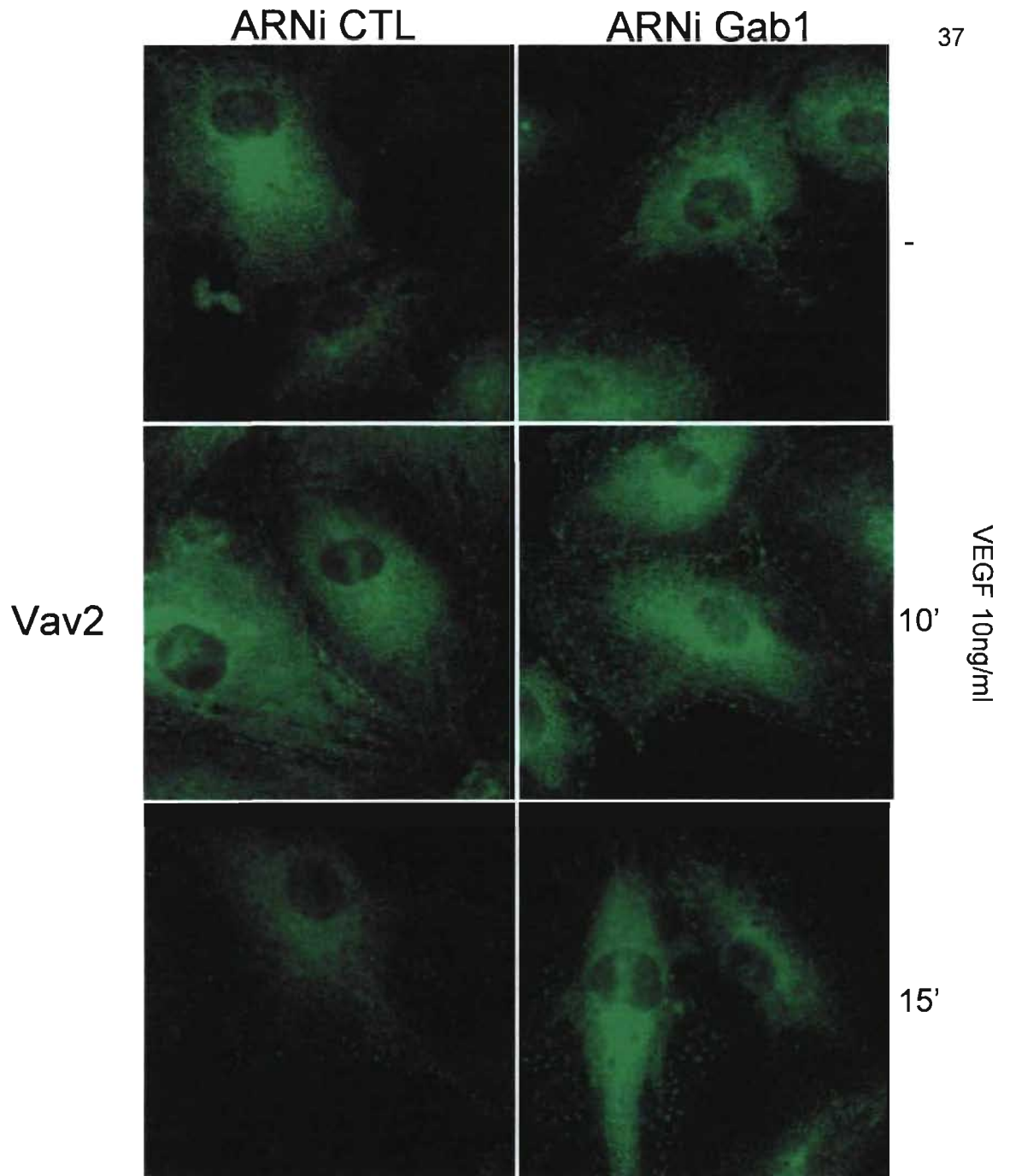


Fig.14. La déplétion de Gab1 dans les cellules endothéliales promouvoit la localisation cytosolique de Vav2. Les cellules HMVECs ont été transfectées pendant 2h avec un ARNi contrôlé (CTL) non spécifique ou un ARNi ciblant Gab1. Le lendemain de la transfection, les cellules sontensemencées sur des lamelles de verre enduites de gélatine. Vingt-quatre heures plus tard, les cellules sont stimulées au VEGF (10ng/ml) avant d'être fixées et marquées pour la localisation de Vav2. Les cellules sont observées à l'aide d'un microscope à fluorescence Olympus BX51 et les photos sont prises avec une caméra Olympus Q-Color5 CCD. Les résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes.

visualiser la localisation. Tel qu'observé à la figure 15, DOCK180 est principalement localisée au noyau et dans l'espace périnucléaire des cellules HMVECs contrôles non stimulées. Suite à une stimulation au VEGF, DOCK180 semble transloquer à la membrane des lamellipodes des HMVECs, d'une façon similaire à ce qui a déjà été rapporté dans d'autres systèmes (89). À l'opposé, DOCK180 n'est pas retrouvé à la membrane des cellules HMVECs dont l'expression de Gab1 a été inhibée. Ces résultats corrélerent avec ceux qui démontrent qu'en absence de Gab1, la formation de lamellipodes normalement observée en réponse au VEGF est inhibée. Ces observations démontrent que la localisation/activation de DOCK180 serait modulée par Gab1 et suggèrent que DOCK180 serait impliqué dans la formation de lamelles dans les cellules HMVECs en réponse au VEGF.

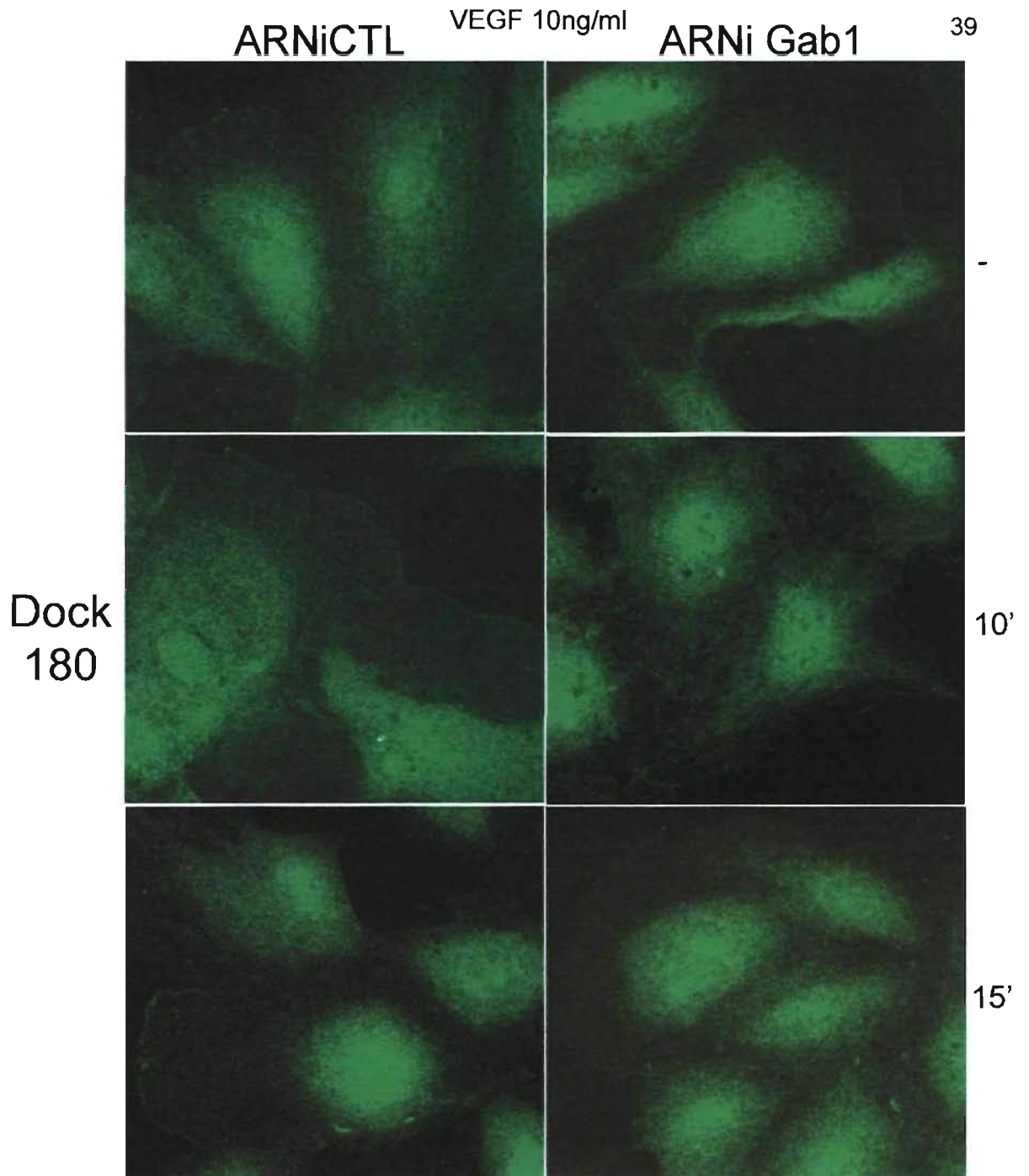
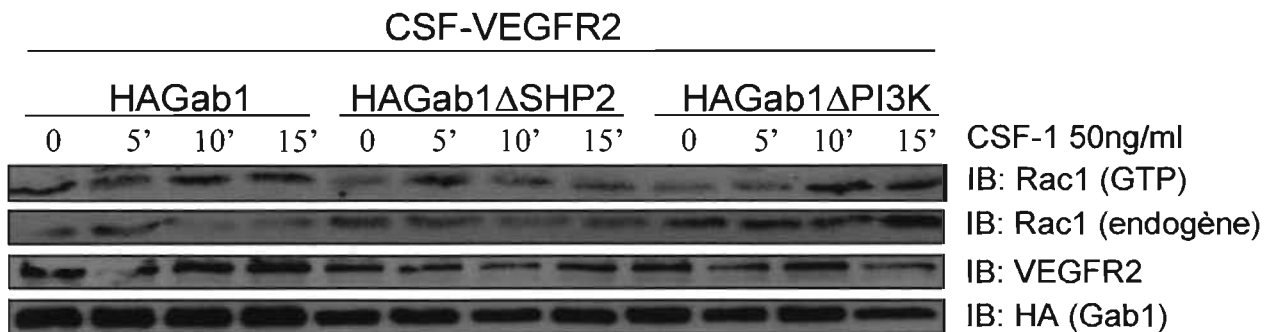


Fig.15. **La localisation de Dock180 à la membrane est inhibée en absence de Gab1.** Les cellules HMVECs préalablement transfectées pendant 2h avec un ARNi contrôle (CTL) non spécifique ou un ARNi ciblant Gab1 sont ensemencées sur des lamelles de verre enduites de gélatine. Le lendemain, suite à un sevrage de 4h, les cellules sont stimulées ou non au VEGF avant d'être fixées et marquées pour la localisation de DOCK180. Les cellules sont observées à l'aide d'un microscope à fluorescence Olympus BX51 et les photos sont prises avec une caméra Olympus Q-Color5 CCD. Les résultats sont représentatifs de deux expériences indépendantes.

*La cinétique d'activation de Rac du VEGFR2 est perturbée par l'introduction de mutants Gab1 $\Delta$ SHP2 et Gab1 $\Delta$ PI3K*

Pour tenter d'identifier les voies de signalisation en aval de Gab1 impliquée dans la promotion de la migration des cellules endothéliales en réponse au VEGF, différents mutants de Gab1 ont été exprimés dans les BAECs (bovine aortic endothelial cells). Les résultats de cette étude ont montré une importante inhibition de la migration de ces cellules lorsqu'elles étaient transfectées avec des mutants de Gab1 incapables de se lier à la PI3K (Gab1 $\Delta$ PI3K) ou à la phosphatase SHP2 (Gab1 $\Delta$ SHP2) (37). Étant donné l'importance du rôle joué par Rac dans la migration et l'impact de Gab1 sur cette protéine, l'effet de Gab1 $\Delta$ PI3K et Gab1 $\Delta$ SHP2 a été investigué pour tenter d'identifier la voie de signalisation potentiellement impliquée dans l'activation de Rac1. Pour ce faire, des cellules HEK293 ont été cotransfectées avec le récepteur chimérique CSF-VEGFR2 en présence de HA-Gab1 de type sauvage ou des mutants HA-Gab1 $\Delta$ PI3K ou HA-Gab1 $\Delta$ SHP2 et l'état d'activation de Rac1 a ensuite été évalué en réponse à la stimulation de ces cellules au CSF 50ng/ml. Tel que démontré à la figure 16, le CSF favorise une activation de Rac1 en présence du HA-Gab1 sauvage similaire à ce qui a préalablement été observé (Fig. 10). Cependant, nous observons que les mutants de Gab1 perturbent tout deux cette séquence d'activation. Dans l'ensemble, ces résultats suggèrent que l'impact de Gab1 sur la migration des cellules endothéliales en réponse au VEGF pourrait être médié par l'effet des voies de signalisation impliquant la PI3K et la phosphatase SHP2 sur Rac.



**Fig.16. Les mutants de Gab1 entraînent une perturbation de la cinétique d'activation de Rac1 en réponse au VEGF.** Les cellules HEK293 exprimant les constructions indiquées ont été sevrées pendant 16h et puis stimulées au CSF-1 (50ng/ml) selon les temps indiqués. La protéine Rac1 sous sa forme activée (liée au GTP), a ensuite été précipitée à l'aide de billes couplées au domaine CRIB de la protéine PAK. La quantité de protéines Rac active est évaluée par immunobuvardage à l'aide d'un anticorps anti-Rac. L'expression cellulaire des protéines CSF-VEGFR2, HA-Gab1, HA-Gab1 $\Delta$ SHP2 et HAGab1 $\Delta$ PI3K a été confirmée dans les lysats totaux par immunobuvardage avec les anticorps correspondants. Les résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes.

## Chapitre 4. Discussion

Une néovascularisation excessive et incontrôlée est associée avec le développement de nombreuses pathologies, notamment la croissance tumorale et le développement de métastases (6). Le VEGF est un régulateur clé de l'angiogenèse normale et tumorale. Malgré l'identification de cascades de signalisation critiques pour la migration et la prolifération des cellules endothéliales en réponse au VEGF, peu d'informations concernant la régulation de ces événements situés en aval du VEGFR2 sont connues. Notre laboratoire a montré que la protéine adaptatrice Gab1 se retrouve dans un complexe associé au VEGFR2 et qu'elle agit comme médiateur de la signalisation ainsi que de la migration et la formation de capillaires en réponse au VEGF (37). Puisque ces activités biologiques impliquent une réorganisation du cytosquelette d'actine, l'objectif de cette étude était de définir l'impact de Gab1 sur la régulation de ces réarrangements morphologiques. Nos résultats ont révélé que Gab1 était impliqué dans la formation de lamellipodes et de fibres de tension en réponse au VEGF et conséquemment dans la régulation de Rac et Rho respectivement. Nous avons également observé que ces effets étaient associés à la perturbation de la localisation membranaire de Rac1 normalement associée à son activation. Bien que l'identification des protéines impliquées dans l'activation de ces RhoGTPases n'ait pas encore été complétée, certains éléments nous laissent croire que la GEF DOCK180 pourrait être impliquée dans la médiation du signal entre Gab1 et la formation de lamellipodes suite à l'activation du VEGFR2 dans les cellules endothéliales. Étonnamment, nous n'avons cependant pas observé une baisse de l'activation de Rac en absence de Gab1 mais plutôt une augmentation du niveau de base, qui ne s'avère pas modulable par le VEGF. Le maintien de la localisation de Vav2, une GEF récemment impliquée dans l'activation de Rac par VEGF, ainsi qu'une légère augmentation de sa phosphorylation pourraient expliquer ce résultat. Finalement, nos observations démontrent aussi l'importance de la liaison entre Gab1 et les protéines SHP2 et PI3K pour le maintien de la cinétique d'activation de Rac. Ces protéines ont été préalablement rapportées comme étant des éléments essentiels des cascades de signalisation dépendantes du VEGFR2 impliquant Gab1 (37). Nos résultats démontrent

ainsi que Gab1 participe activement dans les événements de signalisation requis pour la réorganisation du cytosquelette d'actine et révèlent ainsi de nouveaux mécanismes moléculaires dépendants du VEGFR2 qui déclenchent une cascade de signalisation proangiogénique dans les cellules endothéliales.

Gab1 a préalablement été associé avec la formation de lamellipodes dans des fibroblastes en réponse au PDGF (82). Puisque Gab1 est requis pour la migration des cellules BAECs en réponse au VEGF et sachant que les RhoGTPases sont les actrices principales de ce phénomène, nous avons postulé que Gab1 était responsable de la médiation du signal entre le VEGFR2 activé et la réorganisation du cytosquelette résultant de l'activation des RhoGTPases. Utilisant l'approche des ARNi, nous avons montré que dans les cellules endothéliales, Gab1 était impliqué dans la formation des lamellipodes et la régulation des fibres de tension normalement observées en réponse au VEGF (84). Ces expérimentations suggèrent une corrélation entre la régulation de l'activation des RhoGTPases Rac et Rho normalement observée en réponse au VEGF et la protéine adaptatrice Gab1.

Le sentier de la PI3K a été reconnu comme un sentier majeur de la survie en réponse au VEGF. L'activation de la PI3K suite à la phosphorylation du VEGFR2 a également été associée avec l'activation de la RhoGTPase Rac, une protéine impliquée dans la perméabilité vasculaire et la migration cellulaire (13,90). Nous avons observé que dans les expériences de reconstitution impliquant la transfection de cellules HEK 293, la présence de Gab1 favorisait l'état d'activation de Rac suite à une stimulation au VEGF. Il est important de noter que la fluctuation des niveaux du récepteur suggérant l'endocytose de ce dernier semble confirmer l'activation réelle du VEGFR2 par le VEGF, tel qu'il a été préalablement rapporté (103). Ces observations corrélerent avec l'importance de Gab1 dans la formation de lamellipodes dans les cellules endothéliales en réponse au VEGF (37). Quoique la cascade de signalisation médiant ces effets reste encore méconnue, l'importance de la liaison entre Gab1 et la PI3K a préalablement été rapportée dans le contexte de migration des cellules endothéliales en réponse au VEGF et pourrait être le mécanisme responsable de ce phénomène. De façon surprenante, le niveau d'activation

basal de Rac dans les cellules endothéliales traitées avec des ARNis est augmenté comparativement aux cellules traitées avec des ARNis contrôles, bien qu'il ne soit pas modulé par le VEGF. Ce phénomène se traduit par l'absence de lamellipodes et la présence importante de fibres de tension. Jusqu'à maintenant, Rac a été associé à la formation de lamellipodes, par contre plusieurs études ont rapportés la formation de fibres de tension dans les cellules endothéliales suite à la transfection du Rac constitutivement actif (91, 92). Ce résultat diffère malgré tout de celui initialement obtenu dans les HEK293, où une surexpression de Gab1 entraînait aussi une augmentation du niveau d'activation basal de Rac1, bien qu'ils soient difficilement comparables étant donné la variation de protéines retrouvées dans ces deux types cellulaires. De plus, comme les mécanismes médians les effets observés dans les cellules endothéliales restent méconnus, il est difficile de reconstituer ce phénomène dans des types cellulaires différents.

L'augmentation du niveau basal de Rac en absence de Gab1 dans les cellules HMVECs pourrait être également attribué à la légère augmentation de la phosphorylation et donc de l'activité de la GEF Vav2. Cependant, malgré cette activation de Rac plus élevée dans les cellules déplétées en Gab1, la stimulation au VEGF n'induit pas d'augmentation de l'activité de Rac et les cellules sont incapables d'induire la formation de lamellipodes. L'absence de Gab1 semble donc augmenter l'activité de base de Rac dans les cellules non stimulées, mais en empêcher son activation VEGF dépendante. Ces observations nous laisse présumer que Gab1 pourrait être une protéine importante pour l'organisation basale du cytosquelette de la cellule et ensuite, dans les changements morphologiques du cytosquelette induits par VEGF. De plus, l'expression de Gab1 semble corrélér avec la localisation de Rac1 à la membrane des lamellipodes induites par le VEGF. Il est alors possible de suggérer l'importance de Gab1 dans la localisation du Rac1 actif, et que les cellules déplétées en Gab1 ne forment pas de lamellipodes puisqu'il y aurait un problème dans la localisation de Rac en absence et en présence de VEGF. Cette hypothèse est aussi appuyée par le fait que nous avons détecté l'association de Gab1 avec Nck et PAK dans les HEK293 et les BAECs stimulées au VEGF (Labo I. Royal, résultats non présentés). Nck est une protéine adaptatrice qui est associée à la



protéine kinase PAK impliquée dans la polarisation cellulaire nécessaire dans la définition de la direction migratoire (93). Ces deux protéines ont également été impliquées dans la capacité migratoire des cellules endothéliales induite par le VEGF (72). L'absence de Gab1 viendrait donc perturber la fonction de ces protéines.

Certaines GEFs ont été rapportées comme pouvant s'associer avec des partenaires d'interaction de Gab1. Notamment DOCK180, une GEF spécifique à Rac et Cdc42 faisant partie de la famille des DOCK, interagit avec Crk et Nck. De plus, l'inhibition de Gab1 dans les cellules endothéliales stimulées au VEGF inhibe la localisation de DOCK180 à la membrane en réponse au VEGF. L'effet de Gab1 sur l'état d'activation de Rac pourrait donc être dû à la capacité de cette protéine adaptatrice à recruter cette GEF à la membrane via la formation d'un complexe impliquant Crk ou Nck, facilitant ainsi son interaction avec Rac et donc son activation.

Il a aussi été rapporté que Gab1 avait comme partenaire de liaison GC-GAP, une GAP impliquée dans la régulation de Rac1 et Cdc42, qui pourrait potentiellement médier les effets de Gab1 sur Rac1. En effet, l'expression de cette protéine dans les fibroblastes HEK293 induit une réduction de la quantité de Rac1 (94). Cependant, les effets rapportés par ce groupe n'ont pas été observés suite à l'activation d'un récepteur. Donc, la dynamique d'interaction entre Gab1 et GC-GAP en réponse au VEGF ou d'un autre facteur de croissance n'est pas connue. Malgré tout, la déplétion de Gab1 pourrait nuire au recrutement de cette Gap au niveau de complexes protéiques et donc permettre une augmentation du niveau de base de l'activité Rac. Alternativement, l'activation du VEGFR2 par le VEGF pourrait bloquer la liaison entre Gab1 et GC-GAP et entraîner ainsi une plus grande activation de Rac1.

Finalement, la trousse ELISA utilisée pour la précipitation de Rac actif dans les cellules endothéliales n'est pas spécifique à Rac1; il se pourrait alors que les résultats observés s'appliquent aussi à Rac2 et 3, ce qui pourrait expliquer les différences obtenues entre les essais effectués dans les HEK293 ciblant spécifiquement Rac1 et ceux effectués dans les cellules endothéliales ciblant Rac1, 2 et 3. Quoiqu'il en soit, Gab1 reste une

protéine adaptatrice qui a un haut potentiel d'impact sur la régulation de l'activité de Rac en réponse au VEGF, qu'elle soit négative ou positive dépendamment du type cellulaire et de la protéine ciblée.

De façon similaire, l'activité de Rho s'est montrée plus élevée dans les cellules endothéliales soumises au traitement d'ARNi et stimulées au VEGF, ce qui corrèle avec la présence plus importante de fibres de stress dans ces mêmes cellules. Gab1 a été reconnu pour interagir avec de nombreuses protéines, notamment SHP2, une phosphatase impliquée dans la réorganisation d'actine ainsi que la migration cellulaire (95-99). En particulier, l'inactivation de SHP2 ou encore l'expression d'un mutant dominant négatif de cette dernière induit une augmentation de l'activation de RhoA ainsi que l'augmentation des fibres de tension (97,98), un phénomène similaire à celui observé dans la présente étude. Cette augmentation de fibres de tension, et potentiellement de points d'adhésion focale pourrait traduire une incapacité des cellules à relâcher le substrat et à migrer. Des tests d'adhésion sur gélatine révèlent d'ailleurs une plus grande adhésion des cellules déplétées en Gab1 (Labo I.Royal, résultats non présentés) Dans le même sens, PAK pourrait également être impliqué dans l'inactivation de Rho en aval de Rac. Gab1 étant capable de lier Nck et PAK (Labo I.Royal, résultats non présentés), l'inhibition de Gab1 viendrait perturber les effets de PAK et pourrait ainsi occasionner l'augmentation de l'activation de RhoA. Plusieurs papiers rapportent l'importance de la balance Rho-Rac dans la migration cellulaire signifiant l'activation de l'un et l'inactivation de l'autre (50, 100). Nos observations démontrent que cette balance est dérégulée en réponse au VEGF dans les cellules endothéliales dont l'expression de Gab1 a été inhibée.

Dans le contexte plus global de migration, Gab1 promouvoit cette activité biologique seulement si en association avec la PI3K ou SHP2, ce qui suggère fortement le rôle de PI3K et SHP2 dans l'activation des voies de signalisation médiées par Gab1 en réponse à une stimulation au VEGF. La voie de la PI3K est étroitement associée à la migration des cellules endothéliales en réponse au VEGF en plus d'être un activateur bien connu de la RhoGTPase Rac1, un phénomène qui semble être favorisé en présence

de Gab1. De plus, plusieurs études ont établi clairement un rôle pour SHP2 dans l'induction de l'activation de Src (101,102), une protéine dont l'association avec VRAP a été récemment montrée comme étant impliquée dans la médiation de la migration cellulaire en réponse au VEGF (27). Finalement, une étude rapporte aussi que la transfection du mutant Gab1 $\Delta$ SHP2 dans des cellules déficientes en Gab1 ne permet pas la récupération de lamellipodes normalement observées suite à une stimulation au PDGF (82). De façon cohérente avec ce qui a été observé préalablement pour la migration, les mutants Gab1 $\Delta$ SHP2 et Gab1 $\Delta$ PI3K dérèglent la cinétique d'activation de Rac1. Comme préalablement mentionné, la PI3K est responsable de la présence des lipides membranaires PIP3, un élément important pour le recrutement des GEFs et des GAPs. Il n'est donc pas impossible de penser qu'une perturbation dans l'une de ces voies de signalisation puisse résulter en une dérégulation de l'activation de Rac1.

En conclusion, les résultats présentés dans cette étude suggèrent que Gab1 est essentiel à la migration des cellules endothéliales en réponse au VEGF par son implication dans les voies de signalisation ciblant les régulateurs des RhoGTPases, soit les GEFs et les GAPs. Les études menant à la découverte de l'importance de la protéine adaptatrice Gab1 dans la formation de lamellipodes et dans la régulation des fibres de tension par le maintien de l'équilibre Rho/Rac1, apportent des éléments de compréhension des mécanismes moléculaires potentiellement impliqués dans la régulation de l'angiogenèse *in vivo*.

Pour avoir une meilleure vue d'ensemble et étant donné l'importance de Cdc42 dans la migration cellulaire, il serait intéressant d'étudier l'impact de Gab1 sur les niveaux d'activation de cette GTPase. De plus, puisqu'il est difficile de déterminer si l'activation des RhoGTPases détermine leur localisation ou au contraire, si leur localisation détermine leur activation, il serait intéressant de vérifier l'impact de l'inhibition de Gab1 sur la localisation de la forme activée de la RhoGTPase Rac1. En effet, il n'est pas encore possible de déterminer si les effets observés de Gab1 sur l'activation Rac1 sont causés par une localisation altérée de cette GTPase ou par un dérèglement d'une voie de signalisation spécifique.

## LISTE DE RÉFÉRENCES

1. Risau, W., Mechanisms of angiogenesis, *Nature*, 386, 671-674, 1997.
2. Carmeliet, P., Angiogenesis in health and disease, *Nature Medicine*, 9, 653-660, 2003.
3. Yancopoulos, G. D., Davis, S., Gale, N.W., Rudge, J.S., Wiegand, S.J., Holash, J., Vascular-specific growth factors and blood vessel formation, *Nature*, 407, 242-248, 2000.
4. Folkman, J., Klagsbrun, M., Angiogenic factors, *Science*, 235, 442-447, 1987.
5. Folkman, J., Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease, *Nature Medicine*, 1, 27-31, 1995.
6. Carmeliet, P., Jain, R.K., Angiogenesis in cancer and other diseases, *Nature*, 407, 249-257, 2000.
7. Ferrara, N., Mechanisms of Angiogenesis (Clauss, M., Breier, G., eds) Vol. EXS 94, pp.209-231, Birkhäuser Verlag, Basel, Switzerland.
8. Ferrara, N., VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors, *Nature Reviews Cancer*, 2: 795-803, 2002.
9. Senger, D.R., Galli, S.J., Dvorak, A.M., Perruzzi, C.A., Harvey, V.S., Dvorak, H.F., Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid, *Science*, 219: 983-5, 1983.
10. Leung, D.W., Cachianes, G., Kuang, W.J., Goeddel, D.V., Ferrara, N., Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen, *Science*, 246: 1306-1309, 1989.
11. Carmeliet, P., Ferreira, V., Breier, G., Pollefeyt, S., Kieckens, L., Gertsenstein, M., Fahrig, M., Vandenhoeck, A., Harpal, K., Eberhardt, C., Declercq, C., Pawling, J., Moons, L., Collen, D., Risau, W., Nagy, A., Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele, *Nature*, 380:435-9, 1996.
12. Ferrara, N., Carver-Moore, K., Chen, H., Dowd, M., Lu, L., O'Shea, K.S., Powell-Braxton, L., Hillan, K.J., Moore, M.W., Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene, *Nature*, 380:439-42, 1996.

13. Takahashi, H., Shibuya, M. The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. *Clinical Science*, 109 : 227-241, 2005.
14. Pugh, C.W., Ratcliffe, P.J., Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system, *Nature Medicine*, 9:677-84, 2003.
15. Shibuya, M., Yamaguchi, S., Yamane, A., Ikeda, T., Tojo, A., Matsushime, H., Sato, M., Nucleotide sequence and expression of a novel human receptor-type tyrosine kinase gene (flt) closely related to the fms family, *Oncogene*. 5:519-24, 1990.
16. Terman, B.I., Carrion, M.E., Kovacs, E., Rasmussen, B.A., Eddy, R.L., Shows, T.B., Identification of a new endothelial cell growth factor receptor tyrosine kinase, *Oncogene*. 6:1677-83, 1991.
17. Karkkainen, M.J., Makinen, T., Alitalo, K., Lymphatic endothelium: a new frontier of metastasis research., *Nature Cell Biology*, 4: E2-5, 2002.
18. Park, J.E., Chen, H.H., Winer, J., Houck, K.A., Ferrara, N., Placenta growth factor. Potentiation of vascular endothelial growth factor bioactivity, in vitro and in vivo, and high affinity binding to Flt-1 but not to Flk-1/KDR, *J.B.C.*, 269: 25646-54, 1994.
19. Fong, G.H., Rossant, J., Gertsenstein, M., Breitman, M.L., Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium, *Nature*, 376: 66-70, 1995.
20. Fong, G.H., Zhang, L., Bryce, D.M., Peng, J., Increased hemangioblast commitment, not vascular disorganization, is the primary defect in flt-1 knock-out mice, *Development*, 126: 3015-25, 1999.
21. Shalaby, F., Rossant, J., Yamaguchi, T.P., Gertsenstein, M., Wu, X.F., Breitman, M.L., Schuh, A.C., Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice, *Nature*, 376: 62-6, 1995.
22. Hiratsuka, S., Minowa, O., Kuno, J., Noda, T., Shibuya, M., Flt-1 lacking the tyrosine kinase domain is sufficient for normal development and angiogenesis in mice. *PNAS*, 4: 9349-9354, 1998.
23. Takahashi, T., Yamaguchi, S., Chida, K., Shibuya, M., A single autophosphorylation site on KDR/Flk-1 is essential for VEGF-A-dependent activation of PLC-gamma and

- DNA synthesis in vascular endothelial cells, *EMBO Journal*, 20: 2768-78, 2001.
24. Dougher, M., Terman, B.I., Autophosphorylation of KDR in the kinase domain is required for maximal VEGF-stimulated kinase activity and receptor internalization, *Oncogene*, 18: 1619-27, 1999.
  25. Dougher-Vermazen, M., Hulmes, J.D., Bohlen, P., Terman, B.I., Biological activity and phosphorylation sites of the bacterially expressed cytosolic domain of the KDR VEGF-receptor, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 205: 728-38, 1994.
  26. Kendall, R.L., Rutledge, R.Z., Mao, X., Tebben, A.J., Hungate, R.W., Thomas, K.A., Vascular endothelial growth factor receptor KDR tyrosine kinase activity is increased by autophosphorylation of two activation loop tyrosine residues, *J.B.C.*, 274: 6453-60, 1999.
  27. Matsumoto, T., Bohman, S., Dixelius, J., Berge, T., Dimberg, A., Magnusson, P., Wang, L., Wikner, C., Qi, J.H., Wernstedt, C., Wu, J., Bruheim, S., Mugishima, H., Mukhopadhyay, D., Spurrkland, A., Claesson-Welsh, L., VEGF receptor-2 Y951 signaling and a role for the adapter molecule TSAd in tumor angiogenesis, *EMBO Journal*, 24: 2342-53, 2005.
  28. Gerber, H.P., McMurtrey, A., Kowalski, J., Yan, M., Keyt, B.A., Dixit, V., Ferrara, N., Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation, *J.B.C.*, 273:30336-43, 1998.
  29. Eliceiri, B.P., Paul, R., Schwartzberg, P.L., Hood, J.D., Leng, J., Cheresch, D.A., Selective requirement for Src kinases during VEGF-induced angiogenesis and vascular permeability, *Molecular Cell*, 4: 915-24, 1999.
  30. He, H., Venema, V.J., Gu, X., Venema, R.C., Marrero, M.B., Caldwell, R.B., Vascular endothelial growth factor signals endothelial cell production of nitric oxide and prostacyclin through flk-1/KDR activation of c-Src, *J.B.C.*, 274: 25130-5, 1999.
  31. Zachary, I., Mechanisms of angiogenesis (Clauss, M., Breier, G., eds) Vol. EXS 94, 267-230, Birkhäuser Verlag, Basel, Switzerland, 2005.
  32. Shibuya, M., Claesson-Welsh, L., Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis, *Experimental Cell Research*, 312:

- 549-60, 2006.
33. Zachary, I., Glikli, G., Signaling transduction mechanisms mediating biological actions of the vascular endothelial growth factor family, *Cardiovascular Research*, 49: 568-81, 2001.
  34. Claesson-Welsh, L., Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors, *Biochemical Society Transactions*, 31: 20-4, 2003.
  35. Cross, M.J., Dixelius, J., Matsumoto, T., Claesson-Welsh, L., VEGF-receptor signal transduction, *Trends in Biochemical Sciences*, 28: 488-94, 2003.
  36. Liu, Y., Rohrschneider, L.R., The gift of Gab, *FEBS Letters*, 515: 1-7, 2002.
  37. Laramee, M., Chabot, C., Cloutier, M., Stenne, R., Holgado-Madruga, M., Wong, A.J., Royal, I., The scaffolding adapter Gab1 mediates vascular endothelial growth factor signaling and is required for endothelial cell migration and capillary formation, *J.B.C.*, 282:7758-69, 2007.
  38. Holgado-Madruga, M., Emllet, D.R., Moscatello, D.K., Godwin, A.K., Wong, A.J., A Grb2-associated docking protein in EGF- and insulin-receptor signaling, *Nature*, 379: 560-4, 1996.
  39. Weidner, K.M., Di Cesare, S., Sachs, M., Brinkmann, V., Behrens, J., Birchmeier, W., Interaction between Gab1 and the c-Met receptor tyrosine kinase is responsible for epithelial morphogenesis, *Nature*, 384: 173-6, 1996.
  40. Haihua, G., Benjamin, G.N., The 'Gab' in signal transduction, *TRENDS in Cell Biology*, 13: 122-130, 2003.
  41. Gu, H., Neel, B.G., The "Gab" in signal transduction, *Trends in Cell Biology*, 13: 122-30, 2003.
  42. Lamothe, B., Yamada, M., Schaeper, U., Birchmeier, W., Lax, I., Schlessinger, J., The docking protein Gab1 is an essential component of an indirect mechanism for fibroblast growth factor stimulation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt antiapoptotic pathway, *M.C.B.*, 24: 5657-66, 2004.
  43. Mattoon, D.R., Lamothe, B., Lax, I., Schlessinger, J., The docking protein Gab1 is the primary mediator of EGF-stimulated activation of the PI-3K/Akt cell survival pathway, *BMC Biology*. 2:24, 2004.
  44. Maroun, C.R., Holgado-Madruga, M., Royal, I., Naujokas, M.A., Fournier, T.M.,

- Wong, A.J., Park, M., The Gab1 PH domain is required for localization of Gab1 at sites of cell-cell contact and epithelial morphogenesis downstream from the met receptor tyrosine kinase, *M.C.B.*, 19:1784-99, 1999.
45. Maroun, C.R., Naujokas, M.A., Holgado-Madruga, M., Wong, A.J., Park, M., The Tyrosine Phosphatase SHP-2 Is Required for Sustained Activation of Extracellular Signal-Regulated Kinase and Epithelial Morphogenesis Downstream from the Met Receptor Tyrosine Kinase, *M.C.B.*, 20: 8513-8525, 2000.
46. Schaeper, U., Gehring, N.H., Fuchs, K.P., Sachs, M., Kempkes, B., Birchmeier, W., Coupling of Gab1 to c-Met, Grb2, and Shp2 mediates biological responses, *J.C.B.*, 149: 1419-32, 2000.
47. Ridley, A.J., Rho GTPases and cell migration, *J. of Cell Sciences*, 114: 2713-2722, 2001.
48. Cox, E.A., Sastry, S.A., Huttenlocher, A., Integrin-mediated adhesion regulates cell polarity and membrane protrusion through the Rho family of GTPases, *M.B.C.*, 12: 265-277, 2001.
49. Zhao, Z.S., Manser, E., Loo, T.H., Lim, L., Coupling of Pak-interacting exchange factor Pix to Git1 promotes focal complex disassembly, *M.C.B.*, 20: 6354-636, 2000.
50. Sander, E.E., ten Klooster, P., Van Delft, S., van der Kammen, R.A., Collard, J.G., Rac downregulates Rho activity: reciprocal balance between both GTPases determines cellular morphology and migratory behavior, *J.C.B.*, 147: 1009-1021, 1999.
51. Hall, A., Rho GTPases and the control of cell behaviour, Novartis Medal Lecture, *Biochemical Society Transaction*, 33: part 5, 2005.
52. Hall, A., Ras-related GTPases and the cytoskeleton, *M.B.C.*, 3:475-9, 1992.
53. Dovas, A., Couchman, J.R., RhoGDI : multiple functions in the regulation of Rho family GTPase activities, *Biochemistry J.*, 390: 1-9, 2005.
54. Lin, Q., Yang, W., Baird, D., Feng, Q., Cerione, R.A., Identification of a DOCK180-related guanine nucleotide exchange factor that is capable of mediating a positive feedback activation of Cdc42, *J.B.C.*, 46: 35253-35262, 2006.
55. Moon, S.Y., Zheng, Y., Rho GTPase-activating proteins in cell regulation, *Trends in Cell Biology* 13: 13-22, 2003.



56. Schmidt, A., Hall, A., Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch. *Genes Development*, 16: 1587-1609, 2002.
57. Cerione, R.A., Zheng, Y., The Dbl family of oncogenes, *Current Opinion in Cell Biology*, 8: 216-22, 1996.
58. Erickson, J.W., Cerione, R.A., Structural elements, mechanism, and evolutionary convergence of Rho protein-guanine nucleotide exchange factor complexes, *Biochemistry*, 43: 837-42, 2004.
59. Lopez-Lago, M., Lee, H., Cruz, C., Movilla, N., Bustelo, X.R., Tyrosine phosphorylation mediates both activation and downmodulation of the biological activity of Vav, *M.C.B.*, 20: 1678-91, 2000.
60. Hornstein, I., Alcover, A., Katzav, S., Vav proteins, masters of the world of cytoskeleton organization, *Cellular Signalling*, 16: 1-11, 2004.
61. Meller, N., Irani-Tehrani, M., Kiosses, W.B., Del Pozo, M.A., Schwartz, M.A., Zizimin1, a novel Cdc42 activator, reveals a new GEF domain for Rho proteins, *Nature Cell Biology*, 4: 639-47, 2002.
62. Cote, J.F., Vuori, K., Identification of an evolutionarily conserved superfamily of DOCK180-related proteins with guanine nucleotide exchange activity, *Journal of Cell Science*, 115: 4901-13, 2002.
63. Wu, Y.C., Horvitz, H.R., *C. elegans* phagocytosis and cell-migration protein CED-5 is similar to human DOCK180, *Nature*, 392: 501-4, 1998.
64. Fukui, Y., Hashimoto, O., Sanui, T., Oono, T., Koga, H., Abe, M., Inayoshi, A., Noda, M., Oike, M., Shirai, T., Sasazuki, T., Haematopoietic cell-specific CDM family protein DOCK2 is essential for lymphocyte migration, *Nature*, 412: 826-31, 2001.
65. Namekata, K., Enokido, Y., Iwasawa, K., Kimura, H., MOCA induces membrane spreading by activating Rac1, *J.B.C.*, 279: 14331-7, 2004.
66. Settleman, J., Narasimhan, V., Foster, L.C., Weinberg, R.A., Molecular cloning of cDNAs encoding the GAP-associated protein p190: implications for a signaling pathway from ras to the nucleus, *Cell*, 69: 539-49, 1992.
67. Chang, J.H., Gill, S., Settleman, J., Parsons, S.J., c-Src regulates the simultaneous rearrangement of actin cytoskeleton, p190RhoGAP, and p120RasGAP following

- epidermal growth factor stimulation, *J.C.B.*, 130: 355-68, 1995.
68. Arthur, W.T., Petch, L.A., Burridge, K., Integrin engagement suppresses RhoA activity via a c-Src-dependent mechanism, *Current Biology*, 10: 719-22, 2000.
69. Ligeti, E., Dagher, M.C., Hernandez, S.E., Koleske, A.J., Settleman, J., Phospholipids can switch the GTPase substrate preference of a GTPase-activating protein, *J.B.C.*, 279: 5055-8, 2004.
70. Michiels, F., Collard, J.G., Rho-like GTPases: their role in cell adhesion and invasion, *Biochemical Society Symposia*, 65:125-46, 1999.
71. Soga, N., Namba, N., McAllister, S., Cornelius, L., Teitelbaum, S.L., Dowdy, S.F., Kawamura, J., Hruska, K.A., Rho family GTPases regulate VEGF-stimulated endothelial cell motility, *Experimental Cell Research*, 269: 73-87, 2001.
72. Lamalice, L., Houle, F., Jourdan, G., Huot, J., Phosphorylation of tyrosine 1214 on VEGFR2 is required for VEGF-induced activation of Cdc42 upstream of SAPK2/p38, *Oncogene*, 23: 434-45, 2004.
73. Rousseau, S., Houle, F., Kotanides, H., Witte, L., Waltenberger, J., Landry, J., Huot, J., Vascular endothelial growth factor (VEGF)-driven actin-based motility is mediated by VEGFR2 and requires concerted activation of stress-activated protein kinase 2 (SAPK2/p38) and geldanamycin-sensitive phosphorylation of focal adhesion kinase, *J.B.C.*, 275:10661-72, 2000.
74. Kobayashi, M., Nishita, M., Mishima, T., Ohashi, K., Mizuno, K., MAPKAPK-2-mediated LIM-kinase activation is critical for VEGF-induced actin remodeling and cell migration, *EMBO Journal*, 25: 713-26, 2006.
75. Yamazaki, D., Suetsugu, S., Miki, H., Kataoka, Y., Nishikawa, S., Fujiwara, T., Yoshida, N., Takenawa, T., WAVE2 is required for directed cell migration and cardiovascular development, *Nature*, 424: 452-6, 2003.
76. Ikeda, S., Ushio-Fukai, M., Zuo, L., Tojo, T., Dikalov, S., Patrushev, N.A., Alexander, R.W., Novel role of ARF6 in vascular endothelial growth factor-induced signaling and angiogenesis, *Circulation Research*, 96: 467-475, 2005.
77. Werdich, X.Q., Penn, J.S., Src, Fyn and Yes play differential roles in VEGF-mediated endothelial cell events, *Angiogenesis*, 8: 315-26, 2005.
78. Toyofuku, T., Yabuki, M., Kamei, J., Kamei, M., Makino, N., Kumanogoh, A., Hori,

- M., Semaphorin-4A, an activator for T-cell-mediated immunity, suppresses angiogenesis via Plexin-D1, *EMBO Journal*, 26: 1373-84, 2007.
79. Lock, LS, Royal, I, Naujokas MA, Park, M, *JBC*, 275: 31536-31545, 2000.
80. Enomoto, T., Okamoto, T., Sato, JD., Vascular endothelial growth factor induces the disorganization of actin stress fibers accompanied by protein tyrosine phosphorylation and morphological change in Balb/C3T3 cells, *Biochemical & Biophysical Research Communications*, 202:1716-23, 1994.
81. Waltenberger, J., Claesson-Welsh, L., Siegbahn, A., Shibuya, M., Heldin, C.H., Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor, *J.B.C.*, 269: 26988-95, 1994.
82. Kallin, A., Demoulin, J.B., Nishida, K., Hirano, T., Ronnstrand, L., Heldin, C.H., Gab1 contributes to cytoskeletal reorganization and chemotaxis in response to platelet-derived growth factor, *J.B.C.*, 279: 17897-904, 2004. /
83. Mitchison, T.J., Cramer, L.P., Actin-based cell motility and cell locomotion, *Cell*, 84: 371-379, 1996.
84. Gong, C., Stoletov, K.V., Terman, B.I., VEGF treatment induces signaling pathways that regulate both actin polymerization and depolymerization, *Angiogenesis*, 7: 313-321, 2004.
85. Garrett, T.A., Van Buul, J.D., Burrige, K., VEGF-induced Rac1 activation in endothelial cells is regulated by the guanine nucleotide exchange factor Vav2, *Experimental Cell Research*, 313: 3285-3297, 2007.
86. Eriksson, A., Cao, R., Roy, J., Tritsarlis, K., Wahlestedt, C., Dissing, S., Thyberg, J., Cao, Y., Small GTP-binding protein Rac is an essential mediator of vascular endothelial growth factor-induced endothelial fenestrations and vascular permeability, *Circulation*, 107: 1532-8, 2003.
87. Bustelo, X.R., Regulatory and signaling properties of the Vav family, *M.C.B.*, 20 1461-1477, 2000.
88. Watanabe, T., Tsuda, M., Makino, Y., Ichihara, S., Sawa, H., Minami, A., Mochizuki, N., Nagashima, K., Tanaka, S., Adaptor molecule Crk is required for sustained phosphorylation of Grb2-associated binder protein 1 and hepatocytogrowth factor-induced cell motility of human synovial sarcoma cell lines, *Molecular Cancer*

- Research, 4: 499-510, 2006.
89. Makino, Y., Tsuda, M., Ichihara, S., Watanabe, T., Sakai, M., Sawa, H., Nagashima, K., Hatakeyama, S., Tanaka, S., Elmo1 inhibits ubiquitylation of DOCK180, *J. of Cell Science*, 119: 923-932, 2005.
  90. Olsson AK, Dimberg, A., Kreuger, J., Claesson-Welsh, L., VEGF receptor signaling- in control of vascular function, *Nature Reviews-M.C.B.*, 7: 359-371, 2006.
  91. Lampugnani, M.G., Zanetti, A., Breviario, F., Balconi, G., Orsenigo, F., Corada, M., Spagnuolo, R., Betson, M., Braga, V., Dejana, E., VE-Cadherin regulates endothelial actin activating Rac and increasing membrane ruffling of Tiam, *M.B.C.*, 13 : 1175-1189, 2002.
  92. Wójciak-Stothard, B, Potempa, S., Eichholtz, T., Ridley, A.J., Rho and Rac but not Cdc42 regulate endothelial cell permeability, *J. of Cell Science*, 114: 1343-1355, 2001.
  93. Sells, M.A., Knaus, U.G., Bagrodia, S., Ambrose, D.M., Bokoch, G.M., Chernoff, J., Human p21-activated kinase (Pak1) regulates actin organization in mammalian cells, *Current Biology*, 7: 202-210, 1997.
  94. Zhao, C., Ma, H., Wetzel, E.B., Lipton, S.A., Zhang, Z., Feng, G.S., GC-Gap, a rho family GTPase-activating protein that interacts with signaling adapters Gab1 and Gab2, *J.B.C.*, 278: 34641-34653, 2003.
  95. Yu, D.H., Qu, C.K., Henegariu, O., Lu, X., Feng, G.S., Protein-tyrosine phosphatase Shp-2 regulates cell spreading, migration, and focal adhesion, *Journal J.B.C.*, 273: 21125-31, 1998.
  96. Manes, S., Mira, E., Gomez-Mouton, C., Zhao, Z.J., Lacalle, R.A., Martinez-A, C., Concerted activity of tyrosine phosphatase SHP-2 and focal adhesion kinase in regulation of cell motility, *M.C.B.*, 19: 3125-35, 1999.
  97. Inagaki, K., Noguchi, T., Matozaki, T., Horikawa, T., Fukunaga, K., Tsuda, M., Ichihashi, M., Kasuga, M., Roles for the protein tyrosine phosphatase SHP-2 in cytoskeletal organization, cell adhesion and cell migration revealed by overexpression of a dominant negative mutant, *Oncogene*, 19: 75-84, 2000.
  98. Schoenwaelder, S.M., Petch, L.A., Williamson, D., Shen, R., Feng, G.S., Burridge, K., The protein tyrosine phosphatase Shp-2 regulates RhoA activity, *Current Biology*,

- 10: 1523-6, 2000.
99. Neel, B.G., Gu, H., Pao, L., The 'Shp'ing news: SH2 domain-containing tyrosine phosphatases in cell signaling, *Trends in Biochemical Sciences*, 28: 284-93, 2003.
  100. Zondag, G.C., Evers, E.E., ten Klooster, J.P., Janssen, L., van der Kammen, R.A., Collard, J.G., Oncogenic Ras downregulates Rac activity, which leads to increased Rho activity and epithelial mesenchymal transition, *J.C.B.*, 149: 775-782, 2000.
  101. Zhang, S.Q., Yang, W., Kontaridis, M.I., Bivona, T.G., Wen, G., Araki, T., Luo, J., Thompson, J.A., Schraven, B.L., Philips, M.R., Neel, B.G., Shp2 regulates SRC family kinase activity and Ras/Erk activation by controlling Csk recruitment, *Molecular Cell*, 13: 341-55, 2004.
  102. Ren, Y., Meng, S., Mei, L., Zhao, Z.J., Jove, R., Wu, J., Roles of Gab1 and SHP2 in paxillin tyrosine dephosphorylation and Src activation in response to Epidermal Growth factor, *J.B.C.*, 279: 8497-8505, 2004.
  103. Ewan, L.C., Jopling, H.M., Jia, H., Mittar, S., Bagherzadeh, A., Howell, G.J., Walker, J.H., Zachary, I.C., Ponnambalam, S., Intrinsic tyrosine kinase activity is required for vascular endothelial growth factor receptor 2 ubiquitination, sorting and degradation in endothelial cells, *Traffic*, 7: 1270-1282, 2006.