

Université de Montréal

**Implication de la protéine tyrosine phosphatase DEP-1
dans la perméabilité vasculaire induite par le VEGF**

par

Simon Langlois

Programmes de biologie moléculaire

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine
en vue de l'obtention du grade de Maître ès sciences (M.Sc.)
en Biologie moléculaire
Option générale

Décembre 2011

© Simon Langlois, 2011

Université de Montréal
Faculté de médecine

Ce mémoire intitulé :

Implication de la protéine tyrosine phosphatase DEP-1 dans la perméabilité vasculaire
induite par le VEGF

Présenté par :
Simon Langlois

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Francis Rodier, président-rapporteur
Isabelle Royal, directrice de recherche
Borhane Annabi, membre du jury

Résumé

La perméabilité vasculaire est une caractéristique cruciale de l'angiogenèse. Les acteurs principaux sont les cellules endothéliales qui la régulent en réponse à divers facteurs perméabilisant, tels que le « Vascular Endothelial Growth Factor » (VEGF). Dans le contexte pathologique du cancer, les cellules tumorales produisent de grandes quantités de VEGF qui stimulent la perméabilité, ce qui leur permet d'infiltrer le réseau vasculaire. Il est connu que la tyrosine kinase Src contrôle cette modulation de la perméabilité. Puisque notre laboratoire a préalablement démontré que la phosphatase de type récepteur (PTP) DEP-1 est impliquée dans l'activation de Src en réponse au VEGF, nous avons émis l'hypothèse que DEP-1 pourrait aussi jouer un rôle dans la perméabilité des cellules endothéliales. Grâce à des expériences de transfections d'ARN interférant, nous démontrons que DEP-1 est important pour la régulation de la phosphorylation de la VE-Cadhérine, un médiateur critique de la perméabilité. L'impact de DEP-1 sur la dissociation de jonctions intercellulaires est également démontré par microscopie à immunofluorescence de cellules endothéliales. DEP-1 est également nécessaire à l'augmentation de la perméabilité induite par VEGF *in vitro*. Deux résidus tyrosine retrouvés dans la queue carboxy-terminale de DEP-1 sont essentiels à l'activation de Src en réponse au VEGF. Suite à la transfection d'un plasmide encodant DEP-1 muté pour ces deux résidus, nous démontrons aussi leur implication dans la régulation de la perméabilité *in vitro* par DEP-1. Ces travaux permettent ainsi d'approfondir nos connaissances sur un nouveau régulateur potentiel de la perméabilité vasculaire.

Mots-clés : Perméabilité vasculaire, VEGF, DEP-1, Src

Abstract

Endothelial cell permeability is a crucial step of angiogenesis. The main actors behind permeability are endothelial cells who accomplish this in response to permeabilizing factors, most notably Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF). In a pathological context, migrating tumor cells produce great quantities of VEGF that stimulate an increase of vascular permeability, which allows them to intravasate into the vasculature. Src has been shown to mediate this process. Our laboratory has previously shown that the protein tyrosine phosphatase DEP-1 is involved in the regulation of VEGF-dependant activation of Src. These data thus suggested that DEP-1 might play a role in endothelial cell permeability. Here, we show through siRNA experiments that DEP-1 is important for the regulatory phosphorylation of VE-Cadherin which is critical for the induction of permeability. The impact of DEP-1 on intercellular junction dissociation is also demonstrated through immunofluorescence microscopy of endothelial cells. We further show that DEP-1 is absolutely required for the VEGF-dependent increase of permeability as illustrated by *in vitro* permeability assay on siRNA-transfected endothelial cells. Finally, we show that tyrosine residues in DEP-1's carboxy-terminal tail, which are crucial for mediating Src activity in response to VEGF, are implicated in VEGF-dependant increase in permeability by transfecting plasmids coding for DEP-1 mutants of these tyrosine residues. These findings shed light on a novel potential key regulator of *in vivo* permeability.

Keywords : Vascular Permeability, VEGF, DEP-1, Src

Table des matières

Résumé	iii
Abstract.....	iv
Table des matières	v
Liste des figures	vii
Liste des abréviations	ix
Chapitre 1 : Introduction.....	1
1.1. Cancer	1
1.2. Angiogenèse	3
1.2.1. Contribution de l'angiogenèse à divers processus pathologiques.....	5
1.2.2. Mécanisme cellulaire d'angiogenèse : le bourgeonnement angiogénique	8
1.3. Perméabilité	12
1.4. Les VEGFs et les VEGFRs.....	14
1.5. Src	19
1.6. Régulation moléculaire de la perméabilité par le VEGF et la kinase Src	21
1.7. DEP-1.....	24
1.8. Travaux antérieurs du laboratoire	27
1.9. But et Hypothèse	29
1.10. Résumé de l'étude	30
Chapitre 2 : Matériel et méthodes	32
<i>Culture cellulaire.</i>	32
<i>Réactifs et anticorps.</i>	32
<i>Constructions d'ADNc.</i>	33
<i>Immunodétection et immunoprécipitation.</i>	33
<i>Phosphorylation endogène de DEP-1 dans les HUVECs.</i>	34
<i>Transfection des ARNi dans les HUVECs.</i>	34
<i>Transfection d'ADNc de DEP-1 dans les BAECs et les HUVECs.</i>	35

<i>Immunofluorescence</i>	35
<i>Test de perméabilité endothéliale</i>	36
Chapitre 3 : Résultats	37
<i>DEP-1 est impliquée dans la phosphorylation de la VE-Cadhérine dépendante du VEGF</i>	37
<i>DEP-1 est importante pour le relâchement des jonctions intercellulaires</i>	40
<i>DEP-1 est nécessaire pour la perméabilité vasculaire in vitro induite par le VEGF</i>	43
<i>Caractérisation des anticorps p^{Y1311} DEP-1 et p^{Y1320} DEP-1</i>	45
Phosphorylation des résidus tyrosine 1311 et 1320 de DEP-1 en réponse au VEGF dans les cellules HUVECs.	47
<i>La transfection de DEP-1 sauvage augmente la phosphorylation sur Y1320 tandis que la transfection de DEP-1 Y1311F/Y1320F la diminue</i>	49
<i>Les résidus tyrosine 1311 et 1320 sont essentiels pour la promotion de la perméabilité des cellules HUVECs stimulées au VEGF</i>	52
Chapitre 4 : Discussion	54
Chapitre 5 : Perspectives	65
Chapitre 6 : Conclusions	71
Chapitre 7 : Références	72

Liste des figures

Figure 1 : Les caractéristiques communes des cancers.....	2
Figure 2 : Schématisation de la formation de vaisseaux sanguins lors du développement....	4
Figure 3 : Mécanismes de recrutement de nouveaux vaisseaux sanguins par les cellules tumorales.....	6
Figure 4 : Fonctions biologiques distinctes des cellules endothéliales impliquées dans la formation de nouveaux vaisseaux sanguins par bourgeonnement.....	11
Figure 5 : Les mécanismes de perméabilité endothéliale.....	13
Figure 6 : Les récepteurs VEGFR, leurs ligands et leurs localisations.....	15
Figure 7 : Sites de phosphorylation du VEGFR2.....	16
Figure 8 : Mécanisme d'activation de Src.....	19
Figure 9 : Régulation moléculaire de la perméabilité par le VEGF et la kinase Src.....	23
Figure 10 : Structure moléculaire de DEP-1.....	24
Figure 11 : Mutation embryonnaire de DEP-1.....	26
Figure 12 : Fonctions de DEP-1 aux jonctions adhérentes.....	27
Figure 13 : Mécanisme d'activation de Src par DEP-1.....	28
Figure 14 : La diminution de l'expression de DEP-1 diminue la phosphorylation des résidus de la VE-Cadhérine en réponse au VEGF.....	39
Figure 15 : La déplétion de DEP-1 empêche le relâchement des liens intercellulaires induit par le VEGF.....	42
Figure 16 : La réduction de l'expression de DEP-1 renverse l'augmentation de la perméabilité induite par le VEGF.....	44
Figure 17 : Les anticorps p ^{Y1311} DEP-1 et p ^{Y1320} DEP-1 sont spécifiques, et DEP-1 est phosphorylée sur ses résidus carboxy-terminaux Y1311 et Y1320 en réponse au VEGF dans les cellules HUVECs.....	46
Figure 18 : DEP-1 est phosphorylée sur Y1311 et Y1320 en réponse au VEGF dans les cellules HUVECs, d'une façon concomitante avec la phosphorylation sur Y418 de Src.....	48

Figure 19 : La transfection de DEP-1 YY/FF bloque entièrement la phosphorylation sur Y1320 dans les cellules endothéliales stimulées au VEGF.	51
Figure 20 : Les résidus Y1311 et Y1320 de DEP-1 sont impliqués dans l'activation de la perméabilité des cellules HUVECs stimulées au VEGF.....	53

Liste des abréviations

ADN = Acide désoxyribonucléique
ADNc = Acide désoxyribonucléique complémentaire
Ang2 = Angiopoietine-2
ARN = Acide ribonucléique
ARNi = Acide ribonucléique interférant
BAEC = *Bovine aortic endothelial cells*
bcl-2 = *B cell lymphoma-2*
C = cystéine
cAMP = *Cyclic adenosine monophosphate*
cGMP = *Cyclic guanosine monophosphate*
CHO = *Chinese hamster ovary*
DEP-1 = *Density-enhanced phosphatase-1*
DMEM = *Dulbecco's modified eagle medium*
DTT = Dithiotreitol
E = Acide aspartique
EGFR = *Epidermal growth factor receptor*
Erk = *Extracellular regulated kinase*
ERK1/2 = *Extracellular regulated kinase 1/2*
F = Phénylalanine
FAK = *Focal adhesion kinase*
FBS = *Fetal bovine serum*
FGF = *Fibroblast growth factor*
FITC = Fluoresceine Isothiocyanate
Flk-1 = *Fetal liver kinase-1*
Flt-1 = *FMS-like tyrosine kinase-1*
Flt-3 = *FMS-like tyrosine kinase-3*
Flt-4 = *FMS-like tyrosine kinase-4*

Gab1 = *Grb2-associated-binding protein 1*
GEF = *Guanine-nucleotide-exchange factor*
GFP = *Green fluorescent protein*
GSK3 β = *Glycogen synthase kinase 3 β*
GTP = *Guanosine triphosphatase*
HGF = *Hepatocyte growth factor*
HGFR = *Hepatocyte growth factor receptor*
HUVEC = *Human umbilical vein endothelial cells*
JAK2 = *Janus kinase 2*
kDa = kiloDalton
KDR = *Kinase insert domain receptor*
MAPK = *Mitogen-activated protein kinase*
MCP-1 = *Monocyte chemotactic protein-1*
MMP = *Métalloproteinase de la matrice*
NO = *Nitric oxide*
NOS = *Nitric oxyde synthase*
Pak = *p12-activated kinase*
PDGF- β = *Platelet-derived growth-factor*
PDGF- β = *Platelet-derived growth-factor- β*
PDGFR = *Platelet-derived growth-factor receptor*
PI3K = *Phosphatidylinositol 3-kinase*
PIGF = *Placental growth factor*
PKC = *Protein kinase C*
PLC γ = *Phospholipase C γ*
PMSF = *Phénylméthanesulfonyl fluoride*
PTP = *Protéine-Tyrosine Phosphatase*
Rac = *Ras-related C3 botulinum toxin substrate*
S = *Sérine*
SDS = *Sodium dodecyl-sulfate*
SFK = *Famille des kinases Src*

SH2 = *Src-homology 2*

SHP-2 = *Src-homology 2 domain-containing protein tyrosine phosphatase*

SNP = *Single nucleotide polymorphisms*

Src = *Sarcome*

SSTR1 = *Somatostatin Receptor 1*

TCR = *T cell receptor*

TGF- β 1 = *Transforming growth factor β 1*

uPA = *urokinase ou urokinase-type plasminogen activator*

uPAR = *urokinase-type plasminogen activator receptor*

Vav2 = *Vav 2 guanine nucleotide exchange factor*

VE-Cadhérine = *Vascular endothelial-cadhérine*

VEGF = *Vascular endothelial growth factor*

VEGF-A = *Vascular endothelial growth factor-A*

VEGF-B = *Vascular endothelial growth factor-B*

VEGF-C = *Vascular endothelial growth factor-C*

VEGF-D = *Vascular endothelial growth factor-D*

VEGFR1 = *Vascular endothelial growth factor receptor 1*

VEGFR2 = *Vascular endothelial growth factor receptor 2*

VEGFR3 = *Vascular endothelial growth factor receptor 3*

VPF = *Vascular Permeability Factor*

WT = *Wild-type*

Y = *Tyrosine*

ZO-1 = *Zona occludine-1*

Remerciements

J'aimerais remercier tous les membres de l'Institut du Cancer de Montréal qui ont fait de la durée de ma maîtrise une expérience agréable, partagée avec des personnes généreuses et attentionnées. J'aimerais aussi remercier les organismes subventionnaires et également le support financier apporté par ma Directrice de maîtrise, Isabelle Royal.

J'aimerais remercier les membres de mon laboratoire, plus particulièrement Kathleen Spring, Christine Caron et Line Lapointe, à qui j'ai dû poser des millions de questions, pertinentes ou non, et demander de l'aide avec des expériences, sans jamais recevoir de refus ou de réticence. Sans leur expertise ou leur gentillesse, il est certain que mon parcours en tant que candidat à la maîtrise aurait été tout autre, beaucoup plus difficile et périlleux. Je voudrais de plus souligner l'apport de Kathleen Spring, candidate au doctorat qui travaille sur le même projet que moi-même avec qui j'ai eu le plaisir de travailler en étroite collaboration. D'ailleurs des preuves de ceci se retrouvent dans ce mémoire, car nous avons fait les expériences de phosphorylation de la tyrosine 1320 de DEP-1 dans les BAECs ensemble.

La prochaine personne à remercier, et non la moindre, est ma directrice de maîtrise, Dr. Isabelle Royal. Sans elle rien de ceci n'aurait été possible, car c'est elle qui a bien sûr pris un risque en me choisissant comme étudiant. Elle a su voir mon potentiel et m'a permis de l'exprimer. Sa présence constante, sa grande intelligence et gentillesse et son appui ont été indispensables à la réalisation des travaux dans ce mémoire.

Merci.

Chapitre 1 : Introduction

1.1. Cancer

L'étude du cancer est extrêmement complexe et requiert une quantité phénoménale d'effort avant d'accomplir quelque progrès que ce soit. En effet, malgré tous les accomplissements résultants du travail concerté de chercheurs, médecins ainsi que tous les travailleurs du milieu de la santé, certains cancers demeurent toujours aussi meurtriers et fréquents. Ceci ne devrait pas inspirer le désespoir, mais bien la détermination et la quête du défi chez tous ceux qui mènent le combat. La réalité peut être expliquée par le caractère multifactoriel des causes de cette maladie qui peuvent tout aussi bien être exogènes (comme des agents transformants ou mutagènes) ou endogènes (comme des prédispositions génétiques), ainsi que par les mécanismes que les cellules cancéreuses utilisent afin de contourner la défense montée par le corps ou par les thérapies administrées.

Pour comprendre la maladie, la recherche doit passer par la compréhension à la fois de chaque aspect individuel, mais également par l'intégration de tous ces éléments. Dans cette optique, l'article « The Hallmarks of Cancer » de Hanahan et Weinberg en 2000, détaille 6 caractéristiques communes retrouvées chez la plupart des cancers. Ces dernières sont : l'échappement à la mort cellulaire auto-programmée (soit l'apoptose), l'indépendance aux facteurs de croissance, l'insensibilité face aux signaux inhibiteurs de la croissance, l'invasion dans les tissus et la formation de métastases, le potentiel réplicatif illimité, et finalement l'angiogenèse (Hanahan, 2000). Cette conception de la maladie fut d'ailleurs mise à jour récemment dans une autre publication provenant de ces auteurs, soit « Hallmarks of Cancer : The Next Generation » en 2011. Cette actualisation ajoute premièrement d'autres caractéristiques communes émergentes. Celles-ci sont : la dérégulation du métabolisme cellulaire afin de promouvoir la progression néoplasique ainsi

que la capacité d'éviter la destruction par le système immunitaire (Hanahan, 2011). Deuxièmement, deux autres caractéristiques s'ajoutent, qui elles sont plutôt des caractéristiques essentielles qui provoquent l'avènement du cancer ou qui en facilitent la progression. Elles sont : l'inflammation pro-tumorales et l'instabilité génomique ou l'apparition de mutations (Hanahan, 2011) (Figure 1). Notre laboratoire s'intéresse particulièrement à l'angiogénèse, et ce sujet sera abordé tout au long de ce mémoire.

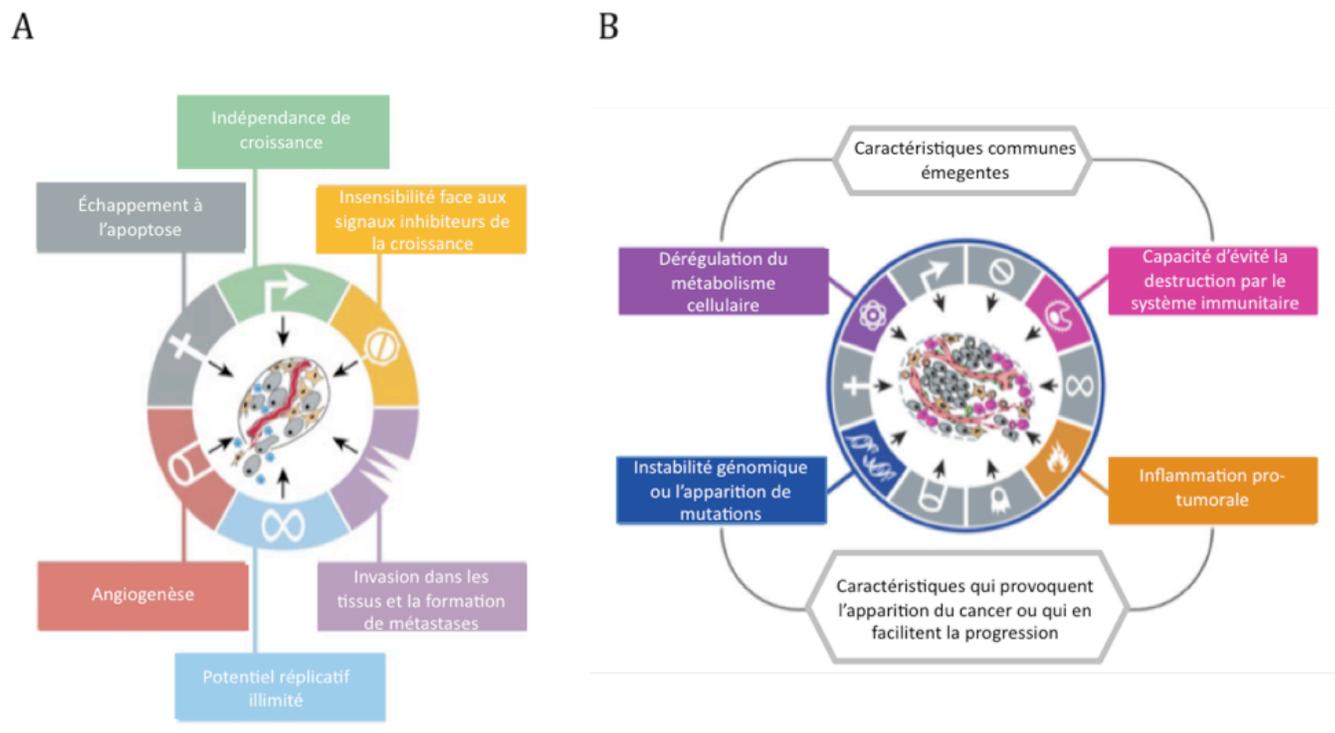


Figure 1 : Les caractéristiques communes des cancers.

A : L'échappement à la mort cellulaire auto-programmée (soit l'apoptose), l'indépendance de croissance (sans le besoin de facteurs de croissance), l'insensibilité face aux signaux inhibiteurs de la croissance, l'invasion dans les tissus et la formation de métastases, le potentiel réplcatif illimité et finalement l'angiogénèse sont des traits définissants de la plupart des cancers. Figure tirée de Hanahan, 2000. B : La dérégulation du métabolisme cellulaire afin de promouvoir la progression néoplasique ainsi que la capacité d'éviter la destruction par le système immunitaire sont des caractéristiques communes aux cancers récemment identifiées. L'inflammation pro-tumorale et l'instabilité génomique ou l'apparition de mutations sont des caractéristiques qui provoquent l'apparition du cancer ou qui en facilitent la progression. Figure tirée de Hanahan, 2011.

1.2. Angiogenèse

Les vaisseaux sanguins sont apparus au cours de l'évolution suite au besoin de transporter de l'oxygène à des organes distants chez des organismes vivants de plus en plus de grande taille (Carmeliet, 2005). La formation de vaisseaux sanguins est donc cruciale pour la croissance des organes chez l'embryon, ce qui lui fournit l'oxygène nécessaire pour se développer (Carmeliet, 2005). Il existe plusieurs procédés menant à la formation d'un système vasculaire mature et fonctionnel. En premier lieu, des précurseurs des cellules endothéliales (principales cellules constituant les vaisseaux sanguins) sont recrutés afin de former un réseau vasculaire primitif, processus connu sous le nom de vasculogénèse (Carmeliet, 2005; Conway, 2001; Ferguson 3rd, 2005).

Par la suite survient l'angiogenèse, qui est le processus de formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux préexistants (Carmeliet, 2005; Conway, 2001). Le réseau vasculaire primitif initial s'agrandit et se ramifie en un système hautement structuré et organisé via le bourgeonnement de nouveaux vaisseaux émergents ainsi que le remodelage des vaisseaux (Carmeliet, 2005). L'angiogenèse se produit donc surtout lors du développement (Carmeliet, 2005). En effet, une fois le réseau vasculaire formé, la formation de nouveaux vaisseaux sanguins n'est sollicitée que lors de la guérison de blessures, lors du cycle ovarien et dans le placenta pendant la grossesse (Carmeliet, 2005; Bergers, 2003).

Suite à l'angiogenèse, les vaisseaux nouvellement formés de cellules endothéliales deviennent recouverts de péricytes et de cellules de muscles lisses, ce qui confère de la stabilisation et permet le contrôle de la perfusion sanguine (Carmeliet, 2005). Ce processus est connu sous le nom d'artériogénèse (Figure 2).

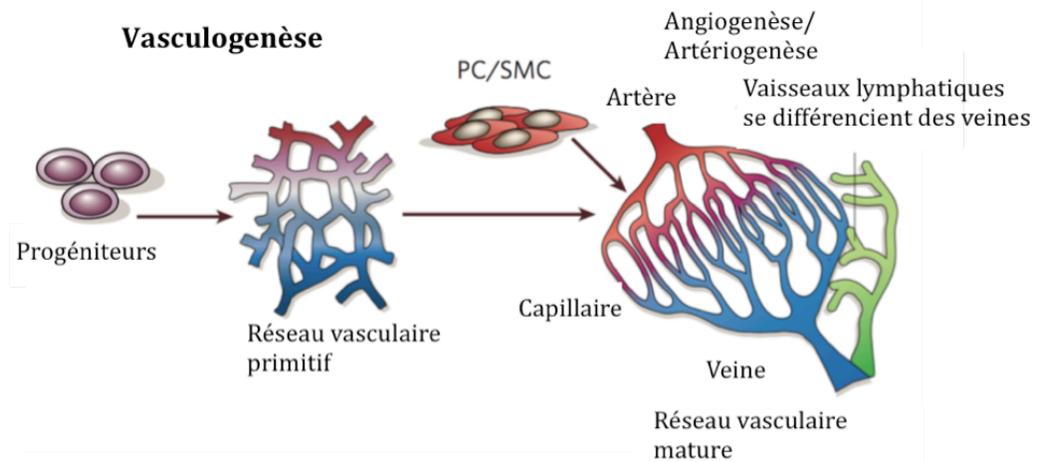


Figure 2 : Schématisation de la formation de vaisseaux sanguins lors du développement.

Premièrement a lieu le recrutement de précurseurs de cellules endothéliales afin de former le réseau vasculaire initial primitif, soit la vasculogénèse. Ensuite ont lieu la complexification et la ramification du réseau vasculaire par le bourgeonnement et le remodelage de nouveaux vaisseaux sanguins, soit l'angiogenèse. Figure modifiée de Carmeliet, 2005. PC/SMC = Péricytes/Cellules du muscle lisse

1.2.1. Contribution de l'angiogenèse à divers processus pathologiques

Il y a une certaine irrégularité dans le fait que l'angiogenèse, sensée devenir facultative une fois l'âge adulte atteint, puisse devenir une composante importante de la progression du cancer. Cependant, cette situation peut être expliquée. En effet, une fois l'âge adulte atteint, les cellules endothéliales deviennent quiescentes, car la formation de nouveaux vaisseaux sanguins n'est pas requise. Malgré cela, les cellules endothéliales conservent leur capacité à proliférer en réponse à des stimuli physiologiques (Carmeliet, 2005). C'est pour cette raison que l'angiogenèse peut être réactivée tout au long de la vie suite à l'embryogenèse. Un dérèglement de cette stimulation, et donc de la formation de nouveaux vaisseaux sanguins, est toutefois mis à profit dans plusieurs conditions pathologiques.

L'angiogenèse contribue ainsi au développement de maladies inflammatoires, du psoriasis et des maladies auto-immunes lorsqu'il y a une sécrétion exagérée de facteurs pro-angiogéniques (Carmeliet, 2005; Carmeliet, 2003). Ces maladies sont caractérisées par un développement vasculaire excessif et/ou par la dérégulation du passage des cellules qui composent ces pathologies à travers le système sanguin. Des phénomènes de stimulation insuffisante de l'angiogenèse peuvent également contribuer au développement de maladies cardiovasculaires causées par la dysfonction des cellules endothéliales, résultant en la malformation de vaisseaux sanguins ou en l'incapacité de revasculariser (Carmeliet, 2005; Carmeliet, 2003). De plus, certaines maladies congénitales ou héritées sont causées par des défauts de remodelage vasculaire (Carmeliet, 2003), comme l'hypoplasie ventriculaire (Hickey, 2012), la calcification artérielle (London, 2011) et l'hypertension artérielle (Agarwal, 2011).

L'angiogenèse contribue grandement à la progression tumorale, comme énoncée précédemment. Lors de la progression initiale d'une tumeur, les cellules cancéreuses poussent à un rythme accéléré et éprouvent rapidement un besoin grandissant en oxygène et en nutriments. Celui-ci doit être satisfait sinon les cellules tumorales entreront en hypoxie

suivie, possiblement, d'une mort par apoptose (Papetti, 2002). Les cellules cancéreuses influencent donc leur environnement afin d'induire la formation de nouveaux capillaires pouvant les atteindre, voire les traverser. Ceci permet de leur fournir de l'oxygène et en nutriments, leur permettant de survivre et même de croître au-delà de 1-2 mm³ (Bergers, 2003). Cette influence se traduit en plusieurs phénomènes cellulaires. Le premier, le recrutement de précurseurs de cellules endothéliales par des facteurs pro-angiogéniques, ne semble se produire qu'à une faible fréquence (Rafii, 2002; Hattori, 2001; Hattori, 2002). Le deuxième est l'intussusception, soit la division de vaisseaux sanguins préexistants. Il y a également la lymphangiogénèse, soit la formation de nouveaux vaisseaux lymphatiques ainsi que l'angiogénèse, soit l'émergence de nouveaux vaisseaux sanguins (Carmeliet, 2000). L'angiogénèse est sans aucun doute le mécanisme le plus fréquemment utilisé par les cellules tumorales parmi les exemples énumérés (Bergers, 2003).

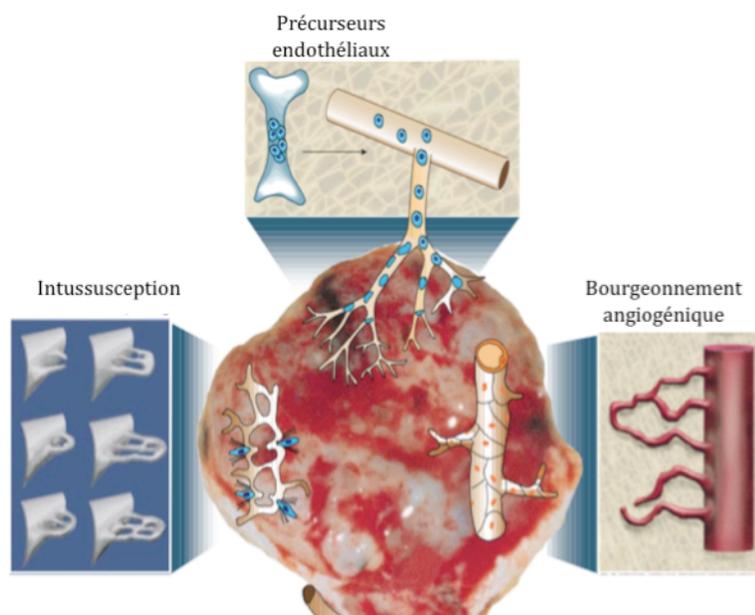


Figure 3 : Mécanismes de recrutement de nouveaux vaisseaux sanguins par les cellules tumorales.

Lors de la croissance effrénée des cellules tumorales, celles-ci éprouvent des besoins croissants en nutriments et en oxygène. Pour satisfaire ces derniers, les tumeurs promeuvent la formation de vaisseaux sanguins tumoraux des manières suivantes : recrutement de précurseurs de cellules endothéliales (angioblastes); remodelage, division et ramification de vaisseaux préexistants, soit l'intussusception ainsi que le bourgeoisement de nouveaux vaisseaux sanguins. Figure adaptée de Carmeliet, 2000.

La capacité de la tumeur à induire la formation d'un réseau vasculaire tumoral, (« Angiogenic Switch ») est donc une étape cruciale de la progression tumorale (Bergers, 2003). Cette induction peut survenir à n'importe quelle étape de la tumorigénèse (incluant celle de la formation de métastases) et dépend du type de cancer et du microenvironnement tumoral (Bergers, 2003). Elle est régulée séquentiellement par plusieurs activateurs et inhibiteurs. C'est d'ailleurs cette balance de facteurs pro- et anti-angiogéniques qui différencient les vaisseaux normaux des vaisseaux tumoraux. Les facteurs pro-angiogéniques incluent les VEGFs, les FGFs, le PDGFB, l'EGF et le LPA tandis que les facteurs anti-angiogéniques incluent la Thrombospondine-1, l'Angiostatine, l'Endostatine, la Canstatine et la Tumstatine (Bergers, 2003). La régulation par les facteurs pro- et anti-angiogéniques est donc totalement déficiente dans les tumeurs, faisant en sorte que les vaisseaux sanguins tumoraux ne deviennent pas quiescents et prolifèrent sans cesse (Bergers, 2003). Ils se développent irrégulièrement, formant des réseaux avec des formes anormales, dilatées, et tortueuses. Les vaisseaux sanguins formés par les tumeurs sont souvent susceptibles de développer des fuites et même devenir hémorragiques (Bergers, 2003). Il arrive même que les cellules tumorales s'intègrent elles-mêmes dans la structure vasculaire (Folberg, 2000; McDonald, 2000). De plus, les vaisseaux sanguins tumoraux se forment avec une association moindre ou défectueuse de péricytes, ce qui explique leur sensibilité accrue à l'inhibition de facteurs de survie vasculaire comme traitement utilisé dans le contexte du cancer (Benjamin, 1999; Benjamin, 1997).

1.2.2. Mécanisme cellulaire d'angiogenèse : le bourgeonnement angiogénique

La formation de vaisseaux sanguins est un procédé qui requiert une régulation fine par une variété de mécanismes et de régulateurs, un travail qui est accompli par plusieurs signaux stimulateurs ou inhibiteurs (Eilken, 2010). Cette régulation fait en sorte que l'angiogenèse peut être effectuée d'une manière ordonnée et structurée pour donner une réponse précise aux stimuli pro-angiogéniques. Le modèle expliquant le mécanisme cellulaire de ce phénomène le plus prévalent dans la littérature actuelle est celui de l'angiogenèse par bourgeonnement ("sprouting angiogenesis") (Eilken, 2010), qui sera expliqué dans cette section.

Le processus d'angiogenèse nécessite l'activation de plusieurs fonctions biologiques des cellules endothéliales (Eilken, 2010). Celles-ci incluent : 1) le remodelage des liens cellules-cellules menant à la modulation de la perméabilité vasculaire; 2) l'invasion à travers la matrice extracellulaire via la sécrétion de facteurs permettant la dégradation de cette dernière; 3) la migration dirigée des cellules dans le sens du gradient de facteur pro-angiogénique formé; 4) la prolifération des cellules, ainsi que 5) le maintien de la survie des cellules (Conway, 2001).

L'étape la plus précoce du processus de néo-angiogenèse est la perméabilité des capillaires pré-existants. Celle-ci permet l'extravasation de protéines plasmatiques qui établissent une matrice provisoire sur laquelle les cellules endothéliales peuvent migrer (Bergers, 2003). L'établissement d'une matrice provisoire est accompagné d'un détachement des péricytes et d'un relâchement des liens cellules-cellules. Les jonctions adhérentes ainsi que les jonctions serrées, qui composent en partie les jonctions intercellulaires, procurent de la force mécanique ainsi qu'une barrière contre la perméabilité des vaisseaux (Carmeliet, 2003). La modulation de la perméabilité passe donc, en partie, par le remodelage de ces jonctions intercellulaires. De plus, ce relâchement des liens

intercellulaires est essentiel pour permettre aux cellules endothéliales de migrer et d'initier le bourgeonnement vasculaire (Carmeliet, 2003).

La capacité à dégrader la matrice extracellulaire à l'envahir est également une activité essentielle des cellules endothéliales lors de l'angiogenèse. La matrice extracellulaire détient plusieurs fonctions qui sont cruciales pour l'intégrité des vaisseaux sanguins. En effet, elle donne les contacts nécessaires pour les cellules endothéliales et elle assure l'intégrité structurale des vaisseaux sanguins, les empêchant de s'affaisser (Carmeliet, 2003). Dans les vaisseaux sanguins formés et quiescents, la membrane basale entoure les cellules vasculaires, les péricytes et les cellules endothéliales (Carmeliet, 2003). Cette membrane est composée de collagène de type IV, laminine et d'autres composantes. De plus, une matrice interstitielle de collagène de type I et d'élastine assure la visco-élasticité et la force à la barrière vasculaire (Carmeliet, 2003). Comme les vaisseaux sanguins sont entourés d'une membrane basale, le bourgeonnement nécessite sa dégradation locale ou la réorganisation de celle-ci. La dégradation de la membrane basale est effectuée par des protéines comme les métalloprotéinases de la matrice (Arroyo, 2010; van Hinsbergh, 2008). Cette dégradation des molécules composant la matrice extracellulaire procure non seulement de l'espace de manœuvre aux cellules endothéliales migratoires, mais relâche également plusieurs facteurs de croissance qui seraient normalement emprisonnés dans la matrice (Conway, 2001; Chen, 2010). La matrice extracellulaire régule donc la formation de nouveaux bourgeons vasculaires.

La migration des cellules endothéliales est un autre processus biologique crucial pour la progression de l'angiogenèse. Ainsi, une fois que les barrières physiques sont brisées, les cellules endothéliales deviennent libres de migrer dans la direction dictée par le gradient de facteurs pro-angiogéniques, certains pouvant être ceux qui ont été libérés lors de la dégradation protéolytique de la matrice (Conway, 2001; Chen, 2010). De plus, lors de la migration des cellules endothéliales, la matrice n'est pas seulement dégradée protéolytiquement, mais aussi remodelée. En effet, les protéases exposent de nouveaux épitopes ou en changent la structure, ce qui induit la migration des cellules endothéliales et musculaires lisses (Hangai, 2002). Le type de cellules endothéliales qui effectuent les

premières étapes du bourgeonnement angiogénique, dont la migration, est celui des cellules « meneuses ». En effet, ces cellules possèdent de nombreuses protrusions constituées de longs filopodes motiles qui s'étirent vers la source de facteurs pro-angiogéniques (Gerhardt, 2003). Ces facteurs stimulent la migration des cellules « meneuses » en agissant comme des molécules chémo-attractrices (Eilken, 2010). En répondant à divers autres facteurs, qui repoussent ou attirent, ces cellules permettent donc la croissance dirigée et structurée des vaisseaux sanguins. Finalement, une fois que les cellules « meneuses » migrent pour finalement atteindre et former des connexions avec d'autres réseaux vasculaires, elles s'y intègrent pour éventuellement former des tubules comportant des lumières (Eilken, 2010).

Deux autres processus biologiques discutés ici sont la prolifération et le maintien de la survie des cellules endothéliales. La prolifération des cellules endothéliales peut être activée par les mêmes facteurs que la migration (De Smet, 2009). Les cellules qui prolifèrent forment la « tige » du bourgeon angiogénique en suivant les cellules « meneuses », se multipliant et s'enchaînant afin de former un tronc migratoire (Bergers, 2003). Cette prolifération peut cependant être inhibée par le biais de protéines situées à la membrane, lors de la formation de contacts cellules-cellules (De Smet, 2009). Les molécules qui composent les liens intercellulaires ne servent donc pas uniquement de « crampons moléculaires », mais transmettent également des signaux qui permettent le maintien de la survie et l'inhibition de la prolifération des cellules endothéliales (Carmeliet, 2003). Ces cellules, dont la prolifération est inhibée, entrent donc en quiescence, prolongeant leur survie. Ces dernières sont donc les cellules « phalanges », et composent les vaisseaux sanguins stables (Eilken, 2010).

Une des caractéristiques les plus importantes de ce modèle est qu'il existe plusieurs types de cellules au niveau de leurs fonctions et de leurs profils d'expression génique, dont les cellules « meneuses », les cellules « tiges » et les cellules « phalanges ». Cette spécification n'est cependant pas permanente. Ainsi, la spécification entre cellule « meneuse » et cellule « tige » dépendrait des signaux pro-angiogéniques et de la balance à la fois des facteurs qui induisent le bourgeonnement et des facteurs qui induisent la prolifération des cellules endothéliales (Eilken, 2010).

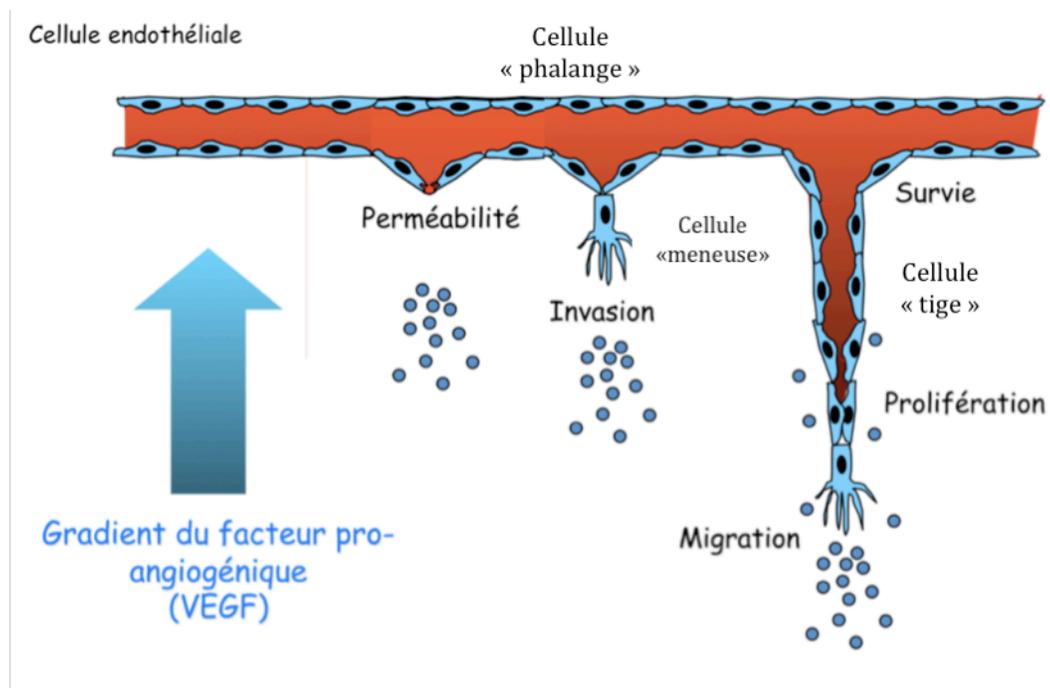


Figure 4 : Fonctions biologiques distinctes des cellules endothéliales impliquées dans la formation de nouveaux vaisseaux sanguins par bourgeonnement.

En réponse à un gradient de facteur pro-angiogénique, les cellules verront plusieurs de leurs fonctions biologiques activées. Celles-ci incluent : le remodelage des jonctions cellules-cellules menant à la modulation de la perméabilité endothéliale, l'invasion dans la matrice extracellulaire dans la direction du facteur pro-angiogénique, la migration endothéliale dans la direction du gradient du facteur pro-angiogénique, la prolifération des cellules endothéliales le long du vaisseau sanguin bourgeonnant ainsi que le maintien de la survie des cellules endothéliales.

Bien que la formation de capillaires peut différer en terme de résultat, de vitesse ou d'organisation par exemple, elle est toujours composée de ces mêmes fonctions biologiques des cellules endothéliales, et ce, que ce soit en contexte normal ou pathologique (Conway, 2001).

1.3. Perméabilité

Comme énoncée précédemment, la perméabilité endothéliale est une étape cruciale de l'angiogenèse. Le remodelage des jonctions intercellulaires des cellules endothéliales, permettant la modulation de la perméabilité, est une des étapes initiales de l'angiogenèse. En situation normale, lorsqu'il n'y a pas de bourgeonnement angiogénique, la perméabilité vasculaire est importante pour l'homéostasie tissulaire, particulièrement dans l'établissement de gradients de protéines plasmatiques. Dans un contexte pathologique, l'ouverture de passages permet le transit de cellules migratoires dans la circulation sanguine, qui peuvent par la suite se relocaliser vers des sites distants (Hu, 2008; Mehta, 2006; Weis, 2008). Cette ouverture de la barrière endothéliale peut s'effectuer soit via les cellules endothéliales elles-mêmes (perméabilité transcellulaire), soit via la formation d'un passage entre les cellules (transport paracellulaire). La perméabilité transcellulaire inclut toutes les voies de transports pouvant faire passer des substances à travers les cellules endothéliales. Ces substances peuvent être des fluides ou simplement de l'eau, qui peut traverser grâce à des canaux spécialisés, comme les aquaporines (Mehta, 2006). Certaines substances peuvent même réussir à passer au travers des cellules sans avoir besoin de mode de transport actif, soit par diffusion (Olsson, 2006). En ce qui concerne les substances plus grosses, d'autres voies de transports sont utilisées. Il y a le transport transcellulaire médié par récepteur, qui consiste en la création de vésicules suite à la liaison d'un ligand spécifique à un récepteur donné (Mehta, 2006). Certaines molécules peuvent traverser la cellule à travers des pores transendothéliales, qui sont des canaux non spécifiques (Olsson, 2006; Mehta, 2006). D'autres voies de transport incluent les voies intracellulaires vésiculo-vacuolaires et de la calvéoline (Weis, 2008). De plus, les facteurs perméabilisants peuvent également induire la présence de fenestrations, qui peuvent laisser passer des substances de différentes tailles (Olsson, 2006). Finalement, des cellules leucocytaires peuvent passer à travers ou entre les cellules endothéliales, par un processus nommé la diapédèse (Dejana, 2004).

Le passage entre cellules endothéliales, ou perméabilité paracellulaire, est permis par le relâchement des jonctions cellules-cellules, soit les jonctions GAP, les jonctions serrées ainsi que les jonctions adhérentes (Wallez, 2008). L'intégrité des jonctions intercellulaires est en grande partie assurée par les interactions entre les protéines qui les composent (Mehta, 2006). Pour les jonctions adhérentes, ces composantes sont les protéines d'adhésion VE-Cadhérine, β -Caténine, α -Caténine, et la p120 Caténine, entre autres. En réponse à divers agents perméabilisants, ces protéines subissent donc des événements de phosphorylation ainsi que d'autres modifications qui mènent éventuellement à une diminution de l'attachement entre celles-ci, ce qui résulte en le relâchement des jonctions cellules-cellules et l'augmentation de la perméabilité (Esser, 1998; Cavallero, 2006; Dejana, 2008; Lilien, 2005; Mehta, 2006; Vincent, 2004; Wallez, 2008; Weis, 2005).

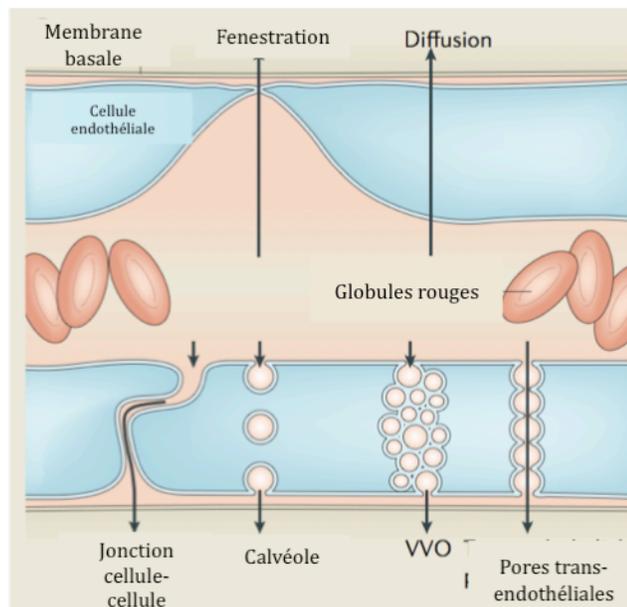


Figure 5 : Les mécanismes de perméabilité endothéliale.

Quelques voies de passage de substances à travers la barrière endothéliale sont : par une fenestration, diffusion à travers une cellule, entre les cellules, via les calvéoles, via les organelles vésiculo-vacuolaires (VVO) et entre des pores transendothéliaux. Figure tirée de Olsson, 2006

La perméabilité excessive peut mener à l'avènement de diverses pathologies, comme l'hypertension intracrânienne (Conway, 2001), ainsi que la facilitation d'autres pathologies comme les maladies inflammatoires et la dissémination de métastases (Kim, 2009). Il existe plusieurs régulateurs de la perméabilité. Le plus connu d'entre eux est le VEGF, qui sera le sujet de la prochaine section.

1.4. Les VEGFs et les VEGFRs

La voie de régulation que représentent le VEGF et ses effecteurs, essentielle pour la perméabilité des cellules endothéliales, est celle qui est la plus importante pour ce mémoire et sera donc le sujet principal du reste de cette introduction. Le rôle du VEGF dans l'angiogenèse (et surtout la perméabilité) est indéniable. En effet, le VEGF régule l'angiogenèse, normale ou pathologique, d'une manière stricte et dose-dépendante (Carmeliet, 2003). La perte d'une seule allèle peut causer des défauts de formation des vaisseaux sanguins chez les embryons (Carmeliet, 1996; Ferrara, 1996).

La famille des VEGF regroupe 5 glycoprotéines homodimériques chez les mammifères (VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D et le PlGF) ainsi qu'une protéine identifiée chez le parapoxvirus (VEGF-E) (Cross, 2003). Le VEGF-A, la forme de VEGF initialement découverte sous le nom de Vascular Permeability Factor (VPF) (Senger, 1986), existe sous 4 différentes isoformes. Ces dernières ont 121, 165, 189 et 206 acides aminés chez l'humain et sont générées à partir de l'épissage alternatif d'un seul pré-ARNm (Cross, 2003). Celle qui est la plus importante pour le développement vasculaire en conditions physiologique ou pathologique est le VEGF-A₁₆₅ (Takahashi, 2005). Les VEGFs sont des ligands qui doivent se lier à divers récepteurs transmembranaires afin de médier une réponse cellulaire. Les récepteurs aux VEGFs sont les VEGFRs.

Le premier récepteur est le « Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1 » (VEGFR1), aussi connu sous le nom de Flt-1. Sa taille est de 180kDa et il possède une grande affinité pour le VEGF-A, VEGF-B et le PlGF (Cross, 2003). Le deuxième est le « Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2 » (VEGFR2), aussi connu sous le nom de KDR ou Flk-1. Sa taille est de 200-230kDa et il possède une grande affinité pour le VEGF-A ainsi que les VEGF-C, VEGF-D et VEGF-E. Le troisième s'appelle le « Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 3 » (VEGFR3) ou Flt-4, et est un récepteur de 195kDa avec une grande affinité pour le VEGF-C et le VEGF-D. Le VEGF-C et D lient

principalement le VEGFR3, mais peuvent également lier et activer le VEGFR2 (Jussila, 2002) (Figure 6).

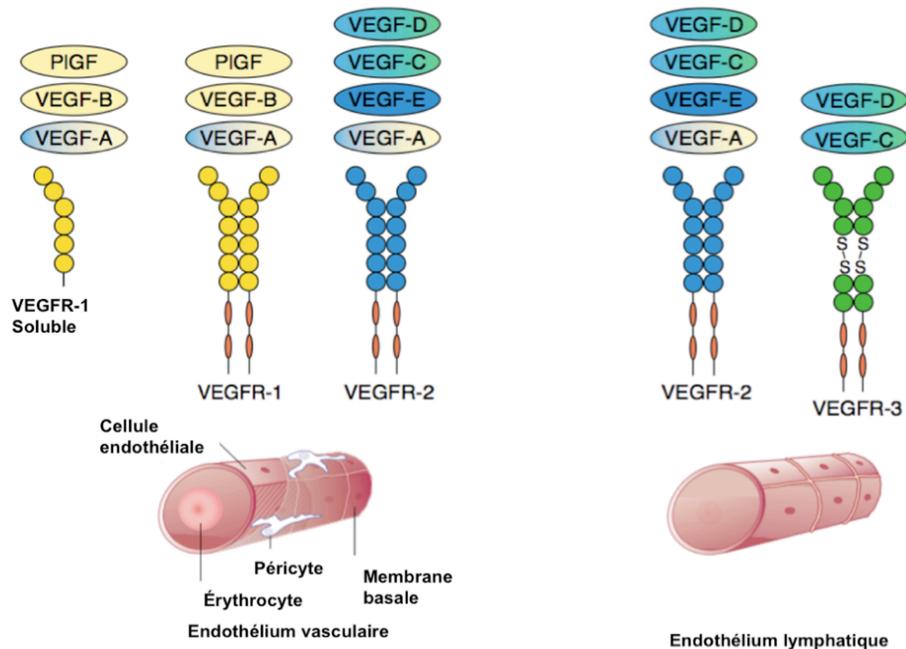


Figure 6 : Les récepteurs VEGFR, leurs ligands et leurs localisations.

Chez les cellules endothéliales vasculaires, le PIGF, le VEGF-A et le VEGF-B lient le VEGFR1 soluble et transmembranaire. Les VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D et VEGF-E lient le VEGFR2. Pour les cellules endothéliales lymphatiques, les ligands du VEGFR2 demeurent les mêmes que les cellules endothéliales. Les VEGF-C et VEGF-D lient le VEGFR3. Figure tirée de Cross, 2003

Le VEGFR2 est le principal médiateur moléculaire de la réponse physiologique et pathologique des cellules endothéliales au VEGF-A. Ces réponses biologiques incluent la prolifération, la survie, la migration et la perméabilité (Cross, 2003). Le VEGFR2 est exprimé principalement chez les cellules endothéliales. Son absence des embryons cause la mort vers le 8^e jour et demi de développement en provoquant des défauts dans la production de précurseurs endothéliaux, ce qui indique son rôle crucial dans le développement vasculaire (Shalaby, 1995). Contrairement au VEGFR1, qui demeure inactif après la liaison du VEGF et qui agit plutôt comme éponge au VEGF, la liaison du VEGF au VEGFR2 induit sa phosphorylation sur plusieurs résidus majeurs tels que les Y951 et Y996 dans le

domaine d'insertion kinase, les Y1054 et 1059 dans le domaine kinase et les Y1175 et 1214 dans la queue carboxy-terminale (Cross, 2003; Roskoski Jr, 2008; Matsumoto, 2005; Takahashi, 2001). D'autres phosphorylations mineures ont été identifiées, entre autres sur la Y801, quoique sa phosphorylation dans une expérience impliquant un VEGFR2 intact n'a pas encore été démontrée (Koch, 2011; Solowiej, 2009). D'autres sites comme les résidus Y1223, Y1305, Y1309 et Y1319, ont été identifiés comme étant phosphorylés dans la queue C-terminal (Matsumoto, 2005), mais leurs fonctions demeurent incertaines (Koch, 2011). Pour les résidus les mieux caractérisés, lorsqu'ils sont phosphorylés, ils deviennent des points d'ancrage pour plusieurs protéines d'échafaudage qui, à leur tour, feront partie des cascades signalétiques menant aux fonctions biologiques que régule le récepteur (Cross, 2003). Des exemples de ceci incluent les protéines Grb2 et PLC γ qui se lient au site Y1175 et qui médient la prolifération cellulaire ainsi que la protéine Nck qui se lie au site Y1214 pour médier la migration cellulaire.

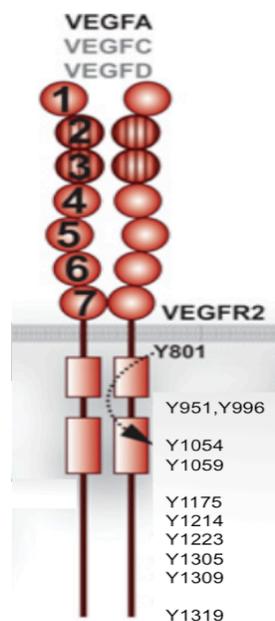


Figure 7 : Sites de phosphorylation du VEGFR2.

Suite à la liaison de son ligand, le VEGFR2 devient phosphorylé sur plusieurs sites, qui incluent :

- Y801
- Y951 et Y996 dans le domaine d'insertion kinase
- Y1054 et Y1059 dans le domaine kinase
- Y1175, Y1214, Y1223, Y1305, Y1309 et Y1319 dans la queue carboxy-terminale.

Figure adaptée de Koch, 2011

La principale régulation de l'activité des récepteurs à tyrosine kinase est la disponibilité de leurs ligands, caractéristique qui n'échappe pas au VEGFR2 (Olsson, 2006). Le VEGFR2 partage plusieurs aspects de mécanismes de régulation avec d'autres récepteurs à activité tyrosine kinase comme les "platelet-derived growth-factor receptors"

(PDGFRs) et les "epidermal growth-factor receptors" (EGFRs). Ces mécanismes de régulation incluent la dimérisation des récepteurs induite par le ligand, l'activation du domaine tyrosine kinase qui s'ensuit ainsi que la création de sites d'ancrage pour les partenaires signalétiques ainsi que des protéines du cytosquelette. De plus, les VEGFRs participent à des processus cellulaires communs aux récepteurs à facteurs de croissance, tels que la migration, la prolifération et la survie cellulaire (Olsson, 2006).

Le VEGFR2 agit sur la prolifération de cellules endothéliales via l'activation de Erk (extracellular regulated kinase), menant à la transcription génique. VEGFR2 active également la voie PI3K-Akt, régulatrice du maintien de la survie cellulaire via l'inhibition de protéines pro-apoptotiques comme Bcl-2, BAD et Caspase-9 (Gerber, 1998). La voie PI3K/Akt active également eNOS (endothelial Nitric Oxide Synthase), générant l'oxyde nitrique (NO), impliqué dans l'augmentation de la perméabilité vasculaire et la migration cellulaire induite par le VEGF-A (Fulton, 1999; Dimmeler, 1999). D'autres composantes de la régulation de la migration en aval de VEGFR2 incluent p38 MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) (Rousseau, 1997), FAK (Focal Adhesion Kinase) et son substrat paxilline (Qi, 2001). La signalisation du VEGFR2 est influencée par la manière dont les cellules endothéliales interagissent entre elles. En effet, les VE-Cadhérines, spécifiques aux jonctions adhérentes des cellules endothéliales, sont impliquées dans la formation de complexe avec le VEGFR2. L'absence d'expression de la VE-Cadhérine bloque l'acheminement de signaux de survie cellulaire par le VEGFR2 (Carmeliet, 1999).

Lors du développement vasculaire, le VEGFR1 occupe un rôle de régulateur négatif du VEGFR2 de par l'action de sa forme soluble et transmembranaire. Ces différentes formes de VEGFR1 lient le VEGF-A avec la plus grande affinité que le VEGFR2, mais ceci ne conduit pas à la stimulation significative de son activité kinase (Waltenberger, 1994). Conséquemment, le VEGFR1 compétitionne avec les autres VEGFR pour la liaison de VEGF ce qui résulte en une réduction de l'activation de ces autres récepteurs qui sont les responsables de la transmission des signaux pro-angiogéniques (Cross, 2003). De plus, l'inactivation du domaine intracellulaire de la forme complète du VEGFR1 est compatible avec le développement vasculaire (Hiratsuka, 1998). Ce récepteur aurait donc plutôt un rôle

d'atténuateur, épongeant le VEGF excessif pour empêcher une activité trop grande du VEGFR2 et autres récepteurs pro-angiogéniques (Cross, 2003).

Pour ce qui est du VEGFR3, une fois que le VEGF le lie, celui-ci active plusieurs cascades signalétiques résultant éventuellement en la formation de nouveaux vaisseaux lymphatiques (Cross, 2003), soit la lymphangiogénèse. Comme pour le VEGFR2 dans la formation de vaisseaux sanguins, l'activation du VEGFR3 induit la prolifération, la migration et la survie des cellules endothéliales lymphatiques (Makinen, 2001).

1.5. Src

La protéine tyrosine kinase Src est nécessaire pour les fonctions du VEGFR2 (Park, 2007), dont la perméabilité vasculaire induite par le VEGF. Cependant, avant d'élaborer davantage sur les fonctions de Src dans l'angiogenèse, son mécanisme d'activation mérite une attention particulière. Ainsi, elle est activée d'une manière distincte, nécessitant plusieurs étapes. Cette activation est régulée par l'état de phosphorylation des résidus tyrosine 418 et 529, désignés activateurs et inhibiteurs respectivement. En effet, la phosphorylation de sa Y529 génère un site de liaison pour son domaine SH2, résultant en une association intramoléculaire entre cette tyrosine et le domaine SH2 de la kinase (Hu, 2009). Cette association génère donc la forme inactive de la kinase, incapable d'être phosphorylée sur son site activateur Y418, et donc activée. Pour que Src soit activée, sa tyrosine inhibitrice 529 doit être dissociée de son domaine SH2 et déphosphorylée, tandis que sa tyrosine activatrice doit être phosphorylée. Src est donc activée lorsque sa Y418 est phosphorylée et sa Y529 déphosphorylée (Shi, 2000; Thomas, 1997, Schlessinger, 2000).

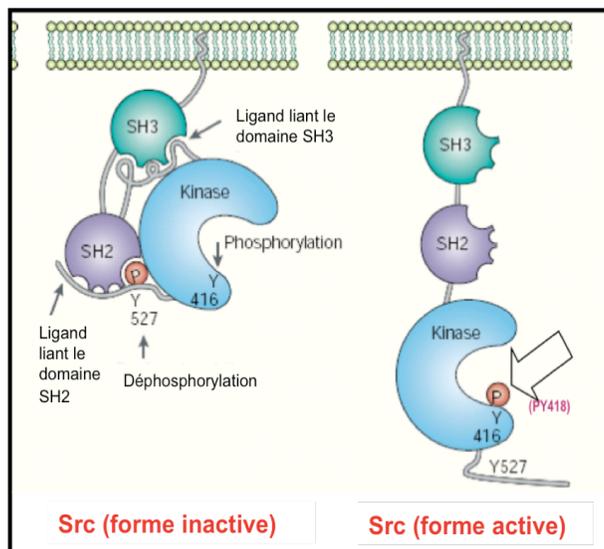


Figure 8 : Mécanisme d'activation de Src.

Plusieurs événements moléculaires doivent survenir afin que la kinase Src puisse être activée. Sa tyrosine inhibitrice (529 chez l'humain, 527 chez le poulet) doit être dissociée de son domaine SH2 et déphosphorylée. Puis sa tyrosine activatrice (418 chez l'humain, 416 chez le poulet), située dans le site actif de son domaine catalytique, doit être phosphorylée. Figure adaptée de Martin, 2001

La régulation par Src de la perméabilité des cellules endothéliales inclut la formation de cavéoles, la fenestration et la perte de l'intégrité des liens cellules-cellules (Weis, 2005; Hu, 2009). Ces mécanismes de perméabilité sont médiés par la phosphorylation sur résidus tyrosine de protéines clés, dont un substrat de Src, la VE-Cadhérine. Plus précisément Src s'associe aux VEGFRs suite à la stimulation des cellules endothéliales au VEGF, phosphoryle la VE-Cadhérine menant à la dissociation du complexe VE-Cadhérine/caténine, résultant en la modulation de la perméabilité vasculaire (Chou, 2002; Weis, 2004). Cette régulation sera d'ailleurs détaillée dans la prochaine section.

1.6. Régulation moléculaire de la perméabilité par le VEGF et la kinase Src

La perméabilité vasculaire excessive peut mener à l'avènement de diverses pathologies, comme l'hypertension intracrânienne ou le collapsus cardiovasculaire (qui est l'effondrement de la pression artérielle systolique à une valeur inférieure à 80mmHg) (Conway, 2001), ainsi que la facilitation d'autres pathologies comme le cancer, via la dissémination de métastases (Kim, 2009). Il existe plusieurs régulateurs pour la perméabilité vasculaire. Le plus important et le mieux caractérisé parmi ceux-ci est le VEGF. Celui-ci exerce son action sur les protéines d'adhésion (les protéines qui composent les jonctions adhérentes) en provoquant la phosphorylation de plusieurs résidus tyrosine (Mehta, 2006).

Src joue un rôle majeur dans la perméabilité vasculaire. Il est associé au complexe VE-Cadhérine- β -Caténine où il médie la réponse signalétique provenant du VEGF (Dejana, 2008). Le premier exemple de ceci est la phosphorylation de la β -Caténine au site Y654 par Src, qui diminue grandement son affinité pour la VE-Cadhérine (Lilien, 2005). Pour la p120 Caténine, le mécanisme pourrait être différent, car certains ont rapporté que le VEGF diminue sa phosphorylation (Wong, 2000).

Le mécanisme le plus pertinent pour les travaux présentés ici implique les VE-Cadhérines. Dans les cellules CHO, des mutations Y à E des résidus tyrosine 658 et 731 de la VE-Cadhérine (sites de phosphorylation par Src) mènent à une barrière cellule-cellule compromise, et démontrent le rôle de ces résidus tyrosine dans l'association de la VE-Cadhérine avec la p120 Caténine et la β -Caténine, respectivement (Potter, 2005). Des études récentes (Adam, 2010; Monaghan-Benson, 2009) ont montré que ces résidus (Y658 et Y731) sont phosphorylés en réponse au VEGF, et que cette phosphorylation induit la perméabilité vasculaire. De façon analogue, la mutation Y658F (qui est biochimiquement semblable à un résidu tyrosine phosphorylé) de la VE-Cadhérine augmente la localisation

membranaire ainsi que l'association à la p120 Caténine de la protéine et maintient l'intégrité de la monocouche de cellules endothéliales tandis que la mutation Y658E (biochimiquement semblable à un résidu tyrosine non phosphorylé) ne peut pas (Hatanaka, 2011).

La dissociation des protéines d'adhésion suite à leur phosphorylation n'est pas le seul mécanisme de régulation des jonctions adhérentes menant à la modulation de la perméabilité. Il y a également l'endocytose clathrin-dépendante de la VE-Cadhérine qui joue un grand rôle (Xiao, 2003). Récemment, un mécanisme moléculaire détaillé a été caractérisé sur l'internalisation de la VE-Cadhérine qui serait dépendante de la β -arrestine (Gavard, 2006). En effet, le VEGF agirait sur la barrière endothéliale via l'activation de Src, qui phosphoryle Vav2, une "guanine-nucleotide-exchange factor" (GEF) pour la GTPase Rac. Une fois Rac activée (lié au GTP), celle-ci induirait l'activation de Pak, une serine/thréonine kinase, qui à son tour serait responsable de la phosphorylation de la VE-Cadhérine à la S665. Cette cascade signalétique enclenche le recrutement de la β -arrestine à la VE-Cadhérine, ce qui augmente l'internalisation clathrine-dépendante de la VE-Cadhérine (Gavard, 2006). La phosphorylation sur S665 est donc une étape cruciale pour l'augmentation de la perméabilité.

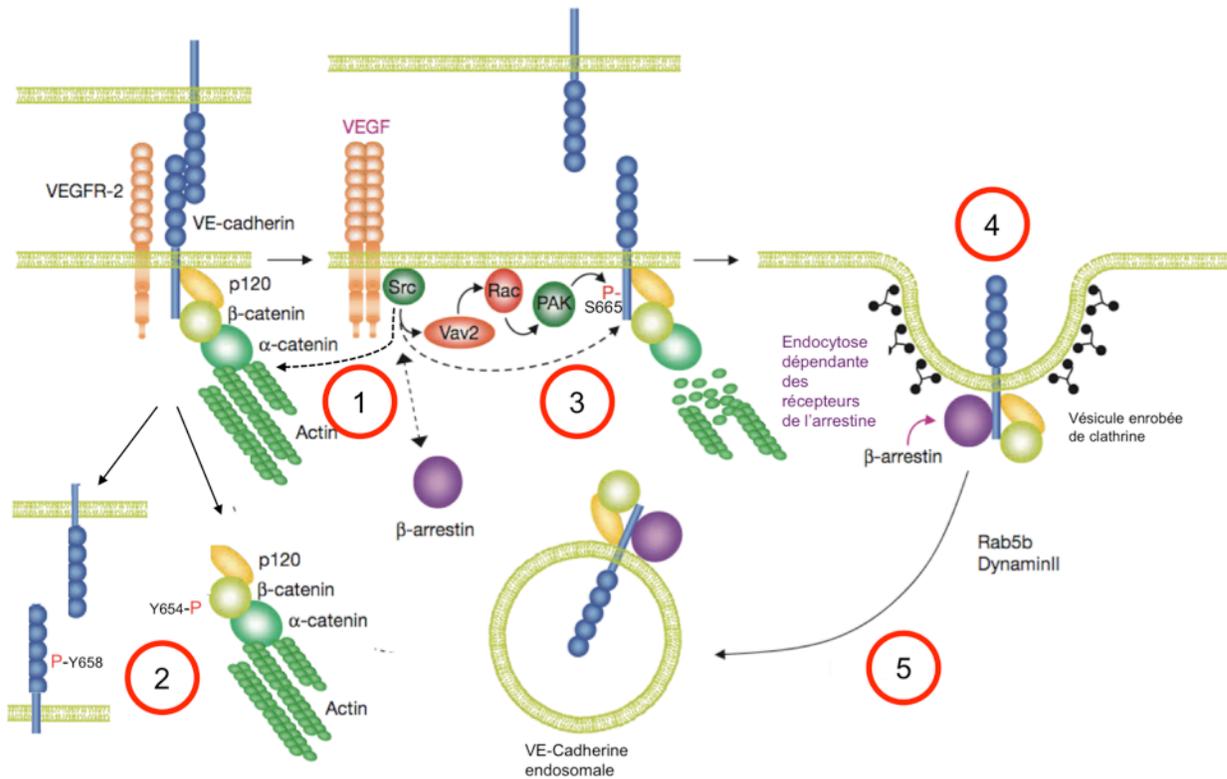


Figure 9 : Régulation moléculaire de la perméabilité par le VEGF et la kinase Src.

Suite à la stimulation par le VEGF, Src phosphoryle plusieurs résidus tyrosine tel les résidus Y654 de la β-Caténine et Y658 de la VE-Cadhérine (1), menant à leur dissociation (2). D'un autre côté, Src active également une cascade moléculaire Src-Vav2-Rac-Pak menant à la phosphorylation du résidu S665 de la VE-Cadhérine (3). Ceci enclenche le recrutement de la β-arrestine à la VE-Cadhérine, augmentant l'internalisation clathrine-dépendante de la VE-Cadhérine (4). Finalement, la VE-Cadhérine est transportée par endocytose (5). Figure adaptée de Gavard, 2006.

Il est également intéressant de noter que la p120 Caténine semble agir comme signal de rétention à la membrane de la VE-Cadhérine en empêchant son internalisation en y étant liée (Xiao, 2005). Cette interaction moléculaire est régulée par la phosphorylation de la Y658, qui est située près de la S665. Il est donc concevable qu'il existe une séquence d'évènements menant à l'internalisation de la VE-Cadhérine. Ainsi, celle-ci serait précédée de la phosphorylation de Y658, qui déplacerait la p120 Caténine, ce qui permettrait la phosphorylation de la S665. Entre la liaison du VEGF au VEGFR2, et l'activité de Src, il existe plusieurs régulateurs qui assurent la justesse du signal qui est transmis. Les prochaines pages auront comme sujet un de ces régulateurs, la phosphatase DEP-1.

1.7. DEP-1

La "Density-Enhanced Phosphatase-1" (DEP-1), aussi nommée CD148, PTPRJ et PTP η , est une protéine-tyrosine phosphatase de type récepteur (PTP) retrouvée chez presque tous les types cellulaires, notamment les cellules endothéliales (Borges, 1996; de la Fuente-Garcia, 1998; Honda, 1994; Ostman, 1994; Autschbach, 1999; Lin, 2004). Sa structure est composée d'une région extracellulaire de huit domaines fibronectine de type III ainsi que d'une portion intracellulaire incluant le domaine catalytique et une petite queue carboxy-terminale (Chabot, 2009). Ces substrats incluent plusieurs récepteurs à activité tyrosine kinase à facteurs de croissance comme les récepteurs EGFR, PDGF- β , HGFR (Met), Ret, Flt3 et le VEGFR2, ainsi que la famille des kinases Src (SFK), ERK1/2 et la sous-unité p85 de PI3K (Arora, 2001; Berset, 2005; Chabot, 2009; Ellison, 2010; Holsinger, 2002; Iervolino, 2006; Kovalenko, 2000; Lampugnani, 2003; Le Pera, 2005; Palka, 2003; Sacco, 2009; Tarcic, 2009; Tsuboi, 2008; Zhu, 2008).

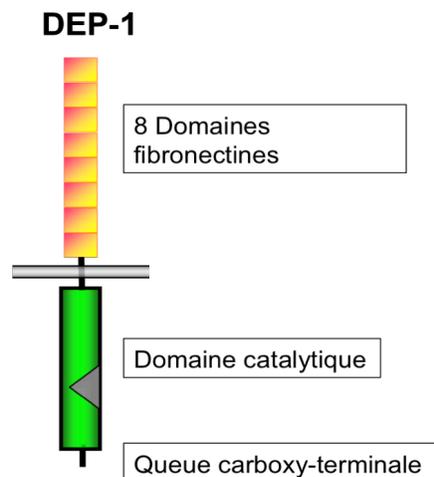


Figure 10 : Structure moléculaire de DEP-1.

La PTP DEP-1 est composée des structures suivantes : une région extracellulaire composée de 8 domaines fibronectines, une région intracellulaire ainsi qu'une queue carboxy-terminale. Figure adaptée de Spring, 2012

Plusieurs études se sont penchées jusqu'à maintenant sur la régulation et les fonctions de DEP-1. Il n'est pas surprenant d'ailleurs qu'elle ait un rôle dans une variété de phénomènes, étant donné son expression ubiquitaire. Peu de choses sont connues sur son activation. Cependant, dans les cellules CHO, DEP-1 est activée, via un complexe effecteur

composé de JAK2, SHP-2 et Src, par le Somatostatin Receptor 1 (SSTR1) (Arena, 2007). Concernant ses fonctions, dans les cellules épithéliales, elle régulerait la phosphorylation des protéines des jonctions serrées (Sallee, 2009).

DEP-1 semble jouer un rôle important dans la régulation de l'immunité. Effectivement, dans les cellules T, elle est impliquée dans la signalisation dépendante des "T-Cell Receptors" (TCRs) (Baker, 2001). Elle serait également importante pour l'activation des plaquettes et la thrombose (Senis, 2009).

DEP-1 est impliquée dans plusieurs types de cancers. En effet, jusqu'à maintenant, DEP-1 a été suggéré dans la littérature comme étant un suppresseur de tumeur, entres autres par sa délétion et par le fait que sa surexpression inhibe la transformation et la prolifération des cellules cancéreuses. De plus des études ont signalé la présence de polymorphismes (SNP) dans des cancers humains (Ruivenkamp, 2002; Mita, 2010). Elle joue un rôle dans le cancer pancréatique (Trapasso, 2004 (joue)), le cancer colorectal (Balavenkatraman, 2006), le méningiome (Petermann, 2011), le gliome (Massa, 2004), le cancer du sein (Keane, 1996) et le cancer de la thyroïde (Iuliano, 2003). D'autres études indiquent plutôt seulement qu'une association entre DEP-1 et le cancer colorectal (Toland, 2008; Ruivenkamp, 2002; Ruivenkamp, 2003), le cancer du sein (Lesueur, 2005) et le cancer de la thyroïde (Iuliano, 2004; Iuliano, 2010). Elle est exprimée dans les lymphomes de cellules B mémoires et naïves (Dong, 2002). Cependant, elle ne peut pas être utilisée comme marqueur pouvant les discerner (Dong, 2002).

Plus important encore pour ce projet, DEP-1 joue également un rôle dans l'angiogenèse. Premièrement, elle serait impliquée dans la régulation de l'urokinase receptor (uPAR) dans les cellules endothéliales confluentes (Brunner, 2011). Sa mutation embryonnaire par le remplacement de son domaine catalytique par la GFP cause des défauts du développement vasculaire (Takahashi, 2003). Les réseaux vasculaires formés dans ces conditions se développent inadéquatement, ne formant pas les structures complexes et organisées comme dans les réseaux vasculaires matures en condition normale. Dans cette même série d'expériences, les auteurs ont remarqué qu'il y avait cependant une prolifération accrue des cellules endothéliales lorsque DEP-1 était inactivée.

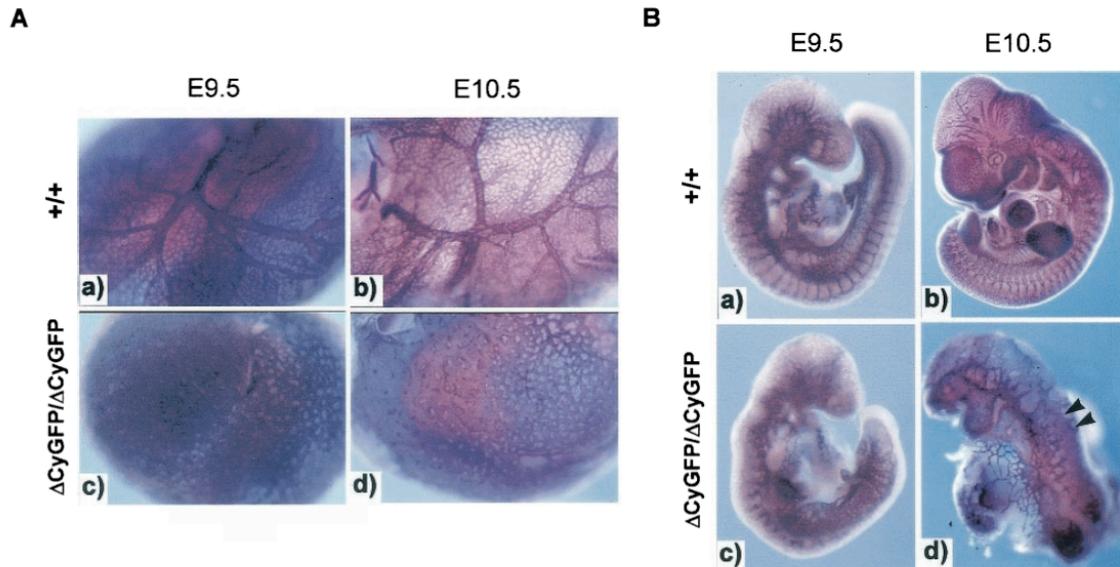


Figure 11 : Mutation embryonnaire de DEP-1

Expérience d'inactivation de DEP-1 en remplaçant le domaine catalytique avec la GFP. A. Marquage avec un anticorps anti-CD31 (spécifique aux cellules endothéliales) du sac vitellin d'embryons de souris. Au jour 9,5/10,5 de développement de l'embryon, les vaisseaux sanguins des animaux mutants ne forment pas de réseau vasculaire organisé. B. Marquage des vaisseaux sanguins avec un anticorps anti-CD31. Au jour 9,5/10,5 il est possible de remarquer le développement totalement déficient du système vasculaire chez les mutants. Figure tirée de Takahashi, 2003.

Il y a eu d'autres expériences concernant DEP-1 et l'angiogenèse. En effet, elle agirait négativement sur la prolifération des cellules endothéliales via l'inhibition de contact induite par le VEGF grâce à sa localisation au complexe VE-Cadhérine/ β -Caténine des jonctions adhérentes (Lampugnani, 2003). Ces expériences ont démontré de plus que la phosphorylation du récepteur VEGFR2 dépendrait de DEP-1, indiquant qu'elle serait une cible. Ce sont donc pour ces raisons que le laboratoire s'est intéressé initialement à cette protéine en particulier.

1.8. Travaux antérieurs du laboratoire

Les résultats précédents sur les fonctions de DEP-1 dans les cellules endothéliales ont mené notre laboratoire à émettre sa propre hypothèse sur le sujet. Étant donné que DEP-1 déphosphoryle les récepteurs à activité tyrosine-kinase (dont le VEGFR2), et que le VEGFR2 est essentiel pour la régulation de l'angiogenèse, DEP-1 régulerait l'angiogenèse via ses effets sur VEGFR2. Ainsi, grâce à plusieurs expériences effectuées, le laboratoire a découvert que, dans un premier temps, DEP-1 cible les résidus tyrosine 1054 et 1059 du VEGFR2 qui se retrouvent dans sa boucle auto-activatrice, ce qui diminue son activité kinase. Ceci mène à une diminution de la phosphorylation de Erk1/2, eNOS et PLC γ ainsi qu'une diminution de la prolifération des cellules endothéliales (Chabot, 2009), ce qui est conséquent avec les résultats obtenus auparavant dans les expériences d'inactivation embryonnaire de DEP-1 (Takahashi, 2003). Cependant, les travaux du laboratoire ont également révélé que DEP-1 est impliquée dans l'activation de Src en réponse au VEGF en ciblant la tyrosine inhibitrice 529 située dans la queue carboxy-terminale de la kinase. Ceci interviendrait dans l'activation Src-dépendante d'Akt en réponse au VEGF ainsi que dans la survie des cellules endothéliales (Chabot, 2009).

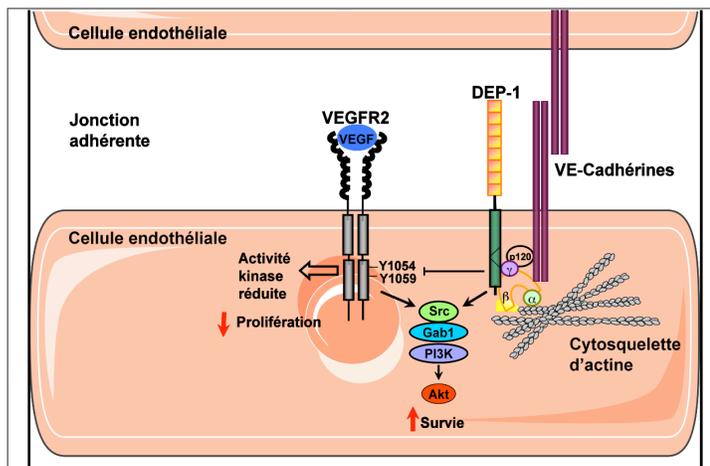


Figure 12 : Fonctions de DEP-1 aux jonctions adhérentes.

DEP-1 est localisée aux jonctions adhérentes. D'un côté, la phosphatase déphosphoryle le VEGFR2 dans sa boucle auto-activatrice en ciblant les résidus tyrosine 1054 et 1059, ce qui atténue l'activité kinase du récepteur. Ceci mène à la diminution de la prolifération des cellules endothéliales. D'un autre côté, DEP-1 agit positivement sur

la voie moléculaire Src/Gab1/PI3K/Akt en déphosphorylant la tyrosine inhibitrice 529 de la kinase Src. Ceci mène à la promotion de la survie des cellules endothéliales en réponse au VEGF. Figure adaptée de Chabot, 2009.

De plus, des résultats récemment obtenus démontrent que les résidus tyrosine 1311 et 1320 situés dans la queue carboxy-terminale de la phosphatase DEP-1 elle-même sont impliqués dans l'activation de Src en recrutant son domaine SH2 (Spring, 2012). Nous avons également démontré que DEP-1 est importante pour de nombreux processus biologiques qui composent l'angiogenèse, comme l'élongation de capillaires, le branchement des capillaires ainsi que l'invasion sur Matrigel. De plus, les résidus tyrosine en carboxy-terminal de DEP-1 seraient nécessaires pour les fonctions des cellules endothéliales, où DEP-1 joue un rôle.

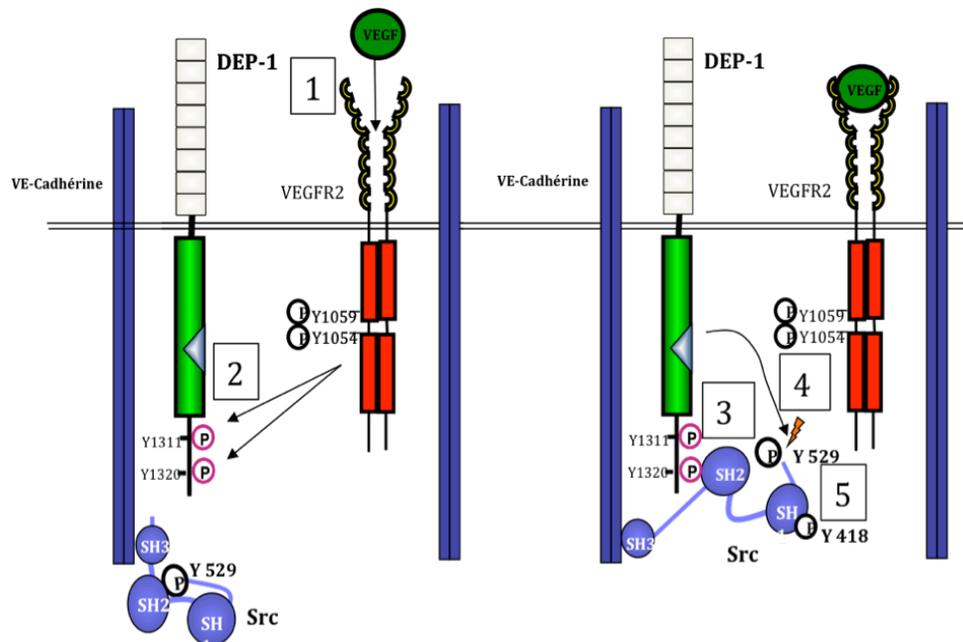


Figure 13 : Mécanisme d'activation de Src par DEP-1.

Suite à la stimulation au VEGF (1), DEP-1 devient phosphorylé sur ses résidus tyrosine 1311 et 1320 (2). Ceci créé un site d'ancrage pour le domaine SH2 de Src (3), libérant la tyrosine inhibitrice 529 de Src pour sa déphosphorylation par la DEP-1 (4). Finalement, Src devient éventuellement phosphorylée sur sa tyrosine activatrice 418, menant à son activation.

1.9. But et Hypothèse

Il a été prouvé, grâce à une série de résultats issus d'expériences effectuées dans notre laboratoire, que DEP-1 active Src dans les cellules endothéliales en réponse au VEGF (Spring, 2012). DEP-1 est localisé aux jonctions adhérentes (Takahashi, 1999), où il agit sur une sous-population de Src associée à ces structures et qui représentent la fraction activée majoritaire de la kinase lorsqu'il y a stimulation au VEGF (Ha, 2008). De plus, des expériences plus récentes prouvent également que les résidus tyrosine 1311 et 1320 localisés dans la queue carboxy-terminale de DEP-1 sont cruciaux dans cette activation de Src par DEP-1 (Spring, 2012).

Src est d'une importance capitale pour tous les processus moléculaires menant à la modulation de la perméabilité vasculaire induite par le VEGF (Park, 2007). Plus particulièrement, la kinase phosphoryle la plupart des protéines d'adhésion qui composent les jonctions adhérentes afin de médier leur remodelage et l'augmentation de la perméabilité vasculaire des cellules endothéliales (Dejana, 2008).

Le but de cette étude est d'élucider le rôle, positif ou négatif, que joue DEP-1 dans la perméabilité vasculaire en réponse au VEGF et d'approfondir la signalisation moléculaire sous-jacente de celle-ci. Ainsi, notre hypothèse est que DEP-1 aurait un rôle positif dans la promotion de la perméabilité vasculaire en réponse au VEGF. Dans un premier lieu, DEP-1 active Src en réponse au VEGF. Nous pensons que cette activation mène alors à l'activation, ou tout simplement à la phosphorylation, de plusieurs cibles de Src. Ces événements enclencheraient le remodelage des jonctions adhérentes, augmentant la perméabilité vasculaire.

1.10. Résumé de l'étude

Pour tester ceci, nous avons élaboré une série d'expériences dans des cellules endothéliales afin d'évaluer l'impact exact de DEP-1 sur la phosphorylation des protéines d'adhésion, l'intégrité des jonctions cellules-cellules et la perméabilité *in vitro*. En ciblant DEP-1 dans les cellules HUVECs avec des ARNi, nous démontrons ici que DEP-1 est important pour la phosphorylation de la VE-Cadhérine sur un site (Y658) phosphorylé par Src, ainsi qu'un autre site dont la phosphorylation est dépendante de Src par la voie Vav2/Rac/Pak (S665) en réponse au VEGF. L'immunofluorescence de la β -Caténine dans des cellules endothéliales déplétées en DEP-1 par des ARNi nous a également permis d'observer que DEP-1 est nécessaire pour le relâchement des liens cellules-cellules en réponse au VEGF. Des tests de perméabilité *in vitro* dans des cellules HUVECs transfectées aux ARNi montrent que DEP-1 est importante pour l'augmentation de la perméabilité en réponse au VEGF.

La génération d'anticorps phosphospécifiques ciblant les résidus tyrosine 1311 ou 1320 de DEP-1 nous a permis de confirmer que la phosphatase est phosphorylée en réponse au VEGF dans les cellules HUVECs. La surexpression de DEP-1 dans les BAECs augmente la phosphorylation sur Y1320 comparativement aux cellules transfectées avec le vecteur seul, alors que l'expression du mutant Y1311F/Y1320F bloque la majeure partie de la phosphorylation de DEP-1 sur Y1320 dans ces cellules. Finalement, des tests de perméabilité *in vitro* dans les cellules HUVECs transfectées avec des ADNc de DEP-1 (sauvage, mutante pour ses résidus tyrosine 1311 et 1320, catalytiquement inactive C/S ou vecteur seul) démontrent que la surexpression de la phosphatase augmente la perméabilité des cellules HUVECs stimulées au VEGF tandis que les mutants de DEP-1 en sont incapables.

Ces résultats obtenus nous permettent de conclure, pour une première fois, que DEP-1 joue un rôle positif dans la perméabilité des cellules endothéliales induites par le

VEGF. Ceci est induit via son activité sur Src, qui phosphoryle la VE-Cadhérine sur Y658 et qui active Vav2 ce qui mène éventuellement à la phosphorylation des VE-Cadhérines sur S665. Ces évènements moléculaires sont accompagnés d'un relâchement des jonctions intercellulaires et d'une augmentation de la perméabilité des cellules endothéliales induite par le VEGF. Finalement les résidus tyrosine carboxy-terminales de DEP-1 1311 et 1320 jouent un rôle crucial dans cette régulation de la perméabilité vasculaire dépendante de Src.

Chapitre 2 : Matériel et méthodes

Culture cellulaire.

Les cellules HUVEC (Human umbilical vascular endothelial cells, Cascade Biologics) ont été cultivées (passages 1 à 4) sur des pétris de culture préalablement gélatinisés (0,2%) et maintenues dans du milieu M200 (Invitrogen) complété avec le supplément de culture LSGS (Low Serum Growth Supplement) kit ainsi que de la gentamycine (Wisent) à 50µg/ml à 37°C avec 5% CO₂. Les cellules BAEC (Bovine aortic endothelial cells, Clonetics/Lonza) ont été cultivées dans le milieu de culture DMEM (Dulbecco modified Eagle medium) supplémenté de 10% de sérum bovin fœtal (FBS) ainsi que de la gentamycine à 50µg/ml à 37°C avec 5% CO₂.

Réactifs et anticorps.

Le VEGF-A (utilisé à 50ng/ml) humain recombinant a été obtenu de la "Resources Branch Preclinical Repository of the National Cancer Institute - Cancer Research and Development Center". Le Fluorescein isothiocyanate (FITC) – dextran (poids moléculaire 40 ou 2000 kDa) a été acheté chez Sigma-Aldrich. Les anticorps primaires suivants ont été utilisés : l'anticorps anti-β-Caténine (1/1000) de chez BD Transduction Laboratories, l'anticorps anti-Src (clone 36D10) (1/1000), l'anticorps anti-p^{Y172} Vav2 (1/1000) et l'anticorps anti-VE-Cadhérine XP (1/1000) de chez Cell Signaling Technologies, l'anticorps p^{Y418} Src (1/1000), l'anticorps p^{Y658} VE-Cadhérine (1/1000) de chez Invitrogen, l'anticorps anti-DEP-1 souris (1/500) et l'anticorps anti-DEP-1 chèvre (1/500) de chez R&D Technologies, l'anticorps anti-PLCγ (1/1000) et l'anticorps anti-Src (clone GD11) (1/1000) de chez Upstate/Millipore. Tous les anticorps secondaires proviennent de chez Cell Signaling Technologies. L'anticorps anti-Vav2 (1/20000) est un don généreux de la part de Dr. Sarita

K. Sastry (Department of Biochemistry & Molecular Biology, Sealy Center for Cancer Cell Biology, University of Texas Medical Branch). L'anticorps p^{S665} VE-Cadhérine (1/500) est un don généreux de la part de Dr. Julie Gavard (Institut Cochin, Université Paris Descartes, UMR-CNRS). Les anticorps phosphospécifiques p^{Y1311} DEP-1 et p^{Y1320} DEP-1 ont été générés pour le laboratoire par GeneScript contre les peptides suivant : CQKDSKDLI[pY¹³¹¹]QNT et CKDSKVDLIYQNTTAMTI[pY¹³²⁰]EN respectivement.

Constructions d'ADNc.

Les plasmides encodant DEP-1 WT ainsi que le mutant C/S qui sont dans le vecteur pmT2 (DEP-1 cloné dans le site EcoR1, sous le contrôle du promoteur AD MLP (Adenovirus Major Late Promotor)), ont été fournis par Nicholas Tonks (Cold Spring Harbor Laboratory, NY, USA) (Ostman, 1994). Les mutants DEP-1 Y1311F, Y1320F et Y1322F/Y1320F ont été générés tel que décrit (Spring, 2012).

Immunodétection et immunoprécipitation.

Les cellules ont été solubilisées avec un tampon de lyse Hepes 50mM pH 7,5 contenant 0,5% Triton X-100, 0,5% Nonidet P0, 10% glycérol, 1mM EDTA, 150mM NaCl, 1mM phénylméthanesulfonyl fluoride (PMSF), 1mM Sodium Vanadate (Na₃VO₄), 5mM Sodium Fluoride (NaF), 10µg/ml d'Aprotinin et 10µg/ml de Leupeptin. La concentration des lysats protéiques obtenus a été déterminée par technique de micro-Bradford et les protéines ont été séparées (entre 30 et 50µg) en les soumettant à l'électrophorèse sur gel SDS-polyacrylamide 8%, puis en les transférant sur une membrane de nitrocellulose (Hybond). Les membranes ont été bloquées une heure avec une solution de BSA 5% (dans le tampon TBST) sauf pour les membranes utilisées pour l'immunodétection de DEP-1, qui ont été bloquées avec une solution de Lait 5% (dans le tampon TBST). L'immunobuvardage a été effectué en utilisant les anticorps primaires indiqués entre 16 et 24 heures, suivi de lavages de 20 et 5 minutes dans le tampon TBST, d'une incubation d'une heure avec l'anticorps

secondaire approprié (dilué dans le tampon TBST) et finalement de 4 lavages successifs de 5 minutes dans le tampon TBST. La détection des l'anticorps a été réalisée en utilisant un système de détection à base de chimioluminescence (ECL de chez Amercham ou Visualizer kit de chez Millipore) avec les anticorps secondaires appropriés. La densitométrie a été effectuée avec le programme Quantify One™.

Phosphorylation endogène de DEP-1 dans les HUVECs.

Les HUVECs ont été étalées à 30 000 cellules par cm² dans des pétris de culture de 60mm de diamètre. Puis, quarante-deux heures plus tard, les cellules ont été sevrées six heures dans le milieu M200 puis stimulées au VEGF (50ng/ml) pour les temps indiqués. Ensuite elles ont été lysées telles que décrites dans la section **Immunobuvardage**.

Transfection des ARNi dans les HUVECs.

Les ARN interférents (ARNi) ciblant DEP-1 (cible 5'-ACCCGTATCTTCTACAATCAA-3') (Hs_PTPRJ_3 No catalogue = SI00044268) et contrôles (AllStars Neg. Control No Catalogue = 1027281) ont été obtenus de chez QIAGEN. Les cellules HUVECs ont été étalées à 22 000 et 30 000 cellules par cm² puis transfectées vingt-quatre heures plus tard avec des ARNi (à une concentration de 50 ou 75µM) en utilisant le réactif DharmaFECT #4 (Dharmacon), suivant les instructions fournies par le manufacturier. Le milieu a été changé suivant une incubation de seize heures et les cellules ont été incubées pour un vingt-quatre heures additionnel. Les cellules ont ensuite été sevrées six heures dans le milieu M200 et stimulées au VEGF (50ng/ml) pour les temps indiqués, puis lysées comme dans la section **Immunobuvardage**.

Transfection d'ADNc de DEP-1 dans les BAECs et les HUVECs.

Les cellules BAECs ont été étalées à $2,1 \times 10^6$ cellules dans des pétris de culture de 100mm de diamètre et transfectées vingt-quatre heures plus tard avec $3 \mu\text{g}$ d'ADNc en utilisant le réactif Lipofectamine 2000 (Invitrogen) selon les instructions du manufacturier. Les cellules ont été incubées seize heures, puis le milieu a été remplacé par le milieu de culture supplémenté. Huit heures plus tard, les cellules ont été sevrées pendant seize heures dans le DMEM seul avec la gentamycine à $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ et ensuite stimulées pour les temps indiqués et lysées comme dans la section **Immunobuvardage**. Les cellules HUVECs ont été étalées à $1,188 \times 10^6$ cellules dans des pétris de culture de 100mm de diamètre et transfectées dix-huit heures plus tard avec $15 \mu\text{g}$ d'ADNc en utilisant le réactif Lipofectin (Invitrogen) selon les instructions du manufacturier. Les cellules ont été incubées 8 heures puis utilisées pour effectuer des expériences de perméabilité in vitro comme expliqué dans la section Test de perméabilité endothéliale ou étalées (2×10^5 cellules dans des pétris de 60mm de diamètre pré-gélatinisés) afin de les lysées pour déterminer l'efficacité de la surexpression de DEP-1.

Immunofluorescence.

Les cellules HUVECs ont été étalées puis transfectées aux ARNi tel que décrit dans la section **Transfection des ARNi dans les HUVECs**. Six heures plus tard, 2×10^5 cellules ont été étalées sur des lamelles de verre préalablement gélatinisés (0,2%) dans une plaque de 24 puits de culture. Vingt-quatre heures plus tard les cellules ont été sevrées deux heures dans le milieu M200 puis stimulées pour les temps indiqués. Elles ont été fixées dans la formaldéhyde (3,7%), perméabilisées avec le Triton X-100 (0,2%) et bloquées dans une solution de sérum bovin fétal (FBS) (8%) pendant 30 minutes. Les lames ont été incubées une heure avec l'anticorps primaire contre la β -Caténine et 45 minutes avec l'anticorps secondaire anti-souris couplé au fluorochrome Alexa488. Les lamelles ont ensuite été montées avec le réactif ProLong Gold (avec DAPI) de Invitrogen/Molecular Probes. Elles ont été visualisées avec le microscope Nikon Eclipse E600 en utilisant le programme NIS

Elements avec des temps d'exposition de 200ms pour le DAPI et de 2s pour le Vert (β -Caténine).

Test de perméabilité endothéliale.

Les cellules HUVECs ont été étalées et transfectées avec des ARNi comme dans la section **Transfection des ARNi dans les HUVECs** ou étalées et transfectées avec des ADNc comme dans la section **Transfection d'ADN de DEP-1 dans les BAECs et les HUVECs**. Puis six heures après, 9×10^4 ou 3×10^5 cellules (pour les expériences de perméabilité suite à la transfection d'ADNc ou d'ARNi, respectivement) ont été étalées. Cet étalement a été effectué en triplicata dans des inserts PET Transwell (pores de $1,0 \mu\text{m}$, diamètre de $6,5 \text{mm}$) (Falcon BD) préalablement incubés deux heures à température pièce avec une solution de collagène de queue de rat type I (Sigma Aldrich) ($50 \mu\text{g/ml}$). Le jour suivant le milieu de culture a été changé, puis le lendemain les cellules ont été sevrées 1 ou 2 heures dans le milieu M200. Ensuite les cellules ont été traitées au VEGF (50ng/ml) en présence de FITC-Dextran (40kDa pour les expériences de perméabilité suite à la transfection d'ADNc ou 2000kDa pour les expériences de perméabilité suite à la transfection d'ARNi) à une concentration de 1mg/ml . La perméabilité à travers la monocouche de cellules endothéliales a été mesurée en prenant des aliquots de $50 \mu\text{l}$ de la chambre inférieure. Ceux-ci ont été dilués dans $200 \mu\text{l}$ de milieu M200. La fluorescence des échantillons a été enregistrée à 520nm (excitation à 498nm) avec le lecteur de fluorescence Victor³ (Perkin-Elmer), puis normalisée grâce à un blanc ($250 \mu\text{l}$ de milieu M200). Les différences statistiques ont été calculées avec le test Mann-Whitney.

Chapitre 3 : Résultats

DEP-1 est impliquée dans la phosphorylation de la VE-Cadhérine dépendante du VEGF.

La phosphorylation de la VE-Cadhérine a été étudiée en premier afin de sonder la signalisation moléculaire sous-jacente de l'implication de DEP-1 dans la perméabilité endothéliale induite par le VEGF. Le raisonnement derrière cette décision est que notre laboratoire a déjà démontré le rôle de DEP-1 dans l'activation de Src en réponse au VEGF (Chabot, 2009). De plus, Src joue un rôle dans la phosphorylation sur tyrosine des protéines d'adhésion telles que les VE-Cadhérines (indicateur de dissociation des jonctions adhérentes (Chou, 2002; Weis, 2004)) et dans la phosphorylation sur sérine de la VE-Cadhérine via Vav2 (indicateur de l'internalisation de la VE-Cadhérine, (Gavard, 2006)). Afin de savoir si l'activité de DEP-1 sur Src pouvait affecter les cibles se trouvant en aval de la kinase, des expériences de transfection d'ARNi ont été effectuées dans les cellules endothéliales HUVECs. Ces cellules sont de type endothéliales humaines, utilisées en culture primaire. En premier lieu, il est possible de constater que la phosphorylation du résidu 658 de la VE-Cadhérine augmente suite à la stimulation des HUVECs au VEGF, et ce en même temps que la phosphorylation de la tyrosine activatrice 418 de Src. Cependant, les niveaux de phosphorylation sur tyrosine 658 de la VE-Cadhérine et la tyrosine 418 de Src sont réduits dans les cellules où l'expression de DEP-1 a été inhibée (Figure 14). Ce site est une cible de phosphorylation directe par Src ainsi que le site d'association entre la VE-Cadhérine et la p120 Caténine (Potter, 2005), une association d'une grande importance pour l'intégrité des jonctions adhérentes (Hatanaka, 2011). Ainsi, il est possible d'imaginer qu'il y a dissociation de ces deux protéines d'adhésion en réponse au VEGF dans les cellules contrôles, et que cette dissociation se produit à bien moins grande échelle dans les cellules dont l'expression de DEP-1 a été réduite. Les niveaux de phosphorylation sur tyrosine 172 de Vav2 sont également diminués dans les cellules transfectées avec des ARNi

ciblant DEP-1 comparativement aux cellules transfectées avec des ARNi contrôles. Plus important encore, la phosphorylation sur sérine 665 de la VE-Cadhérine diminue dans les mêmes conditions, lorsque l'expression de DEP-1 est inhibée. Il est nécessaire de remarquer que les phosphorylations des résidus tyrosine 658 de la VE-Cadhérine et 172 de Vav2 ne sont pas complètement inhibées, ou du moins pas autant que le résidu tyrosine 418 de Src, surtout en ce qui concerne le temps de 7 minutes. Ceci peut être dû au fait qu'il y a une activité de phosphorylation envers ces résidus qui ne dépend pas de Src. Le résidu tyrosine 172 de Vav2 est un site de phosphorylation par Src en réponse au VEGF (Gavard, 2006) et signe de son activation, tandis que le site sérine 665 de la VE-Cadhérine, même s'il n'est pas une cible directe de phosphorylation par Src, est largement dépendant de l'activité de Vav2 (Gavard, 2006) (Figure 14). Ce site est important pour l'internalisation de la VE-Cadhérine, un phénomène qui, bien sûr, est une partie importante de l'intégrité des jonctions adhérentes. Ces résultats moléculaires suggèrent donc qu'il y a possiblement une perturbation de la capacité des cellules endothéliales qui expriment moins de DEP-1 à dissocier leurs jonctions adhérentes en réponse à une stimulation au VEGF.

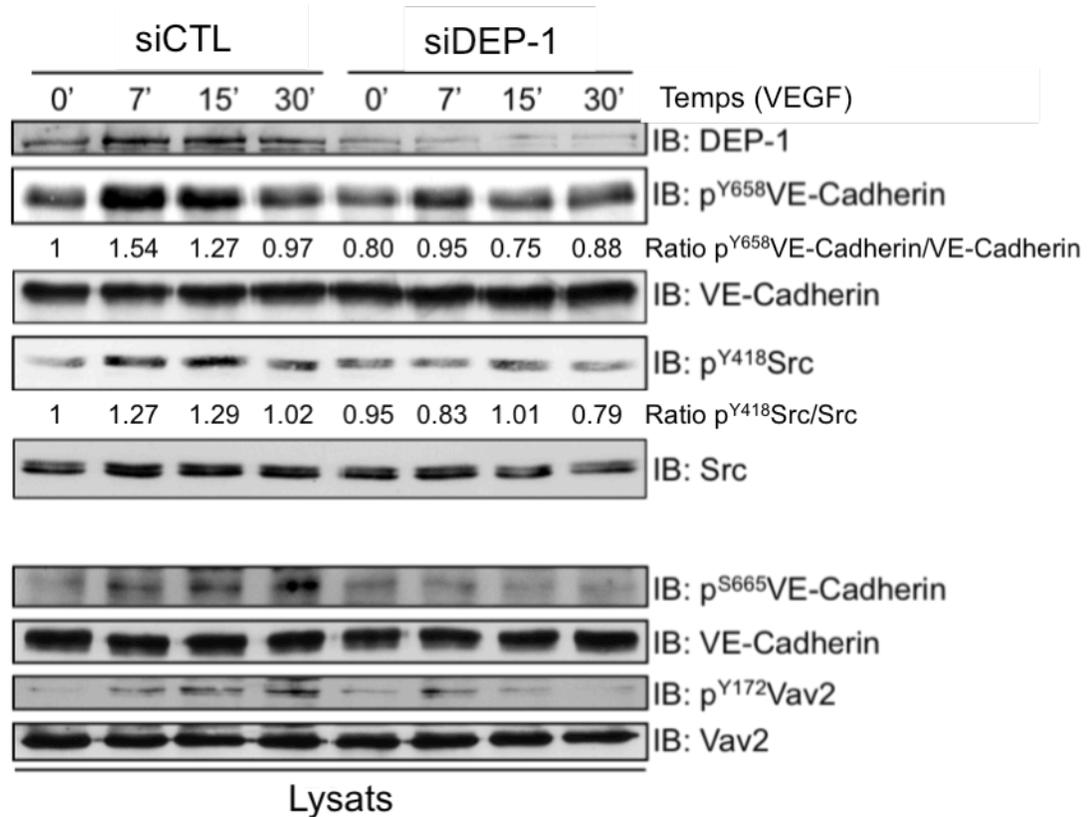


Figure 14 : La diminution de l'expression de DEP-1 diminue la phosphorylation des résidus de la VE-Cadhérine en réponse au VEGF.

Les cellules HUVECs ont été transfectées avec des ARNi (75nM) ciblant DEP-1 puis stimulées au VEGF (50ng/ml). La phosphorylation des résidus Y658 et S665 de la VE-Cadhérine, Y418 de Src et Y172 de Vav2 a été déterminée en immunobuvardant les lysats protéiques (30µg) avec des anticorps phospho-spécifiques. Puis les anticorps ont été décrochés avec une solution acide (Re-Blot Plus Strong, Millipore) et les membranes ont été immunodétectées avec les anticorps ciblant les protéines elles-mêmes pour démontrer des niveaux protéiques égaux. La diminution de l'expression de DEP-1 a été confirmée en immunodétectant les lysats cellulaires avec l'anticorps reconnaissant DEP-1. n = 3

DEP-1 est importante pour le relâchement des jonctions intercellulaires.

Après avoir déterminé l'impact moléculaire de DEP-1 sur des voies de signalisation ayant une importance dans l'association des protéines d'adhésion ainsi que d'autres voies de signalisation ayant une importance dans l'internalisation de la VE-Cadhérine, la localisation de la β -Caténine par microscopie à immunofluorescence a par la suite été investiguée afin de visualiser directement l'impact de DEP-1 sur le relâchement des liens cellules-cellules dans les cellules endothéliales HUVECs en réponse au VEGF. Le choix d'utiliser l'anticorps ciblant la β -Caténine s'explique par le fait que cette protéine se localise bien à la membrane des cellules endothéliales, et que le relâchement des liens intercellulaires en réponse au VEGF s'observe aisément (Figure 15). En effet, il est possible de constater chez les cellules transfectées avec des ARNi contrôles stimulées au VEGF qu'il y ait une perte de liens cellules-cellules entre certaines cellules HUVECs ainsi que ce qui semble être des liens en train de se dissocier. Le temps de stimulation pour cette expérience est de 30 minutes, qui est le temps de stimulation le plus long de l'expérience précédente. Des expériences préliminaires ont été faites avec 0, 7, 15 et 30 minutes de stimulation au VEGF, mais seul le temps de 30 minutes a été conservé, car il était le seul où le phénomène était visible d'une manière suffisamment convaincante. Les cellules dont les liens intercellulaires ne sont pas encore tout à fait défaits ne sont connectées entre elles qu'à quelques points. Il est également possible de voir que le signal de la β -Caténine diminue aux sites de liens cellules-cellules, indiquant peut-être une dégradation de cette protéine ou une relocalisation vers le cytoplasme et/ou le noyau. Chez les cellules transfectées avec des ARNi ciblant DEP-1, il n'y a vraisemblablement plus de relâchement des liens intercellulaires en réponse au VEGF. Effectivement, ces cellules ne semblent pas réagir à la stimulation au VEGF, que ce soit concernant les liens cellules-cellules qui ne se défont pas ou le signal de la β -Caténine qui ne diminue pas. Ainsi, ces résultats suggèrent fortement que DEP-1 est nécessaire pour le remodelage des liens intercellulaires, d'une part par son implication dans les voies de signalisation régulant la phosphorylation de la VE-Cadhérine et d'autre part par son importance dans le relâchement des liens cellules-cellules en réponse au VEGF. Ces résultats mènent alors à croire que DEP-1 pourrait véritablement avoir un

rôle à jouer dans l'induction de la perméabilité des monocouches de cellules endothéliales induite par le VEGF.

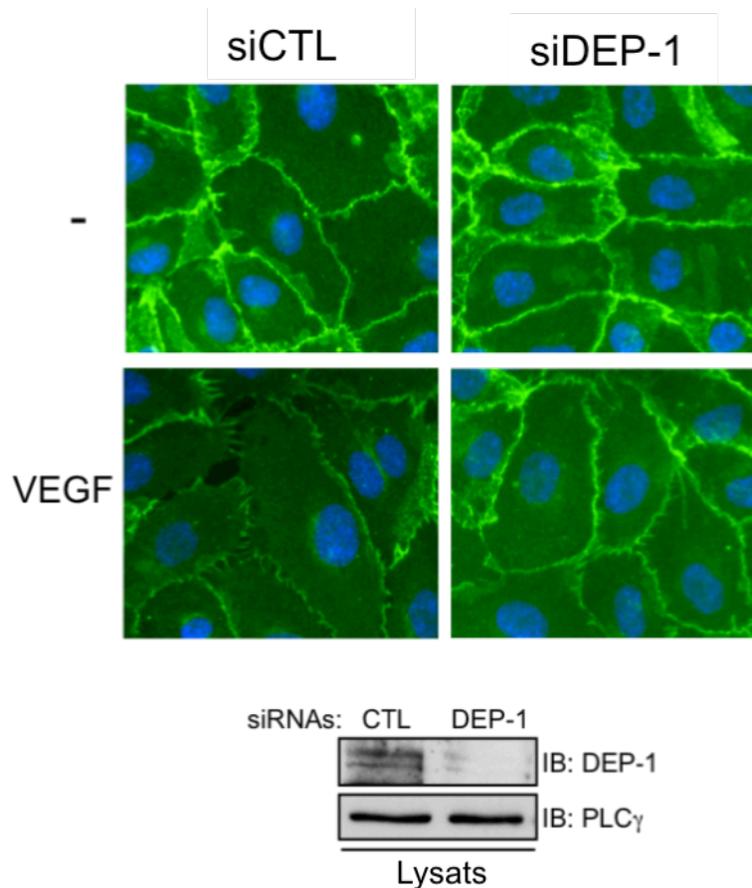


Figure 15 : La déplétion de DEP-1 empêche le relâchement des liens intercellulaires induit par le VEGF.

Les cellules HUVECs ont été transfectées avec les ARNi (75nM) puis étalées sur des lamelles de microscopie préalablement gélatinisées. Une fois la confluence atteinte, les cellules ont été stimulées au VEGF (50ng/ml) pendant 30 minutes puis fixées, perméabilisées et incubées avec l'anticorps ciblant la β -Caténine. Parallèlement, des cellules ont été ensemencées dans des pétris et cultivées dans les mêmes conditions puis lysées afin de déterminer l'efficacité des ARNi. Les niveaux protéiques de DEP-1 et PLC γ ont été déterminés en immunobuvardant les lysats cellulaires avec des anticorps ciblant ces protéines. n = 3

DEP-1 est nécessaire pour la perméabilité vasculaire *in vitro* induite par le VEGF.

Suite à l'évaluation du rôle de DEP-1 dans la signalisation régulant les jonctions adhérentes et à la visualisation directe des liens entre les cellules endothéliales, l'impact de DEP-1 dans la perméabilité endothéliale a ensuite été déterminé. À cette fin, des expériences de perméabilité *in vitro* des cellules HUVECs ont été effectuées. Le temps de stimulation est le même que dans l'expérience précédente d'immunofluorescence (Figure 15), soit 30 minutes. Étant donné que l'expérience de perméabilité *in vitro* représente en fait qu'un seul temps, celui de 30 minutes a été choisi pour être le même que pour l'expérience précédente de fluorescence et également, car il contient les temps de 0, 7, 15 et 30 minutes préalablement utilisés dans la première expérience (Figure 14). Dans les cellules contrôles, il est possible de remarquer une augmentation de la perméabilité en réponse au VEGF, et ce d'environ 100% (Figure 16). Cependant, dans les cellules préalablement transfectées avec des ARNi ciblant DEP-1, cette augmentation a été totalement renversée. Il est même possible d'observer une légère diminution de la perméabilité entre les cellules contrôles non stimulées et les cellules ayant une expression de DEP-1 diminuée, cependant celle-ci n'est pas statistiquement significative. Ce résultat démontre que DEP-1 joue un rôle crucial dans la perméabilité des cellules endothéliales *in vitro* en réponse au VEGF. Puisque nous avons préalablement montré que DEP-1 active Src via ses résidus Y1311 et Y1320 (Spring, 2012), nous nous sommes ensuite penchés sur la phosphorylation de ces résidus en réponse au VEGF ainsi que sur leurs rôles dans la promotion de la perméabilité induite par le VEGF.

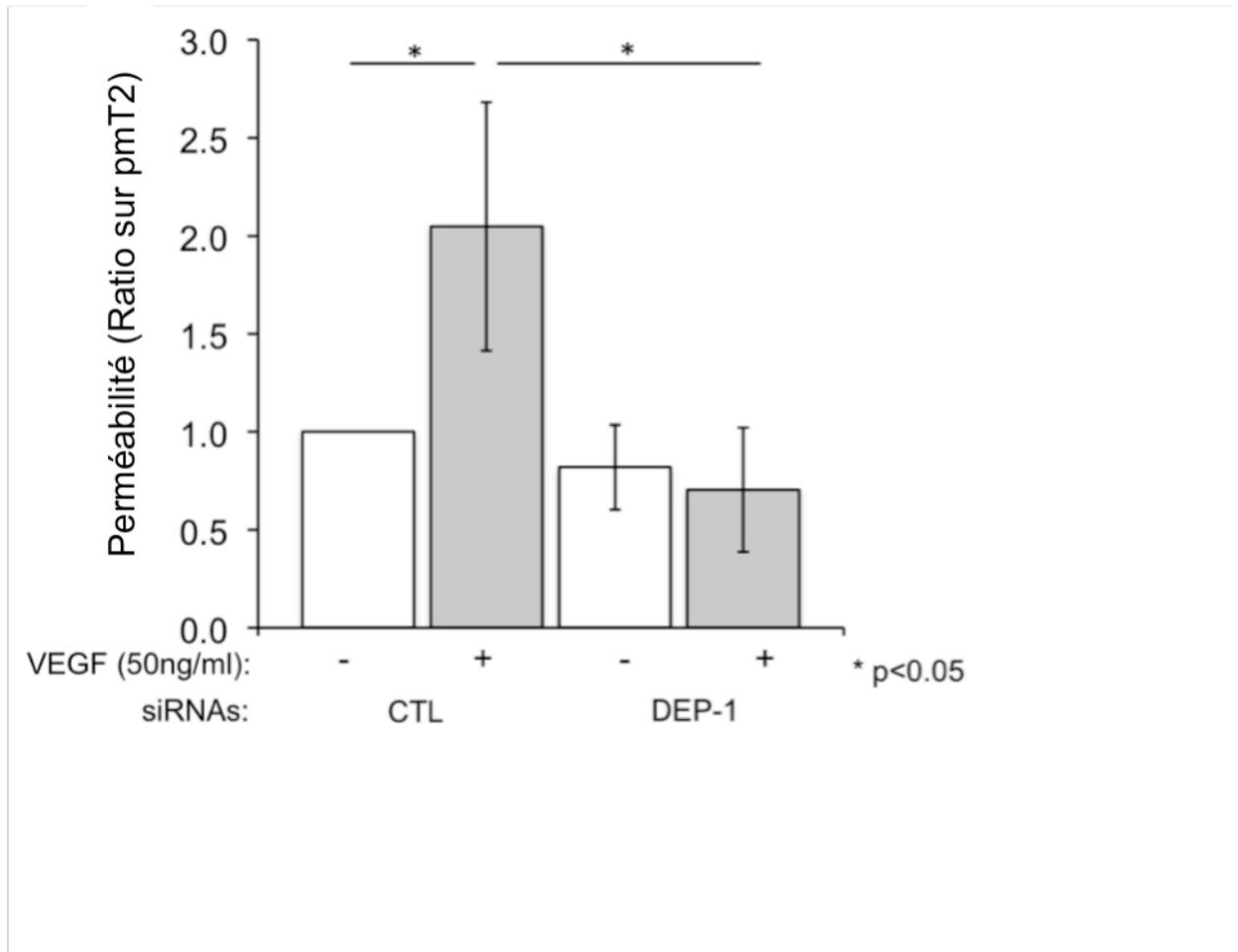


Figure 16 : La réduction de l'expression de DEP-1 renverse l'augmentation de la perméabilité induite par le VEGF.

Les cellules HUVECs ont été transfectées avec des ARNi (50nM) puis étalées sur des inserts de perméabilité. Ensuite elles ont été cultivées deux jours jusqu'à la formation d'une monocouche de cellules étanche. Puis les cellules ont été sevrées et stimulées 30 minutes au VEGF (50ng/ml) en présence de FITC-Dextran (2000kDa) (1mg/ml). Des aliquots ont été prélevés dans la chambre inférieure sous l'insert et la perméabilité a été déterminée en mesurant la fluorescence émise par le FITC. n = 4

Caractérisation des anticorps p^{Y1311} DEP-1 et p^{Y1320} DEP-1.

Afin de déterminer la phosphorylation des résidus Y1311 et Y1320 DEP-1 dans les cellules endothéliales, des anticorps phosphospécifiques reconnaissant ces résidus ont été générés par la compagnie GeneScript puis caractérisés. La première partie de cette caractérisation est une expérience de transfection de DEP-1 C/S (mutant catalytiquement inactif) et Src Y527F (constitutivement actif) (Figure 17A). La cotransfection de la kinase active et de DEP-1 augmente la phosphorylation des résidus Y1311 et Y1320. Cependant, la mutation de ces sites abolit toute phosphorylation, ce qui indique que ces anticorps reconnaissent des signaux spécifiques. La deuxième partie de cette caractérisation était de valider le signal de ces anticorps dans les cellules endothéliales où des expériences de transfection d'ARNi ont été effectuées. Étant donné qu'il s'agit d'expériences ayant uniquement pour but de confirmer la spécificité des anticorps, l'inhibiteur de phosphatases général Pervanadate a également été utilisé afin d'augmenter le signal de phosphorylation de ces résidus. Ainsi, il est clair ici que les niveaux de phosphorylation de Y1311 et Y1320 de DEP-1 augmentent en réponse au VEGF dans les cellules contrôles et que le signal diminue lorsque l'expression de DEP-1 est inhibée dans les cellules stimulées, et ce pour les deux anticorps (Figure 17B). Ces expériences, lorsque considérées dans leur ensemble, démontrent que les anticorps p^{Y1311} DEP-1 et p^{Y1320} DEP-1 sont bel et bien spécifiques. Cependant, bien que ces expériences nous aient permis de valider les signaux que donnent ces anticorps dans les cellules HUVECs, elles ne représentent pas une situation normale ou même idéale de stimulation de cellules endothéliales par le VEGF étant donné qu'elles ont été faites en présence d'un inhibiteur de phosphatases, principales responsables de la déphosphorylation dans les cellules (Tonks, 2006). La prochaine étape était alors de regarder le signal que donnent ces anticorps en absence de cet inhibiteur lors d'une stimulation des cellules endothéliales au VEGF.

Phosphorylation des résidus tyrosine 1311 et 1320 de DEP-1 en réponse au VEGF dans les cellules HUVECs.

Des résultats obtenus dans notre laboratoire ont montré que la phosphorylation de DEP-1 sur ses résidus carboxy-terminaux était requise pour l'activation de Src induite par le VEGF (Spring, 2012). Nous caractérisons donc ici la phosphorylation de DEP-1 en parallèle avec la phosphorylation de la Y418 activatrice de Src (Figure 18). DEP-1 est la cible de plusieurs phosphatases, incluant elle-même (Spring, 2012). Pour cette raison nous avons étudié sa phosphorylation très rapidement après la stimulation au VEGF. Ainsi, les HUVECs ont été cultivées deux jours jusqu'à l'atteinte de la confluence, et elles ont ensuite été stimulées au VEGF 30 secondes, 1 minute, 1 minute 30 secondes, 2 minutes, 7 minutes et 15 minutes. Comme la figure 18 le démontre, les résidus Y1311 et Y1320 de DEP-1 sont phosphorylés rapidement à 30 secondes, atteignant un maximum vers 1 minute 30 secondes / 2 minutes, puis ces phosphorylations diminuent pour retrouver un niveau basal vers 7 minutes de stimulation au VEGF. Ceci confirme alors le bien-fondé de notre décision de préconiser une cinétique plus exhaustive, car la majorité du phénomène se produit avant 7 minutes de stimulation au VEGF. De plus, ces phosphorylations surviennent d'une manière concomitante avec la phosphorylation de la tyrosine activatrice 418 de Src. Ces résultats supportent notre conclusion que ces résidus tyrosine sont impliqués dans l'activation de Src en réponse au VEGF, puisqu'ils sont phosphorylés dans les mêmes temps que Src et que nous avons démontré qu'ils sont requis pour la phosphorylation de Src et de ses substrats dans ces conditions (Spring, 2012). Afin de valider davantage le rôle des résidus tyrosine 1311 et 1320 de DEP-1 dans leur capacité de promouvoir l'activation de Src en réponse au VEGF, nous avons ensuite étudié la phosphorylation de DEP-1 dans les cellules transfectées avec la phosphatase et un mutant non phosphorylable (Y1311F/Y1320F).

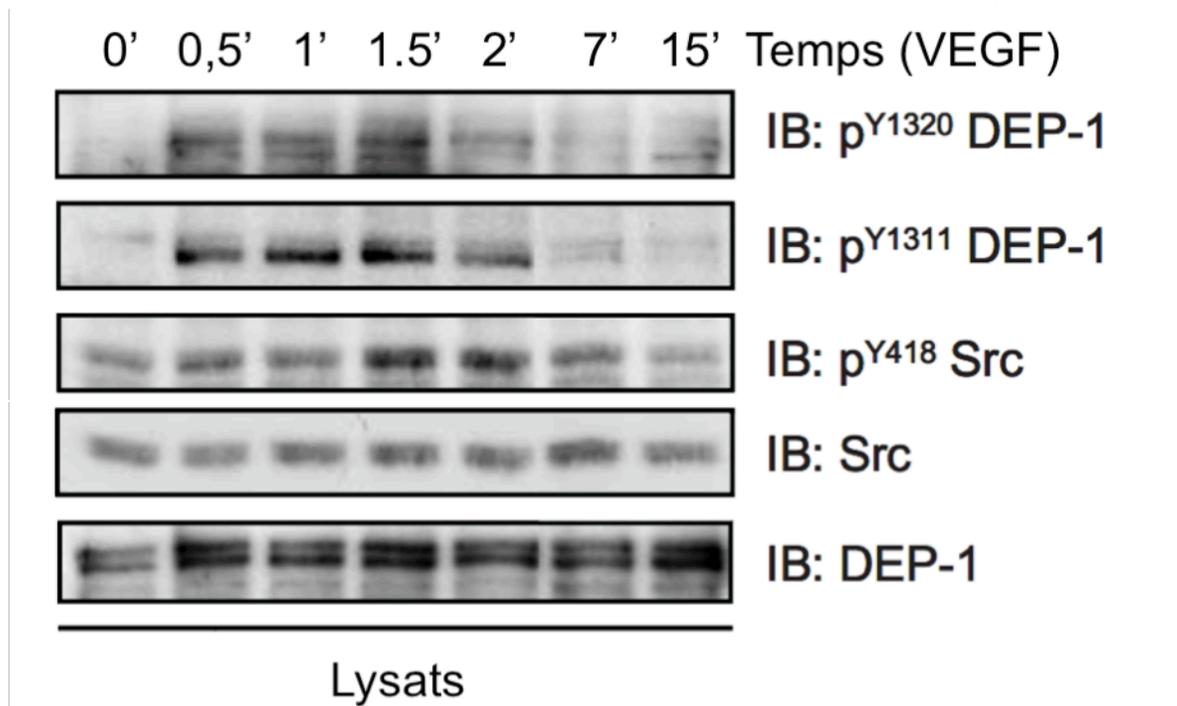


Figure 18 : DEP-1 est phosphorylée sur Y1311 et Y1320 en réponse au VEGF dans les cellules HUVECs, d'une façon concomitante avec la phosphorylation sur Y418 de Src.

Les cellules HUVECs ont été mises en culture deux jours jusqu'à la confluence, sevrées six heures, stimulées au VEGF (50ng/ml), puis lysées afin de produire des lysats protéiques. La phosphorylation des résidus Y1311 et Y1320 de DEP-1 ainsi que Y418 de Src a été déterminée en effectuant des immunobuvardages des lysats cellulaires (30µg) avec des anticorps phospho-spécifiques. Puis les anticorps ont été dissociés avec une solution acide (Re-Blot Plus Strong, Millipore) pour permettre de confirmer les niveaux égaux de protéines en immunobuvardant les membranes avec des anticorps ciblant DEP-1 et Src. n = 3

La transfection de DEP-1 sauvage augmente la phosphorylation sur Y1320 tandis que la transfection de DEP-1 Y1311F/Y1320F la diminue.

Nous avons effectué des expériences de transfection d'ADNc dans les cellules endothéliales afin de vérifier le niveau de phosphorylation de DEP-1 dans ces conditions. Ces expériences ont consisté essentiellement en la transfection de constructions d'ADN (vecteur vide pmT2, DEP-1 sauvage, DEP-1 mutée aux résidus tyrosine 1311 et 1320 ou plus simplement DEP-1 YY/FF) dans les cellules endothéliales BAECs, puis la stimulation de celles-ci au VEGF. Pour cette expérience, ce sont les cellules BAECs, des cellules endothéliales bovines utilisées en culture primaire également, qui ont été choisies, car elles permettent une plus grande surexpression de DEP-1. Le choix des temps de stimulation est pratiquement le même que dans les HUVECs, sauf pour le temps de 1 minute qui a été écarté pour simplifier, car il a été jugé moins important dans les expériences précédentes. La phosphorylation de la tyrosine 1320 de DEP-1 a été choisie dans cette expérience, car des expériences dans notre laboratoire nous ont démontré que cet anticorps donnait le signal le plus spécifique et que ce résidu semble être le plus important dans l'activation de Src par DEP-1 (Spring, 2012). Les résultats de ces transfections montrent que la phosphorylation de la tyrosine 1320 de DEP-1 augmente lorsque la protéine est surexprimée dans les cellules endothéliales BAECs (Figure 19). En effet, bien qu'il y ait un niveau basal de phosphorylation dans les cellules transfectées au vecteur vide pmT2, ce niveau augmente lorsque la construction sauvage de DEP-1 est transfectée, et ce surtout au temps de phosphorylation maximal de ce résidu, qui semble être à 30 secondes dans ces conditions. Par contre, il n'y a plus de phosphorylation retrouvée dans les lysats de cellules transfectées avec le double mutant DEP-1 YY/FF stimulées 7 minutes au VEGF comparativement aux cellules contrôles. Ainsi, il y a une portion du signal de pY¹³²⁰DEP-1 dans les conditions de surexpression de DEP-1 sauvage qui est spécifique au DEP-1 surexprimée, ce qui n'est pas le cas lorsque DEP-1 YY/FF est surexprimée. De plus, la phosphorylation endogène sur tyrosine 1320 dans les cellules endothéliales est récapitulée ici. D'autres expériences dans le laboratoire ont montré que l'expression de DEP-1 bloque l'activation de Src dans les cellules endothéliales (Spring 2012). Ces résultats démontrent

donc que dans ces mêmes conditions, DEP-1 n'est plus phosphorylé sur Y1320, confirmant donc les conclusions du laboratoire à savoir que la phosphorylation de DEP-1 est strictement nécessaire pour l'activation de Src.

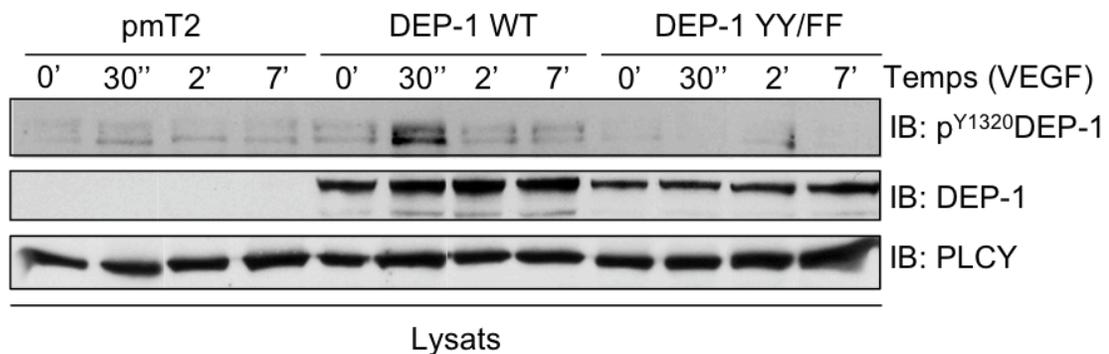


Figure 19 : La transfection de DEP-1 YY/FF bloque entièrement la phosphorylation sur Y1320 dans les cellules endothéliales stimulées au VEGF.

Les cellules BAECs ont été transfectées avec le vecteur seul ou DEP-1 sauvage ou muté pour ses résidus tyrosine 1311 et 1320. Un jour plus tard, elles ont été sevrées 16h puis stimulées au VEGF (50ng/ml) et lysées afin de produire des lysats cellulaires. La phosphorylation de Y¹³²⁰DEP-1 a été déterminée en immunobuvardant les lysats protéiques (30µg) avec un anticorps phosphospécifique. Les niveaux de la protéine DEP-1 elle-même ont également été déterminés en immunobuvardant des lysats cellulaires en utilisant un anticorps ciblant DEP-1. n = 4

Les résidus tyrosine 1311 et 1320 sont essentiels pour la promotion de la perméabilité des cellules HUVECs stimulées au VEGF.

Suite à la démonstration de la phosphorylation de DEP-1 sur Y1311 et Y1320 ainsi que du rôle de ces résidus dans l'activation de Src en réponse au VEGF (Spring, 2012), nous avons voulu vérifier leur implication dans la promotion de la perméabilité vasculaire médiée par le VEGF. Pour ce faire, des expériences de perméabilité endothéliales *in vitro* ont été effectuées en utilisant des cellules HUVECs préalablement transfectées avec les constructions d'ADN suivantes : le vecteur vide pmT2, DEP-1 sauvage, DEP-1 YY/FF et DEP-1 C/S (mutant catalytiquement inactif). Ainsi il est possible d'observer que la surexpression de DEP-1 sauvage augmente significativement la perméabilité des cellules HUVECs stimulées (Figure 20). Cette augmentation de perméabilité est abrogée lorsque que la forme mutante YY/FF est transfectée, à un point tel que le niveau de perméabilité est inférieur à celui retrouvé dans les cellules transfectées avec le vecteur seul ce qui semble indiquer un effet de mutant dominant négatif pour DEP-1 YY/FF. Ceci confirme donc que les résidus tyrosine de DEP-1, impliqués dans l'activation de Src, sont nécessaires pour la perméabilité de monocouche de cellules HUVECs stimulées par le VEGF. Lorsque la forme catalytiquement inactive DEP-1 C/S est transfectée, la diminution de l'activation de la perméabilité des cellules HUVECs est quand même observée, mais pas d'une manière aussi marquée que ce que l'on retrouve chez les cellules transfectées au mutant YY/FF. En effet, le niveau de perméabilité revient plutôt au niveau retrouvé chez les cellules transfectées avec le vecteur seul.

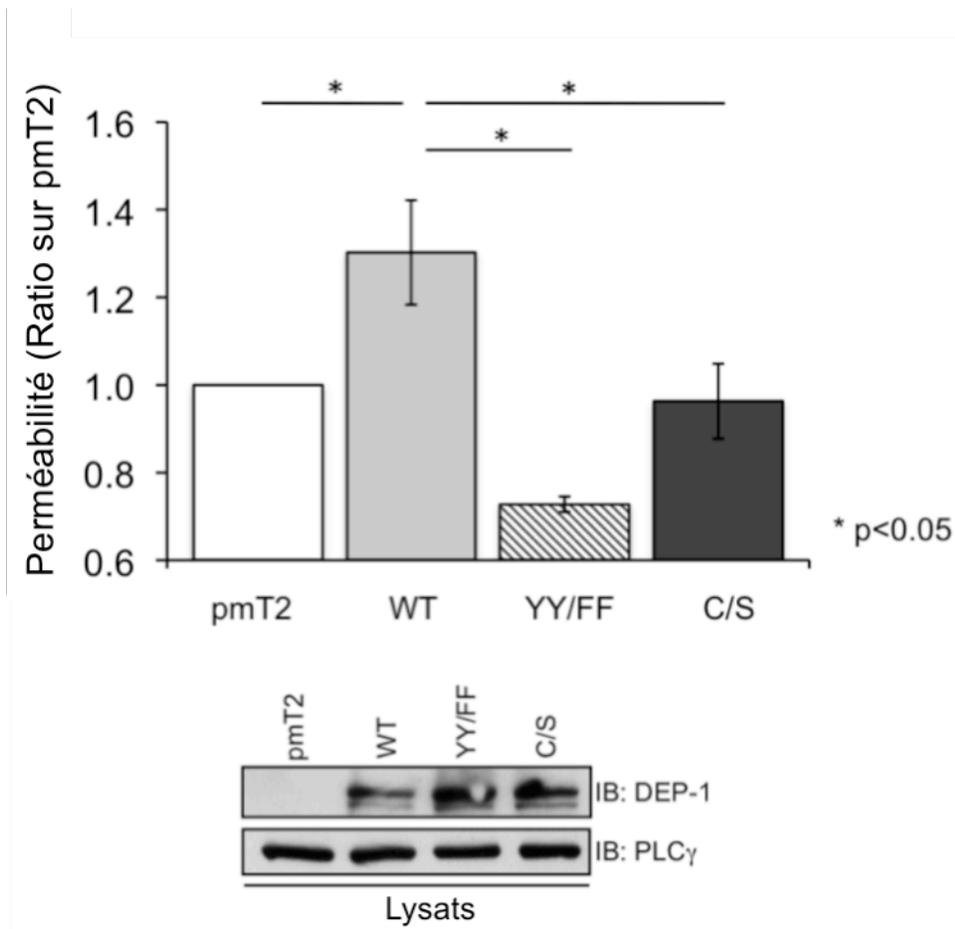


Figure 20 : Les résidus Y1311 et Y1320 de DEP-1 sont impliqués dans l'activation de la perméabilité des cellules HUVECs stimulées au VEGF.

Les cellules HUVECs ont été transfectées avec l'ADNc du vecteur seul (pmT2), de DEP-1 sauvage (WT), de DEP-1 mutée pour ses deux résidus tyrosine carboxy-terminales 1311 et 1320 (YY/FF) et de DEP-1 catalytiquement inactive (C/S) puis étalées sur des inserts de perméabilité. Les cellules ont ensuite été cultivées deux jours jusqu'à la formation d'une monocouche de cellules étanche. Ensuite elles ont été sevrées puis stimulées au VEGF (50ng/ml) en présence du FITC-Dextran (40kDa) (1mg/ml). La perméabilité a été mesurée en prélevant des aliquots de la chambre inférieure sous les inserts et en mesurant la fluorescence émise par le FITC. Parallèlement, des cellules ont été ensemencées dans des pétris de culture dans les mêmes conditions puis lysées afin de déterminer l'efficacité de la transfection des ADNc codant pour DEP-1. Ces lysats protéiques ont été immunobuvardés avec des anticorps ciblant DEP-1 et PLC γ pour confirmer les niveaux égaux de chargement.

n = 3

Chapitre 4 : Discussion

À travers ces travaux, nous démontrons que DEP-1 est absolument cruciale pour la perméabilité endothéliale induite par le VEGF. En premier lieu, nous soulevons qu'en plus d'activer Src en réponse au VEGF, ce qui était déjà connu, DEP-1 contribue à la phosphorylation activatrice de Vav2 et la phosphorylation sur Y658 et S665 des VE-Cadhérines. Ceci a été accompli grâce à des expériences d'inhibition de DEP-1 endogène en utilisant des ARN interférents dans les cellules endothéliales HUVECs. En effet, il est possible de voir une phosphorylation de la tyrosine activatrice 418 de Src, une phosphorylation des résidus Y172 de Vav2 et S665 de la VE-Cadhérine dans les cellules transfectées aux ARNi non spécifiques (contrôles) (Figure 14). Précédemment, dans la littérature, l'activation de Vav2 et la phosphorylation de S665 de VE-Cadhérine a été associée à l'internalisation β -arrestine-dépendante de la VE-Cadhérine et à une augmentation de la perméabilité de la monocouche endothéliale *in vitro* (Gavard, 2006). La déplétion de DEP-1 mène à une forte baisse de ces phosphorylations, surtout Y172 de Vav2 et S665 de VE-Cadhérine. L'effet de DEP-1 sur la phosphorylation sur Y418 de Src a déjà été observé préalablement par notre laboratoire (Chabot, 2009). Mais le travail présenté ici est le premier à démontrer le rôle de DEP-1 dans la régulation de la phosphorylation à la fois de la Y172 de Vav2 et de la S665 de la VE-Cadhérine, cruciales pour l'internalisation β -arrestine-dépendante des VE-Cadhérines.

Il y a un autre résidu de la VE-Cadhérine qui est impliqué dans la perméabilité vasculaire, soit la Y658. Il est montré ici que DEP-1 joue un rôle dans la phosphorylation de ce résidu en réponse au VEGF. La phosphorylation des résidus tyrosine des VE-Cadhérines est observable en réponse au VEGF (Esser, 1998). De plus, cette phosphorylation a été associée avec la dissociation des protéines des jonctions adhérentes dans les cellules endothéliales (Dejana, 2008). Les résidus tyrosine 658 et 731 de la VE-Cadhérine sont les sites de liaison de la p120 Caténine et de la β -Caténine respectivement (Potter, 2005). Les expériences dans ce papier démontrent que lorsque la VE-Cadhérine et

une forme constitutivement active de Src sont transfectées ensemble, la VE-Cadhérine devient phosphorylée sur résidus tyrosine. La cotransfection d'un mutant de VE-Cadhérine pour les deux résidus tyrosine, Y658F/Y731F, avec Src constitutivement active, réduit considérablement cette phosphorylation sur résidus tyrosine. De plus, toujours dans cette même publication, la phosphorylation sur résidus tyrosine des VE-Cadhérines transfectées est induite par le traitement au pervanadate, et cette phosphorylation est presque entièrement abolie lorsque c'est la forme mutante Y658F qui est transfectée. Cette étude indique donc que le site Y658 de la VE-Cadhérine est un site majeur de phosphorylation par Src. Le traitement de cellules endothéliales avec l'inhibiteur de kinase Src PP1 diminue d'ailleurs la phosphorylation induite par le VEGF sur ce résidu (Adam, 2010). Il y a une autre étude qui s'est penchée sur ce résidu, particulièrement sur son rôle dans l'organisation des jonctions adhérentes. En effet, la transfection du mutant Y658F de VE-Cadhérine permet sa liaison avec la p120 Caténine et sa localisation aux contacts cellule-cellule (Hatanaka, 2011). Lorsque c'est plutôt la VE-Cadhérine Y658E (résidu qui mime une phosphorylation) qui est transfectée, la p120 Caténine ne peut se coupler. Ici nous montrons pour la première fois dans les HUVECs que les VE-Cadhérines sont phosphorylées sur Y658 en réponse au VEGF. Cette phosphorylation diminue grandement lorsque l'expression de DEP-1 est inhibée par ARNi. Il est donc possible de penser que le fait que DEP-1 régule la phosphorylation de ce résidu a une incidence sur sa capacité de réguler le remodelage des jonctions intercellulaires et la perméabilité vasculaire.

Tel que soulevé auparavant, ces deux voies de signalisations, convergeant vers la VE-Cadhérine, ne semblent pas initialement être connectées à première vue, mais il se pourrait qu'il y ait un lien. En effet, les phosphorylations activatrices de Src et Vav2 ainsi que la phosphorylation sur S665 de VE-Cadhérine ont été associées avec l'internalisation dépendante de la β -arrestine de cette protéine (Gavard, 2006). La tyrosine 658 de la VE-Cadhérine a été établie comme étant le site de liaison pour la p120 Caténine (Potter, 2005). De plus, la p120 empêche l'endocytose dépendante de la clathrine des VE-Cadhérines (Xiao, 2005). Ainsi, bien qu'il n'existe aucun lien direct entre ces deux séries de phosphorylation, il semble qu'elles pourraient toutes les deux jouer un rôle dans la rotation, ou « turnover », de la VE-Cadhérine à la membrane, et que DEP-1 en serait un régulateur

clé. Comme postulée auparavant, la phosphorylation de Y658 déplace la p120 Caténine, ce qui laisserait la voie libre à la phosphorylation sur S665 et l'internalisation de la VE-Cadhérine. Cette dernière est un processus qui est d'une importance cruciale pour l'intégrité de la barrière endothéliale et donc pour la perméabilité vasculaire, et DEP-1 y joue un rôle.

Des auteurs d'un papier récent ont suggéré que la phosphorylation sur résidus tyrosine des VE-Cadhérines par Src n'était pas suffisante pour affaiblir l'intégrité de la barrière représentée par une monocouche endothéliale (Adam, 2010). Les résultats présentés ici ne contredisent pas cette notion, car même si DEP-1 régule la phosphorylation sur Y658 de la VE-Cadhérine, dépendante de Src en réponse au VEGF, DEP-1 régule également une voie d'internalisation de la VE-Cadhérine (Figure 14). D'autres auteurs ont avancé l'idée que la Y685 de la VE-Cadhérine serait l'unique site ciblé par Src en réponse au VEGF (Wallez, 2007). Ainsi, selon cette étude, il serait possible que la phosphorylation de Y658 de VE-Cadhérine en réponse au VEGF ne soit pas induite par Src. De plus, même dans notre expérience (Figure 14), il semble avoir une petite activité Src-indépendante vis-à-vis le résidu Y658 de la VE-Cadhérine à 7 minutes, car Src semble tout à fait inactif dans ces conditions. Nous ne possédons malheureusement pas de données qui puissent indiquer quel intermédiaire existerait entre DEP-1 et le résidu Y658 de la VE-Cadhérine. Il existe par contre au moins une autre kinase qui a été démontrée comme étant capable de phosphoryler ce site, la kinase PYK2 (Allingham, 2007). Malgré tout cela, de nouvelles études ont démontré que la phosphorylation du résidu Y658 dépendrait vraisemblablement de Src. Effectivement, l'inhibition de Src dans les cellules endothéliales HDMEC (Human dermal microvascular endothelial cell) abolit l'induction de la phosphorylation de Y658, Y685 et Y731 de la VE-Cadhérine par le VEGF (Adam, 2010). Il est alors fort probable que la phosphorylation de Y658 VE-Cadhérine induite par le VEGF et régulée par DEP-1 soit effectivement un produit de l'action de Src, surtout étant donné que la phosphorylation de la tyrosine activatrice de la kinase survienne d'une manière concomitante dans les mêmes conditions.

Des études précédentes (Holsinger, 2002; Palka, 2003; Sallee, 2009) ont suggéré que DEP-1 colocalise avec plusieurs protéines d'adhésion dont la β -Caténine et la p120 Caténine et qu'elles sont des substrats directs de déphosphorylation. Ainsi, bien que nous ayons dépeint une relation entre le VEGF, DEP-1, Src et les VE-Cadhérines, il est bien sûr possible que DEP-1 agisse sur les protéines d'adhésion elle-même ou via d'autres protéines. Ceci est mis en évidence par un résultat préliminaire dans le laboratoire qui démontre une augmentation de la phosphorylation générale sur tyrosine dans une immunoprécipitation de p120 Caténine dans des cellules HUVECs transfectées aux ARNi contrôle ou ciblant DEP-1. Il est cependant important de noter qu'il est possible que la p120 Caténine ne soit pas régulée de la même manière, à savoir que certains auteurs ont suggéré que l'augmentation de sa phosphorylation indique plutôt une plus grande intégrité de ses interactions avec les autres protéines des jonctions adhérentes (Mehta, 2006). De plus, p120 Caténine est un substrat de DEP-1 dans les cellules cancéreuses (Holsinger, 2002). Ainsi, cette action de DEP-1 sur la p120 Caténine dans les cellules endothéliale n'est possiblement pas médiée par Src.

Une autre avenue de réflexion qui est intéressante à considérer est qu'il est probable que la régulation de la perméabilité endothéliale par DEP-1 se fasse via d'autres types de jonctions intercellulaires. En effet, bien que nous avons montré l'impact de DEP-1 sur des phosphorylations clés de la régulation de l'intégrité des jonctions adhérentes, il n'est pas exclu que DEP-1 agisse également sur d'autres types de jonctions intercellulaires, telles que les jonctions serrées par exemple. Un indice menant à une telle possibilité vient du fait qu'une des protéines composant les jonctions serrées, ZO-1, est un substrat de DEP-1 dans les cellules épithéliales (Sallee, 2009). Les protéines de la famille des ZO, dont la ZO-1, interagissent directement avec les occludines, qui forment en partie les jonctions serrées, afin de retenir le complexe des protéines des jonctions serrées au cytosquelette d'actine (Fanning, 1998; Furuse, 1994; Haskins, 1998; Mitic, 1999; Wittchen, 1999). La phosphorylation sur résidus tyrosine de la protéine ZO-1 et de ces partenaires d'association, comme les occludines, dissocie ces protéines (Kale, 2003; Rao, 2002). La phosphorylation des protéines composant les protéines des jonctions serrées peut affecter l'intégrité des jonctions serrées (Sallee, 2009) et donc moduler la perméabilité. Ainsi, si DEP-1 est

impliqué dans la phosphorylation sur résidus tyrosine des membres des jonctions serrées, il se pourrait que la phosphatase soit impliquée dans l'intégrité des jonctions serrées en plus des jonctions adhérentes et que ces deux actions puissent moduler la perméabilité des cellules endothéliales. Donc, DEP-1 pourrait réguler plusieurs des types de jonctions qui composent les liens cellules-cellules.

Il se peut aussi que DEP-1 n'agisse pas directement sur les protéines qui composent les jonctions serrées, mais que cette régulation soit plutôt un effet secondaire de la régulation de DEP-1 des jonctions adhérentes. Effectivement, les VE-Cadhérines se lient avec les autres composantes des jonctions adhérentes, comme la β -Caténine et la plakoglobine. Ces deux dernières se lient avec l' α -caténine, qui à son tour interagit avec d'autres protéines des jonctions serrées comme l' α -actinine, l'ajuba et ZO-1, entre autres (Weis, 2006). Il existe d'autres preuves convaincantes du lien entre les jonctions adhérentes et les jonctions serrées. En effet, les VE-Cadhérines induisent l'expression à la hausse de la claudine-5, composante des jonctions serrées, ce qui indiquerait que les jonctions adhérentes endothéliales contrôleraient les jonctions serrées (Taddei, 2008). Cette étude renforce la notion, déjà avancée dans la littérature, que les VE-Cadhérines sont un joueur crucial pour les dynamiques d'adhésion cellulaires aux jonctions endothéliales (Westweber, 2008). Du même coup, ces études renforcent notre décision de nous concentrer sur l'effet de DEP-1 sur des voies de signalisation qui régulent les VE-Cadhérines dans le contexte de la perméabilité endothéliale.

Plusieurs auteurs (Esser, 1998; Lampugnani, 1997) supportent l'idée qu'il y ait une relation entre la phosphorylation sur résidus tyrosine des protéines d'adhésion et du relâchement des jonctions adhérentes, notion récapitulée ici même. Cependant, il est intéressant de noter que la plupart des données recueillies qui prouvent ce concept ont été obtenues en utilisant des modèles de cultures de cellules (Dejana, 2008). Certains chercheurs ont montré, avec des biopsies d'organes, que les VE-Cadhérines peuvent être phosphorylées *in vivo* dans des tissus issus de souris, et ce en condition angiogénique ou ischémique (Lambeng, 2005; Weis, 2004). Il n'est pas présentement connu si la phosphorylation des VE-Cadhérines fait partie d'un processus ayant lieu lors de situations

normales retrouvées en culture cellulaire ou si c'était plutôt un phénomène existant exclusivement dans des situations pathologiques (Dejana, 2008). Cependant, aucune donnée présentée ici ne permet de clarifier cette situation.

Les expériences d'immunofluorescence de la β -Caténine des cellules endothéliales transfectées aux ARNi et stimulées au VEGF démontrent que les jonctions intercellulaires se relâchent en réponse au VEGF dans les cellules contrôles, mais pas dans les cellules déplétées en DEP-1 (Figure 15). Le résultat obtenu dans les cellules contrôles récapitulent la notion avancée dans plusieurs publications selon laquelle les agents perméabilisants, comme le VEGF, provoqueraient le relâchement des jonctions intercellulaires dans la monocouche de cellules endothéliales dans des études de culture cellulaire (Dejana, 2008). Mais le traitement aux ARNi ciblant DEP-1 semble totalement abolir le relâchement des liens cellule-cellule, au point où ces cellules sont insensibles à l'action du VEGF sur les jonctions intercellulaires. L'insensibilité à un facteur angiogénique, dans le contexte pathologique, peut devenir une caractéristique souhaitable dans un traitement thérapeutique. Cette observation intéressante sera sujette à une autre réflexion à venir plus tard dans cette discussion.

Il y a un autre résultat intéressant provenant des expériences d'immunofluorescence de la β -Caténine présentés ici, soit le signal associé à cette protéine. En effet, celui-ci diminue dans les cellules contrôles lorsqu'elles sont stimulées et reste pratiquement identique dans les cellules transfectées avec des ARNi ciblant DEP-1, stimulées ou non. Il serait possible dans un premier temps d'effectuer des expériences similaires, mais en analysant nos résultats d'une manière plus quantitative, pour confirmer cette diminution. Dans un autre ordre d'idée, il existe des éléments de régulation de la protéine qui peuvent expliquer cette diminution du signal de la β -Caténine. Afin d'expliquer de résultat, il serait intéressant de se pencher sur une autre protéine d'adhésion. Lorsque les VE-Cadhérines deviennent phosphorylées en réponse à des stimuli, elles se dissocient d'elles-mêmes et de leurs partenaires d'association dans les jonctions adhérentes, notamment la β -Caténine. Suite à cela, les VE-Cadhérines restent à la membrane, due à leur nature de protéine transmembranaire. À moins, bien sûr, de recevoir un signal d'internalisation, comme

l'internalisation β -arrestine dépendante induite par la phosphorylation sur sérine 665, produit de la voie Src/Vav2/Rac/Pak (Gavard, 2006). Il est connu que la β -Caténine est une protéine a priori cytoplasmique, donc non retenue à la membrane sinon par association avec une protéine ou un complexe protéique qui l'est, comme les jonctions adhérentes. Il existe une quantité considérable de données qui prouvent que la β -Caténine, une fois phosphorylée sur résidus tyrosine et relâchée des jonctions adhérentes, recevrait un signal de translocation vers le noyau, et ce avant ou après être devenu cytoplasmique. Une fois rendue au noyau, la protéine d'adhésion activerait la production de protéines grâce à sa capacité d'agir en tant que co-activateur de transcription (Yao, 2011). Mais la translocation au noyau n'est pas le seul sort possible pour la β -Caténine dans cette situation. En effet, elle peut également recevoir un signal de dégradation, via la phosphorylation par la sérine/thréonine kinase GSK3 β (Beckers, 2008). D'ailleurs, des résultats non publiés dans le laboratoire montrent que la transfection d'ARNi ciblant DEP-1 dans les HUVECs entraîne l'inhibition de la phosphorylation sur la S9 de la GSK3 β et de la phosphorylation de la β -caténine sur S33/S37/T41. La phosphorylation sur S9 de la GSK3 β est indicatrice de l'activation de la capacité de GSK3 β de cibler la β -Caténine, en la phosphorylant sur S33/S37/T41, pour être ubiquitinylée et éventuellement dégradée (Metcalf, 2011). Ainsi, il se peut que la β -Caténine, dans les cellules transfectées aux ARNi ciblant DEP-1, soit moins susceptible à être dégradée, ce qui expliquerait que le signal demeure aussi fort dans ces cellules après la stimulation au VEGF. Cependant, pour vérifier cette hypothèse, une série d'expériences devrait être effectuée afin d'examiner la stabilité de la β -caténine dans ces conditions. Celles-ci incluraient des expériences de fractionnement cellulaire, afin de séparer les fractions membranaires, nucléaires et cytosoliques, dans les cellules endothéliales transfectées aux ARNi non spécifiques ou ciblant DEP-1 stimulées au VEGF. Ainsi, l'immunobuvardage de la β -caténine ainsi que l'ubiquitine permettrait d'observer la stabilité de la protéine d'adhésion dans ces conditions, donc la quantité qui est dégradée ou qui est en voie de l'être, à la membrane ou dans d'autres compartiments cellulaires.

Il serait bien surprenant de trouver que DEP-1 régulerait des voies de signalisations importantes pour la perméabilité endothéliale et le remodelage des jonctions intercellulaires induit par le VEGF sans que la perméabilité soit régulée par elle également. Les résultats ici

démontrent clairement que la perméabilité endothéliale d'une monocouche cellulaire *in vitro* induite par le VEGF nécessite l'implication de la phosphatase DEP-1 (Figure 16). Cependant le niveau basal de perméabilité endothéliale, dans les cellules transfectées aux ARNi mais non stimulées au VEGF n'a pas été affecté grandement, du moins pas d'une manière statistiquement significative. Ce résultat indique que DEP-1 régulerait plutôt la réponse de perméabilité des cellules endothéliales au VEGF au lieu de réguler la perméabilité vasculaire normalement observable dans un modèle de culture cellulaire.

Dans un autre ordre de questionnement, il se peut également que DEP-1 joue un rôle dans la perméabilité vasculaire induite par des facteurs de croissance perméabilisants autres que le VEGF. Notre laboratoire a déjà démontré que DEP-1 pouvait jouer un rôle dans la survie des cellules en réponse au facteur de croissance FGF (Chabot, 2009). Le FGF, bien qu'il ne peut pas induire la formation de capillaires et moduler la perméabilité aussi efficacement que le VEGF-A (Cao, 2004), est tout de même important pour la perméabilité des cellules endothéliales et l'intégrité vasculaire *in vivo* (Murakami, 2008). Il n'est alors pas impossible de penser que DEP-1 pourrait être important pour la perméabilité endothéliale induite par le FGF. Cependant, le VEGF demeure le facteur de croissance le plus important pour la perméabilité endothéliale (Nagy, 2008).

Grâce à des expériences de transfection d'ARNi dans les cellules HUVECs stimulées au VEGF et traitées au pervanadate (Figure 17B), nous avons prouvé que le signal des anticorps phospho-spécifiques contre les résidus tyrosine 1311 et 1320 de DEP-1 est bel et bien spécifique. Ceci est démontré par la baisse du signal de l'immunobuvardage des résidus tyrosine de DEP-1 lorsque l'expression de DEP-1 diminue dans des cellules stimulées au VEGF, après qu'elle ait augmentée suite à cette stimulation. Il est nécessaire de mentionner les conditions dans lesquelles ont été faites ces expériences, qui ne sont pas naturelles. En fait, l'utilisation du pervanadate empêche aux phosphatases d'effectuer leur travail, castrant ainsi une facette de la régulation signalétique représentée par le jeu de phosphorylation et de déphosphorylation des résidus. Ceci fait en sorte que les kinases peuvent impunément phosphoryler leurs résidus cibles, ce qui résulte évidemment en une augmentation du signal d'immunobuvardage de n'importe quel résidu phosphorylable. Il se

peut alors que des voies de signalisations soient perturbées par l'action de l'inhibiteur des phosphatases pervanadate. Il ne semble pas exister de données qui démontrent qu'un résidu phosphorylable ne le serait plus suite au traitement au pervanadate. Ainsi, dans le cas qui nous concerne, l'utilisation du pervanadate ne sert qu'à rendre plus évidente la spécificité du signal que procurent des anticorps nouvellement générés.

Une fois que la spécificité du signal des anticorps ciblant les résidus tyrosine carboxy-terminales de DEP-1 a été confirmée, la cinétique de phosphorylation de ces résidus a pu être déterminée. Ce que les résultats démontrent est que la phosphorylation se fait rapidement et de manière transitoire, avec une activation optimale après seulement 30 secondes et une diminution du signal vers un niveau presque basal après 7 minutes, pour les résidus tyrosine 1311 et 1320 (Figure 18). La cinétique de phosphorylation de Y418 de Src se déroule dans presque le même échéancier, sauf qu'elle débute un peu plus tard et plus progressivement. Notre laboratoire a prouvé que les résidus tyrosine 1311 et 1320 de DEP-1 sont essentiels pour l'activation de Src par DEP-1 en réponse au VEGF dans les cellules endothéliales (Spring, 2012). Il semble donc logique que la phosphorylation de DEP-1 précède l'activation de Src, si cette dernière en dépend. Cependant, le chevauchement de ces deux cinétiques semble indiquer que les deux événements se déroulent d'une manière dynamique. Cette constatation est davantage supportée par le fait que la phosphorylation des résidus Y1311 et Y1320 de DEP-1 peut être induite par l'ajout d'une forme constitutivement active de Src (Spring, 2012). Il est donc possible que Src, en réponse au VEGF, vienne phosphoryler DEP-1, ce qui permettrait donc l'activation d'une plus grande fraction de la kinase. Bien que la régulation exacte menant à la phosphorylation des résidus tyrosine carboxy-terminales de DEP-1 suite à la stimulation au VEGF demeure inconnue, plusieurs pistes sont maintenant explorées au laboratoire afin d'élucider ce point.

Pour l'étude du rôle des résidus tyrosine de DEP-1 dans les fonctions biologiques des cellules endothéliales, la transfection d'ADNc de la phosphatase sauvage ou mutante s'avère être un modèle efficace, qui a déjà été mis en place pour l'étude des résidus tyrosine de DEP-1 dans l'invasion et la formation de capillaires *in vitro* des HUVECs (Spring, 2012). La démarche à suivre est donc de prouver si les résidus ont un rôle à jouer dans un

processus biologique en privilégiant une approche de surexpression de la phosphatase mutante ou sauvage. Cependant, il était nécessaire de déterminer le niveau de phosphorylation sur Y1311 et Y1320 de DEP-1 en réponse au VEGF. À cet effet, la surexpression de DEP-1 augmente la phosphorylation de Y1320 dans les cellules endothéliales BAECs (Figure 19). Cependant, les niveaux de DEP-1, lorsque le vecteur seul est transfecté, semblent inexistantes. Mais DEP-1 est exprimé de façon endogène dans cette lignée cellulaire, et le fait que cette expression ne soit pas apparente relève plutôt du fait que l'immunobuvardage ait été fait avec une exposition qui ne révèle que DEP-1 lorsqu'elle est surexprimée. Si l'exposition avait été plus longue, il aurait été possible de voir DEP-1 endogène. Il est également possible d'observer que l'expression de DEP-1 mutée Y1311F/Y1320F ne donne aucun signal de phosphorylation sur Y1320 dans les cellules endothéliales stimulées 7 minutes au VEGF. En fait, le signal dans cette condition est encore plus faible que dans n'importe quelle condition de stimulation au VEGF des cellules transfectées par le vecteur seul. Ainsi, la surexpression de DEP-1 augmente la phosphorylation sur Y1320 dans les cellules endothéliales et la mutation Y1311F/Y1320F abolit cette phosphorylation entièrement.

Le dernier résultat présenté ici concerne le mécanisme d'activation de Src par DEP-1 découvert par notre laboratoire et son implication dans la perméabilité endothéliale *in vitro*. Ce qui peut être extrait des expériences de perméabilité *in vitro* des cellules endothéliales transfectées aux ARNi est que DEP-1 ne semble par avoir de rôle à jouer dans la perméabilité basale, dans les cellules non stimulées (Figure 16). Pour cette raison, les expériences suivantes concernant l'implication du mécanisme d'activation de Src dans la perméabilité induite par le VEGF ont été faites uniquement dans des conditions de stimulation. Justement, dans les cellules HUVECs stimulées au VEGF, la surexpression de DEP-1 augmente la perméabilité, tandis que la transfection du mutant Y1311F/Y1320F la diminue et la transfection du mutant catalytiquement inactif de DEP-1 C/S, incapable d'activer Src également, la maintient au niveau basal de la transfection du vecteur seul pmT2 (Figure 20). Il est donc possible d'affirmer que DEP-1 régule l'induction de la perméabilité par le VEGF, et que cette régulation passe par son activation de Src via ses résidus tyrosine 1311 et 1320. Bien qu'il soit particulier que les niveaux de perméabilité lorsque DEP-1

Y1311F/Y1320F est transfectée soient en deçà des niveaux lorsque le vecteur seul est transfecté, ceci peut être expliqué. Comme il a été illustré plus tôt, Src est régulée d'une manière particulière. Lorsqu'elle est en conformation inactive, la kinase est tenue repliée avec l'interaction entre sa tyrosine inactivatrice 529 phosphorylée et son domaine SH2. DEP-1 active Src en liant son domaine SH2 avec ses propres résidus tyrosine 1311 et 1320 (Spring, 2012) et ensuite en ciblant sa Y529 (Chabot, 2009). Ainsi, si nous considérons que le déplacement du domaine SH2 de Src et la déphosphorylation de la Y529 inactivatrice de Src sont deux évènements moléculaires distincts, il se peut que les régulateurs de ces deux actions ne soit pas les mêmes. Il se peut donc qu'il existe moins de régulateurs pouvant déplacer le domaine SH2 de Src que ceux qui peuvent déphosphoryler la tyrosine inhibitrice 529 de Src. Ceci ferait en sorte que la mutation Y1311F/Y1320F, incapable de déplacer le domaine SH2 de Src, aurait un plus grand effet sur la perméabilité endothéliale, dépendante de Src, que le mutant constitutivement inactif C/S de DEP-1, incapable de déphosphoryler la tyrosine inhibitrice 529 de Src.

Chapitre 5 : Perspectives

Après avoir discuté des résultats directement, les prochaines lignes traiteront de la signification possible des travaux présentés ici dans l'élaboration de traitements de certaines pathologies. La première perspective directe des travaux qui ont été présentés ici serait de confirmer les résultats dans un modèle *in vivo*. Le laboratoire a dans sa possession des souris qui sont génétiquement mutées pour DEP-1 et est en mesure d'effectuer des expériences de perméabilité *in vivo*. Ces expériences permettraient de connaître l'impact de DEP-1 sur la perméabilité vasculaire dans un modèle animal, ce qui aiderait grandement dans la quête du rôle de DEP-1 dans les pathologies qui dépendent de la perméabilité vasculaire.

En effet, la perméabilité vasculaire est une composante majeure de plusieurs pathologies qui incluent, mais ne sont pas limitées à : les maladies inflammatoires, les maladies ischémiques, les maladies pulmonaires, les maladies des yeux, la formation de métastases cancéreuses (Weis, 2008) ainsi que plusieurs types d'œdèmes (Weis, 2005). Il a été prouvé que dans certains cas des cellules sont impliquées dans de telles conditions, par exemple des cellules inflammatoires ou des cellules tumorales migratoires. Celles-ci peuvent sécréter des facteurs perméabilisants ou influencer d'autres manières les cellules endothéliales afin de créer une barrière endothéliale plus poreuse et ainsi de faciliter le passage de plus de cellules (Weis, 2005).

Le premier exemple de ceci sont les leucocytes dans l'inflammation. Ceux-ci contribuent à la réponse inflammatoire en sécrétant des produits cytotoxiques et pro-inflammatoires, en phagocytant et en effectuant des attaques dirigées contre des agents exogènes (Ulbrich, 2003). Ils affectent plusieurs processus angiogéniques, principalement parce qu'ils produisent une myriade de facteurs angiogéniques comme le VEGF, PlGF, PDGF, bFGF, Ang2, epidermal growth factor (EGF), TGF- β 1, MCP-1 ainsi que plusieurs interleukines et protéinases (tryptase, chymase, MMPs, heparanase et uPA) (Vacca, 1998;

Norrby, 2002). En condition normale, l'inflammation protège contre des stimuli reliés à l'infection, des traumatismes, l'ischémie, les brûlures, des agents toxiques, les antigènes exogènes et des processus auto-immuns (Nathan, 2002). Il y a une variété de réponses cliniques, qui vont de bénigne à excessive (Kim, 2009). Cette dernière peut être attribuable à la grande quantité de cytokines et de facteurs de croissance qui peut induire des dommages vasculaires (Lehr, 2000). Ceux-ci peuvent mener à la dérégulation des mécanismes de transport paracellulaire et transcellulaire, diminuant la capacité de l'endothélium à contrôler le passage de fluides, de protéines et de solutés (Kim, 2009). Ces vaisseaux sont donc susceptibles aux fuites, une condition connue aussi sous le nom de « leaky vessels ». L'instabilité hémodynamique résultante caractérise les syndromes inflammatoires systémiques et peut résulter chez le patient en une augmentation de la morbidité et la mortalité (Sibbald, 1995; Brun-Buisson, 2000). Étant donné que DEP-1 régule la perméabilité vasculaire des cellules endothéliales induite par le VEGF *in vitro*, comme le travail fait ici le démontre, il se peut que DEP-1 puisse jouer un rôle dans l'inflammation pathologique, particulièrement celle induite par le VEGF.

La migration transendothéliale est définie comme le passage à travers une barrière de cellules endothéliales. Ce passage peut se faire via la voie paracellulaire, entre les cellules, ou transcellulaire, à travers même la cellule endothéliale (Engelhardt, 2004). En situation normale, elle est sollicitée par n'importe quelle cellule qui nécessite un passage à travers le système sanguin, comme les cellules de la réponse immunitaire par exemple. En situation pathologique, la migration transendothéliale peut être exploitée par plusieurs types de cellules, qui sont les vecteurs de certaines maladies (Kim, 2009). Ces cellules peuvent être, par exemple, des cellules du système immunitaire ou des cellules cancéreuses migratoires dans les maladies inflammatoires ou le cancer respectivement.

En premier lieu, il y a le passage des cellules immunitaires. Un exemple de ceci serait le passage des lymphocytes à travers la barrière endothéliale pour sortir de la circulation, ou l'émigration de la circulation, qui est médiée par la phosphorylation sur résidus tyrosine de la VE-Cadhérine (Turowski, 2008). Encore une fois, DEP-1 pourrait avoir un rôle dans ce phénomène. Plus important encore demeure le cas des cancers.

La perméabilité des cellules endothéliales affecte deux étapes de la dissémination des métastases : l'intravasation et l'extravasation des cellules tumorales de la circulation vasculaire (Langley, 2007). L'activation de Src est d'ailleurs critique pour la progression tumorale à la fois dans les cellules tumorales et endothéliales (Kim, 2009). Dans les cellules tumorales, Src contribue à l'expression de facteurs pro-angiogéniques, comme le VEGF-A. Ceci est illustré par des expériences de délétion de Src ou d'activation de la kinase dans des lignées de cancers humains tels que le cancer du côlon (Ellis, 1998), le cancer de l'ovaire (Wiener, 1999) ainsi que les cancers du pancréas et de la prostate (Gray, 2005) où l'expression du VEGF est abrogée. Dans les cellules endothéliales, Src régule la perméabilité de ces cellules (Kim, 2009). La liaison du VEGF à ses récepteurs provoque leur trans-phosphorylation et des interactions avec la famille des kinases Src via leurs domaines SH2 cytoplasmiques. La phosphorylation subséquente de Src et de ses substrats (dont les VE-Cadhérines et la β -caténine) mènent directement à la modulation de la perméabilité de la barrière de cellules endothéliales (Kim, 2009). Cette augmentation de la perméabilité facilite la migration transendothéliale des cellules cancéreuses et leur propagation à travers la circulation vasculaire (Weis, 2004(2)).

Il est fort probable que DEP-1 soit impliqué dans la migration transendothéliale des cellules cancéreuses, et donc joue un rôle dans la dissémination des métastases. Cette implication pourrait comprendre plusieurs mécanismes qui composent cette condition pathologique. Premièrement, il y a la perméabilité de la barrière endothéliale, où il est établi maintenant ici que DEP-1 joue un rôle. Deuxièmement, il y a l'invasion des cellules cancéreuses à travers la matrice extracellulaire ainsi que la migration de ces dernières. Plusieurs expériences faites dans le laboratoire ont démontré que DEP-1 jouait un rôle dans l'invasion dans le Matrigel et la migration des cellules du cancer du sein (Spring, en soumission). En effet, l'expression de DEP-1 augmente dans des lignées plus métastatiques. De plus, en comparant deux variantes de la lignée de cancer du sein MDA-MB-231, dont une qui possède une plus grande capacité de former des métastases aux os, la capacité de formation de métastases corrèlerait une expression plus grande de DEP-1 ainsi qu'une augmentation de la phosphorylation activatrice de Src et d'un substrat impliqué dans ces phénomènes, la cortactine.

Cette implication possiblement profonde de DEP-1 dans la progression du cancer semble contraster avec son rôle préalablement attribué de suppresseur de tumeur. Mais cette ambiguïté apparente du rôle de DEP-1 dans le cancer peut être expliquée. En effet, le rôle de suppresseur de tumeur a été attribué à la phosphatase après qu'il ait été découvert qu'elle ciblait des récepteurs de facteurs de croissance et qu'elle était fréquemment supprimée dans certains cancers humains (Ruivenkamp, 2002). Mais comme nos résultats dans les cellules endothéliales le démontrent, la diminution de l'activité kinase par DEP-1 du récepteur à tyrosine kinase du VEGF, le VEGFR2, n'empêche pas son activation de Src (Chabot, 2009). Ceci découle en fait du mécanisme d'activation particulier de Src, qui doit être déphosphorylé sur sa tyrosine inactivatrice 529 pour être activée, tandis que la déphosphorylation du récepteur VEGFR2 diminue son activité.

Il y a également une autre expérience faite au laboratoire qui est intéressante concernant les implications possibles de DEP-1 dans le cancer. En effet, la transfection d'une quantité grandissante de DEP-1 diminue progressivement la phosphorylation de la tyrosine inactivatrice 529 de Src et augmente progressivement la phosphorylation de la tyrosine activatrice 418 de la kinase (Spring, 2012). Cependant, une fois que cette quantité devient assez grande, la phosphorylation Y418 de Src commence à diminuer aussi, simultanément avec la diminution de Y529 de Src. Le test d'activité kinase de Src dans ces conditions confirme que Src devient activée progressivement jusqu'au point où son activation diminue. Ceci indique que la phosphatase, lorsqu'elle est exprimée en trop grande quantité, perd sa spécificité pour la tyrosine inhibitrice 529 de Src et déphosphoryle également la tyrosine activatrice 418. Ainsi, lorsqu'elle est exprimée à des quantités intermédiaires, DEP-1 active Src, mais lorsqu'elle est exprimée à des grandes quantités DEP-1 n'active pas Src. Ceci pourrait expliquer pourquoi DEP-1 pourrait agir comme suppresseur de tumeur dans certains cancers et comme accélérateur de la progression chez d'autres cancers. En effet, exprimée à des quantités intermédiaires, DEP-1 inhiberait les récepteurs à résidus tyrosine kinases de facteurs de croissance, atténuant la prolifération et la survie des cellules de cancers. Mais DEP-1 activerait Src également, augmentant la capacité de ces cellules à migrer et à effectuer l'invasion dans la matrice extracellulaire. Cependant, lorsqu'elle serait exprimée à de très grandes quantités, DEP-1 inhiberait à la

fois les récepteurs à résidus tyrosine kinases et Src, ce qui diminuerait la prolifération, la survie, la migration et l'invasion à travers la matrice des cellules du cancer. Ceci en ferait donc un suppresseur de tumeur puissant et efficace, expliquant alors pourquoi certains cancers feraient éventuellement l'acquisition de mutations de DEP-1, certaines pouvant empêcher son expression.

Plusieurs stratégies thérapeutiques ont été élaborées jusqu'à maintenant pour contrer la fuite vasculaire lors de l'angiogenèse pathologique. Ces stratégies peuvent être qualifiées en trois types différents. La première est le blocage de récepteurs, que ce soit par des agents vasoactifs comme les antihistaminiques, par des agents contrant les leucocytes comme les antagonistes des CAM ou par des inhibiteurs de l'angiogenèse et du VEGF comme les anticorps anti-VEGFR, le ZM32881, le SU5416 et le Neovastat. La deuxième est l'inhibition de la signalisation, comme l'inhibition de l'entrée du calcium, des Rho kinases, de PKC, de l'activation des leucocytes (par des glucocorticoïdes par exemple) et du VEGF et de l'angiogenèse (par des inhibiteurs de Src). La troisième est le renforcement de la barrière endothéliale via l'élévation du niveau de cAMP par des agents β -adrénergiques ou le ciblage du cGMP ou du NO (van Nieuw Amerongen, 2003). L'élaboration de ces stratégies ne se fait pas sans embûches. Si l'on prend comme exemple les thérapies qui ciblent le VEGF, des mécanismes de résistance en limitent les bienfaits à long terme (Bergers, 2008; Ellis, 2008; Ebos, 2009). En effet, des thérapies anti-VEGF mènent à l'expression à la hausse du PIGF (Fischer, 2007), qui lie à son tour le VEGFR1 menant éventuellement à la transphosphorylation du VEGFR2 (Loges, 2009). D'ailleurs, le traitement avec un anticorps qui bloque la fonction du PIGF inhibe la croissance tumorale et l'angiogenèse et est capable de potentialiser l'effet anti-cancer des thérapies de blocage du VEGFR ou de trappe à VEGF (Fischer, 2007; Van de Veire, 2010). Notre laboratoire a démontré que DEP-1 était impliqué positivement dans la perméabilité, l'élongation et le branchement des capillaires, l'invasion et la prolifération des cellules endothéliales en réponse au VEGF (Chabot, 2009; Spring, 2012). Ces réponses sont cruciales pour la formation de nouveaux vaisseaux sanguins (Eilken, 2010). Cependant DEP-1 inhibe le maintien de la survie des cellules endothéliales en réponse au VEGF (Chabot, 2009). Une des causes principales des effets secondaires des thérapies anti-VEGF est qu'elles visent la

mort des cellules endothéliales (Hanigaimani, 2011). Des traitements ayant plutôt DEP-1 comme cible permettraient, théoriquement, d'empêcher la formation de nouveaux vaisseaux sans affecter la survie des cellules faisant partie de vaisseaux sanguins préexistants.

Il existe d'autres effets secondaires lors de traitements anti-VEGF qui ne résultent pas nécessairement de mécanismes de résistance, mais plutôt de rôles qu'occuperait ce facteur dans la physiologie des vaisseaux sanguins, autre que l'angiogenèse. En effet, l'effet secondaire cardiovasculaire le plus commun de ces traitements est l'avènement de l'hypertension chez ses patients, impliquant donc que le VEGF serait important pour l'homéostasie vasculaire (Hanigaimani, 2011).

Ces exemples sont des preuves que les thérapies antiangiogéniques simples avec une seule cible ne pourraient pas suffire pour contrer l'angiogenèse pathologique. De plus, si cette cible est trop importante pour la régulation normale de la physiologie des vaisseaux sanguins, les thérapies les ciblant peuvent occasionner une variété d'effets secondaires non désirables. L'élaboration de stratégies thérapeutiques complexes, affectant le plus de processus angiogéniques pathologiques possibles, tout en demeurant spécifiques et sans trop miner la santé du patient serait plutôt l'avenue permettant les meilleurs traitements.

Chapitre 6 : Conclusions

Le VEGF et ses récepteurs, ainsi que la kinase Src, affectent plusieurs processus de la progression du cancer et de l'angiogenèse. DEP-1 est impliqué dans ces réponses. Ainsi, sa considération future dans l'élaboration de nouvelles thérapies, que ce soit au niveau de ce qui la régule ou de son activité par exemple, est possible. L'accumulation des connaissances sur les mécanismes régulant la perméabilité endothéliale pourrait permettre l'élaboration de nouvelles techniques limitant la formation d'une barrière endothéliale excessivement poreuse et ainsi stopper la progression des maladies qui en dépendent. Nos résultats s'inscrivent dans cette perspective et détaillent un mécanisme selon lequel DEP-1 régulerait de façon positive la perméabilité endothéliale induite par le VEGF via son activation de Src grâce à 2 résidus tyrosine situés dans sa queue carboxy-terminale. Ces recherches mettent alors à jour un régulateur potentiel de la perméabilité vasculaire *in vivo* induite par le VEGF et de la migration transendothéliale.

Chapitre 7 : Références

- Adam AP, Sharenko AL, Pumiglia K, Vincent PA (2010), Src-induced tyrosine phosphorylation of VE-Cadherin is not sufficient to decrease barrier function of endothelial monolayers, *J Biol Chem* **285**:7045-7055
- Agarwal R, Gomberg-Maitland M (2011), Current therapeutics and practical management strategies for pulmonary arterial hypertension, *Am Heart J*, **162**:201-213
- Allingham MJ, van Buul JD, Burrige K (2007), ICAM-1-mediated, Src- and PYK2-dependant vascular endothelial cadherin tyrosine phosphorylation is required for leukocyte transendothelial migration, *J Immunol* **179**:4053-4064
- Arena S, Pattarozzi A, Massa A, Esteve JP, Iuliano R, Fusco A, Susini C, Florio T (2007), An intracellular multi-effector complex mediates somatostatin receptor 1 activation of phospho-tyrosine phosphatase η , *Molecular Endocrinology* **21**:229-246
- Arora D, Stopp S, Böhmer S-A, Schons J, Godfrey R, Masson K *et al* (2011). Protein tyrosine phosphatase DEP-1 controls receptor tyrosine kinase FLT3 signaling. *J Biol Chem, en presse*
- Arroyo AG, Iruela-Arispe ML (2010), Extracellular matrix, inflammation, and the angiogenic response, *Cardiovasc Res* **86**:226-235
- Autschbach F, Palou E, Mechterscheimer G, Rohr C, Piroto F, Gassler N, Otto HF, Schraven B, Gaya A (1999), Expression of the membrane protein tyrosine phosphatase CD148 in human tissues, *Tissue Antigens* **54**:485-498

- Baker JE, Majeti R, Tangye SG, Weis A (2001), Protein Tyrosine Phosphatase CD148-Mediated Inhibition of T-Cell Receptor Signal Transduction Is Associated with Reduced LAT and Phospholipase C 1 Phosphorylation, *Mol Cell Biol* **21**:2393-2403
- Balavenkatraman KK, Jandt E, Friedrich K, Kautenburger T, Pool-Zobel BL, Östman A, Böhmer FD (2006), DEP-1 protein tyrosine phosphatase inhibits proliferation and migration of colon carcinoma cells and is upregulated by protective nutrients, *Oncogene* **25**:6319-6324
- Beckers CML, Garcia-Vallejo JJ, van Hinsbergh VWM, van Nieuw Amerongen GP (2008), Nuclear targeting of β -Catenin and p120ctn during thrombin-induced endothelial barrier dysfunction, *Cardiovasc Res* **79**:679-688
- Benjamin LE *et al* (1997), Conditional switching of vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in tumors: induction of endothelial cell shedding and regression of hemangioblastoma-like vessels by VEGF withdrawal, *Proc Natl Acad Sci USA* **94**:8761-8766
- Benjamin LE *et al* (1999), Selective ablation of immature blood vessels in established human tumors follows vascular endothelial growth factor withdrawal, *J Clin Invest* **103**:159-165
- Bergers G, Benjamin LE (2003), Tumorigenesis and the angiogenic switch, *Nat Rev* **3**:401-410
- Bergers G, Hanahan D (2008), Modes of resistance to anti-angiogenic therapy, *Nat Rev Cancer* **8**:592-603

- Berset TA, Hoier EF, Hajnal A (2005). The *C. elegans* homolog of the mammalian tumor suppressor Dep-1/Sccl inhibits EGFR signaling to regulate binary cell fate decisions. *Genes Dev.* **19**: 1328-1340
- Borges LG, Seifert RA, Grant FJ, Hart CE, Disteché CM, Edelhoff S *et al* (1996). Cloning and characterization of rat Density-Enhanced Phosphatase-1, a protein tyrosine phosphatase expressed by vascular cells. *Circ Res* **79**: 570-580
- Brumer PM, Heier PC, Mihaly-Bison J, Priglinger U, Binder BR, Prager GW (2011), Density enhanced phosphatase01 down-regulates urokinase receptor surface expression in confluent endothelial cells, *Blood* **117**:4154-4161
- Brun-Buisson C (2000), The epidemiology of the systemic inflammatory response, *Intensive Care Med* **26**:S64-S74
- Cao R, Eriksson A, Kubo H, Alitalo K, Cao Y, Thyberg J (2004), Comparative evaluation of FGF-2-, VEGF-A-, and VEGF-C-induced angiogenesis, lymphangiogenesis, vascular fenestrations, and permability, *Circ Res* **94**:664-670
- Carmeliet P *et al* (1996), Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele, *Nature* **380**:435-439
- Carmeliet P, Lampugnani MG, Moons L *et al* (1999), Targeted deficiency or cytosolic truncation of VE-Cadherin gene in mice impairs VEGF-mediated endothelial survival and angiogenesis, *Cell* **98**:147-157
- Carmeliet P, Jain RK (2000), Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* **407**:249-257
- Carmeliet P (2003), Angiogenesis in health and disease, *Nat Med* **9**:653-660

- Carmeliet P (2005), Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* **438**:932-936
- Cavallero U, Liebner S and Dejana E (2006), Endothelial cadherins and tumor angiogenesis, *Exp Cell Res* **312**:659-667
- Chabot C, Spring K, Gratton JP, Elchebly M, Royal I (2009), New role for the protein tyrosine phosphatase DEP-1 in Akt activation and endothelial cell survival, *Mol Cell Biol* **29**: 241-253
- Chen TT, Luque A, Lee S, Anderson SM, Segura T, Iruela-Arispe ML (2010), Anchorage of VEGF to the extracellular matrix conveys differential signaling responses to endothelial cells, *J Cell Biol* **188**:595-609
- Chou M, Wang J, Fujita D (2002), Src kinase becomes preferentially associated with the VEGFR, KDR/Flk-1, following VEGF stimulation of vascular endothelial cells, *BMC Biochem* **3**:32
- Conway EM, Collen D, Carmeliet P (2001), Molecular mechanisms of blood vessel growth, *Cardiovasc Res* **49**:507-521
- Cross MJ, Dixelius J, Matsumoto T, Claesson-Welsh (2003), VEGF-receptor signal transduction, *TRENDS Biochem Sci* **28**:488-494
- de la Fuente-Garcia M, Nicolas J, Freed J, Palou E, Thomas A, Vilella R *et al* (1998), CD148 is a membrane protein tyrosine phosphatase present in all hematopoietic lineages and is involved in signal transduction on lymphocytes, *Blood* **91**: 2800-2809
- De Smet F, Segura I, De Bock K, Hohensinner PJ, Carmeliet P (2009), Mechanisms of vessel branching: filopodia on endothelial tip cells lead the way, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **29**:639-649

- Dejana E (2004), Endothelial cell-cell junctions: happy together, *Nat Rev Cell Biol* **5**:261-270
- Dejana E, Orsenigo F, Lampugnani MG (2008), The role of adherens junctions and VE-Cadherin in the control of vascular permeability, *J Cell Sci* **121**:2115-2122
- Dimmeler S *et al* (1999), Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation, *Nature* **399**:601-605
- Dong HY, Shahsafaei A, Dorfman DM (2002), CD148 and CD27 are expressed in B cell lymphomas derived from both memory and naïve B cells, *Leukemia and Lymphoma* **43**:1855-1858
- Ebos JM, Lee CR, Kerbel RS (2009), Tumor and host-mediated pathways of resistance and disease progression in response to antiangiogenic therapy, *Clin Cancer Res* **15**:5020-5025
- Eilken HM, Adams RH (2010), Dynamics of endothelial cell behavior in sprouting angiogenesis, *Curr Opin Cell Biol* **22**:1-9
- Ellis LM, Staley CA, Liu W, Fleming RY, Parikh NU, Bucana CD, Gallick GE (1998), Down-regulation of vascular endothelial growth factor in a human colon carcinoma cell line transfected with an antisense expression vector specific for c-src, *J Biol Chem* **273**:1052-1057
- Ellis LM, Hicklin DJ (2008), Pathways mediating resistance to vascular endothelial growth factor-targeted therapy, *Clin Cancer Res* **14**:6371-6375

- Ellison S, Mori J, Barr AJ, Senis YA (2010), CD148 enhances platelet responsiveness to collagen by maintaining a pool of active Src family kinases, *J, Thromb, Haemos*, **8**: 1575-1583
- Engelhardt B, Wolburg H (2004), Transendothelial migration of leukocytes: through the front door or around the side of the house, *Eur J Immunol* **34**:2955-2963
- Esser S, Lampugnani MG, Corada M, Dejana E, Risau W (1998(1)), Vascular endothelial growth factor induces VE-cadherin tyrosine phosphorylation in endothelial cells, *J Cell Sci* **111**:1853-1865
- Fanning AS, Jameson BJ, Jesaitis LA, Anderson JM (1998), The tight junction protein ZO-1 establishes a link between the transmembrane protein occludin and the actin cytoskeleton, *J Biol Chem* **273**:29745-29753
- Ferrara N *et al* (1996), Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene, *Nature* **380**:439-442
- Ferguson FE 3rd, Kelly RW, Patterson C (2005), Mechanisms of endothelial differentiation in embryonic vasculogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **25**:2246-2254
- Fischer C *et al* (2007), Anti-PlGF inhibits growth of VEGF(R)-inhibitor-resistant tumors without affecting healthy vessels, *Cell* **131**:463-475
- Folberg R *et al* (2000), Vasculogenic mimicry and tumor angiogenesis, *Am J Pathol*, **156**:361-381
- Fulton D *et al* (1999), Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt, *Nature* **399**:597-601

- Furuse M, Itoh M, Hirase T, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S, Tsukita S (1994), Direct association of occluding with ZO-1 and its possible involvement in the localization of occluding at tight junctions, *J Cell Biol* **127**:1617-1626
- Gavard J, Gutkind JS (2006), VEGF controls endothelial-cell permeability by promoting the β -arrestin-dependant endocytosis of VE-Cadherin, *Nat Cell Biol* **8**:1223-1234
- Gerber HP *et al* (1998), Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation, *J Biol Chem* **273**:30336-30343
- Gerhardt H, Golding M, Fruttiger M, Ruhrberg C, Lundkvist A, Abramsson A, Jeltsch M, Mitchell C, Alitalo K, Shima D *et al* (2003), VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia, *J Cell Biol* **161**:1163-1177
- Gray MJ, Zhang J, Ellis LM, Semenza GL, Evans DB, Watowich SS, Gallick GE (2005), HIF-1 α , STAT3, CBP/p300 and ref-1/APE are components of a transcriptional complex that regulates Src-dependant hypoxia-induced expression of VEGF in pancreatic and prostate carcinomas, *Oncogene* **24**:3110-3120
- Ha CH, Bennett AM, Jin ZG (2008), A novel role of vascular endothelial cadherin in modulating c-Src activation and downstream signaling of vascular endothelial growth factor, *J Biol Chem* **283**:7261-7270
- Hanahan D, Weinberg RA (2000), The Hallmarks of Cancer, *Cell* **100**:57-70
- Hanahan D, Weinberg RA (2011), Hallmarks of Cancer: The Next Generation, *Cell* **144**:646-674

- Hangai M *et al* (2002), Matrix metalloproteinase-9-dependant exposure of a cryptic migratory control site in collagen is required before retinal angiogenesis, *Am J Pathol* **161**:1429-1437
- Haskins J, Gu L, Wittchen ES, Hibbard J, Stevenson BR (1998), ZO-3, a novel member of the MAGUK protein family found at the tight junction, interacts with ZO-1 and occludin, *J Cell Biol* **141**:199-208
- Hatanaka K, Simons M, Murakami M (2011), Phosphorylation of VE-cadherin controls endothelial phenotypes via p120-catenin coupling and Rac1 activation, *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **300**:H162-H172
- Hattori K *et al* (2001), Vascular endothelial growth and angiopoietin-1 stimulate postnatal hematopoiesis by recruitment of vasculogenic and hematopoietic stem cells, *J Exp Med* **193**:1005-1014
- Hattori K *et al* (2002), Placental growth factor reconstitutes hemapoiesis by recruitin VEGFR1(+) stem cells from bone-marrow microenvironment, *Nature Med* **8**:841-849
- Hickey EJ, Caldarone CA, McCrindle BW (2012), Left ventricular hypoplasia: a spectrum of disease involving the left ventricular outflow tract, aortic valve, and aorta, *J Am Coll Cardiol*, **59**:S43-54
- Hiratsuka S *et al* (1998), Flt-1 lacking the tyrosine kinase domain is sufficient for normal development and angiogenesis in mice, *Proc Natl Acad Sci USA* **95**:9349-9354
- Holsinger LJ, Ward K, Duffield B, Zachwieja J, Jallal B (2002). The transmembrane receptor protein tyrosine phosphatase DEP1 interacts with p120ctn. *Oncogene* **21**: 7067-7076

- Honda H, Inazawa J, Nishida J, Yazaki Y, Hirai H (1994). Molecular cloning, characterization, and chromosomal localization of a novel protein-tyrosine phosphatase, HPTP eta, *Blood* **84**: 4186-4194
- Hu G, Place AT, Minshall RD. (2008), Regulation of endothelial permeability by Src kinase signaling: Vascular leakage versus transcellular transport of drugs and macromolecules, *Chemico-Biological Interactions* **171**:177-189
- Hu G, Minshall RD (2009), Regulation of transendothelial permability by Src kinase, *Microvasc Res* **77**:21-25
- Iervolino A, Iuliano R, Trapasso F, Viglietto G, Melillo RM, Carlomagno F *et al* (2006), The receptor-type protein tyrosine phosphatase J antagonizes the biochemical and biological effects of RET-derived oncoproteins, *Cancer Res* **66**: 6280-6287
- Iuliano R, Trapasso F, Le Pera I, Schepis F, Samà I, Clodomiro A, Dumon KR, Santoro M, Chiarotti L, Viglietto G, Fusco A (2003), An adenovirus carrying the rat protein tyrosine phosphatase η suppresses the growth of human thyroid carcinoma cell lines *in vitro* and *in vivo*, *Cancer Res* **63**:882-886
- Iuliano R, Le Pera I, Cristofaro C, Baudi F, Arturi F, Pallante P, Martelli ML, Trapasso F, Chiariotti L, Fusco A (2004), The tyrosine phosphatase PTPRJ/DEP-1 genotype affects thyroid carcinogenesis, *Oncogene* **23**:8432-8438
- Iuliano R, Palmieri D, He H, Iervolino A, Borbone E, Pallante P, Cianflone A, Nagy R, Alder H, Calin GA, Trapasso F, Giordano C, Croce CM, de la Chapelle A, Fusco A (2010), Role of PTPRJ genotype in papillary thyroid carcinoma risk, *Endocrine-Related Cancer* **17**:1001-1006
- Jussila L, Alitalo K (2002), Vascular growth factors and lymphangogenesis, *Physiol Res* **82**:673-700

- Kale G, Naren AP, Sheth P, Rao RK (2003), Tyrosine phosphorylation of occluding attenuates its interactions with ZO-1, ZO-2 and ZO-3, *Biochem Biophys Res Commun* **302**:324-329
- Keane MM, Lowrey GA, Ettenberg SA, Dayton MA, Lipkowitz S (1996), Protein tyrosine phosphatase DEP-1 is induced during differentiation and inhibits growth of breast cancer cells, *Cancer Res* **56**:4236-4243
- Kim MP, Park SI, Kopetz S, Gallick GE (2009), Src family kinases as mediators of endothelial permeability: effects on inflammation and metastasis, *Cell Tissue Res* **335**:249–259
- Koch S, Tughes S, Li X, Gualandi L, Claesson-Welsh L (2011), Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors, *Biochem J* **437**:169-183
- Kovalenko M, Denner K, Sandström J, Persson C, Gross S, Jandt E *et al* (2000), Site-selective dephosphorylation of the platelet-derived growth factor beta-receptor by the receptor-like protein-tyrosine phosphatase DEP-1, *J Biol Chem* **275**:16219-16226
- Lambeng N, Wallez Y, Rampon C, Cand F, Christe G, Gulino-Debrac D, Vilgrain I, Huber P (2005), Vascular endothelial-cadherin tyrosine phosphorylation angiogenic in angiogenic and quiescent adult tissues, *Circ Res* **96**:84-91
- Lampugnani MG, Corada M, Andropoulou P, Esser S, Risau W, Dejana E (1997), Cell confluence regulates tyrosine phosphorylation of adherens junction components in endothelial cells, *J Cell Sci* **110**:2065-2077

- Lampugnani MG, Zanetti A, Corada M, Takahashi T, Balconi G, Breviario F *et al* (2003), Contact inhibition of VEGF-induced proliferation requires vascular endothelial cadherin, β -catenin, and the phosphatase DEP-1/CD148, *J Cell Biol* **161**:793-804
- Langley RR, Fidler IJ (2007), Tumor cell-organ microenvironment interactions in the pathogenesis of cancer metastasis, *Endocr Rev* **28**:297-321
- Le Pera I, Iuliano R, Florio T, Susini C, Trapasso F, Santoro M *et al* (2005), The rat tyrosine phosphatase eta increases cell adhesion by activating c-Src through dephosphorylation of its inhibitory phosphotyrosine residue, *Oncogene* **24**:3187-3195
- Lehr HA, Bittinger F, Kirkpatrick CJ (2000), Microcirculatory dysfunction in sepsis: a pathogenetic basis for therapy? *J Pathol* **190**:373-386
- Lesueur F, Pharoah PD, Laing S, Ahmed S, Jordan C, Smith PL, Luben R, Wareham NJ, Easton DF, Dunning AM, Ponder BAJ (2005), Allelic association of the human homologue of the mouse modifier Ptp^{rj} with breast cancer, *Hum Mol Genet* **14**:2349-2356
- Lin J, Zhu JW, Baker JB, Weiss A (2004), Regulated expression of the receptor-like tyrosine phosphatase CD148 on hemopoietic cells, *J Immunol* **173**:2324-2330
- Lilien J and Balsamo J (2005), The regulation of cadherin-mediated adhesion by tyrosine phosphorylation/dephosphorylation of β -catenin, *Curr Opin Cell Biol* **17**:459-465
- Loges S, Schmidt T, Carmeliet P (2009), “Antimyoangiogenic” therapy for cancer by inhibiting PIGF, *Clin Cancer Res* **15**:3648-3653
- London GM (2011), Arterial calcification: cardiovascular function and clinical outcome, *Nefrologia*, **31**:644-647

- Makinen T *et al* (2001), Isolated lymphatic endothelial cells transduce growth, survival and migratory signals via the VEGF-C/D receptor VEGFR-3, *EMBO J* **20**:4762-4773
- Martin GS (2001), The hunting of the Src, *Nat Rev* **2**:467-475
- Massa A, Barbieri F, Aiello C, Arena S, Pattarozzi A, Pirani P, Corsaro A, Iuliano R, Fusco A, Zona G, Spaziante R, Florio T, Schettini (2004), The expression of the phosphotyrosine phosphatase DEP-1/PTP η dictates the responsivity of glioma cells to somatostatin inhibition of cell proliferation, *J Biol Chem* **279**:29004-29012
- Matsumoto T, Bohman S, Dixelius J, Berge T, Dimberg A, Magnusson P, Wang L, Wikner C, Qi JH, Wernstedt C *et al* (2005), VEGF receptor-2 Y951 signaling and a role for the adapter molecule TSAd in tumor angiogenesis, *EMBO J* **24**:2342-2353
- Mehta D. and Malik A. B. (2006), Signaling mechanisms regulating endothelial permeability, *Physiol Rev.* **86**:279-367
- Metcalfe C, Bienz M (2011), Inhibition of GSK3 β by Wnt signaling—two contrasting models, *J Cell Sci* **124**:3537-3544
- Mita Y, Yasuda Y, Sakai A, Yamamoto H, Toyooka S, Gunduz M, Tanabe S, Naomoto Y, Ouchida M, Shimizu K (2010), Missence polymorphisms of PTPRJ and PTPN13 genes affect susceptibility to a variety of human cancer, *J Cancer Res Clin Oncol* **136**:249-259
- Mitic LL, Schneeberger EE, Fanning AS, Anderson JM (1999), Connexin-occludin chimeras containing the ZO-binding domain of occluding localize at MDCK tight junctions and NRK cell contacts, *J Cell Biol* **146**:683-693

- Monaghan-Benson E, Burridge K (2009), The regulation of vascular endothelial growth factor-induced microvascular permeability requires Rac and reactive oxygen species, *J Biol Chem* **284**:25602-25611
- Murakami M, Nguyen LT, Zhang ZW, Moodie KL, Carmeliet P, Stan RV, Simons M (2008), The FGF system has a key role in regulating vascular integrity, *J Clin Invest* **118**:3355-3366
- Nagy JA, Benjamin L, Zeng H, Dvorak AM, Dvorak HF (2008), Vascular permeability, vascular hyperpermeability and angiogenesis, *Angiogenesis* **11**:109-119
- Nathan C (2002), Points of control in inflammation, *Nature* **420**:846-852
- Norrby K (2002), Mast cells and angiogenesis, *APMIS* **110**:355-371
- Olsson AK, Dimberg A, Kreuger J, Claesson-Welsh L (2006), VEGF receptor signalling – in control of vascular function, *Nat Rev* **7**:359-371
- Ostman A, Yang Q, Tonks N (1994), Expression of DEP-1, a receptor-like protein-tyrosine-phosphatase, is enhanced with increasing cell density, *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 9680-9684
- Palka HL, Park M, Tonks NK (2003), Hepatocyte growth factor receptor tyrosine kinase Met is a substrate of the receptor protein-tyrosine phosphatase DEP-1, *J Biol Chem* **278**: 5728-5735.
- Park SI, Shah AN, Zhang J, Gallick GE (2007), Vascular permeability by Src family kinases: opportunities for therapeutic treatment of solid tumors, *Expert Opin Ther Targets* **11**:1207-1217

- Papetti M *et al* (2002), Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis, *Am J Physiol Cell Physiol* **282**:C497-970
- Petermann A, Haase D, Wetzel A, Balavenkatraman KK, Tenev T, Gührs KH, Friedrich S, Nakamura M, Mawrin C, Böhmer FD (2011), Loss of the protein-tyrosine phosphatase DEP-1/PTPRJ drives meningioma cell motility, *Brain Pathology* **21**:405-418
- Potter MD, Barbero S, Cheresch DA (2005), Tyrosine phosphorylation of VE-Cadherin prevents binding of p120- and beta-catenin and maintains the cellular mesenchymal state, *J Biol Chem* **280**:31906-31912
- Rafii S *et al* (2002), Efficient mobilization and recruitment of marrow-derived endothelial and hematopoietic stem cells by adenoviral vectors expressing angiogenic factors, *Gene Ther* **9**:631-641
- Rao RK, Basuroy S, Rao VU, Karnaky Jr K, Gupta A (2002), Tyrosine phosphorylation and dissociation of occluding-ZO-1 and E-cadherin-beta-catenin complexes from the cytoskeleton by oxidative stress, *Biochem J* **368**:471-481
- Roskoski Jr R (2008), VEGF receptor protein-tyrosine kinases: Structure and regulation, *Biochem Biophys Res Comm* **375**:287-291
- Rousseau S *et al* (1997), p38 MAP kinase activation by vascular endothelial growth factor mediates actin reorganization and cell migration in human endothelial cells, *Oncogene* **15**:2169-2177
- Ruivenkamp CAL, van Wezel T, Zanon C, Stassen APM, Vlcek C, Csikós T, Klous AM, Tripodis N, Perrakis A, Boerrigter L, Groot PC, Linderman J, Mooi WJ, Meijjer GA, Scholten G, Dauwese H, Paces V, van Zandwijk N, van Ommen GJB, Demant

- P (2002), Ptpnj is a candidate for the mouse colon-cancer susceptibility locus Scc1 and is frequently deleted in human cancer, *Nat Gen* **31**:295-300
- Ruivenkamp C, Hermsen M, Postma C, Klous A, Baak J, Meijer G, Demant P (2003), LOH of PTPRJ occurs early in colorectal cancer and is associated with chromosomal loss of 18q12-21, *Oncogene* **22**:3472-3474
- Sacco F, Tinti M, Palma A, Ferrari E, Nardoza AP, van Huijsduijnen RH *et al* (2009), Tumor Suppressor Density-enhanced Phosphatase-1 (DEP-1) Inhibits the RAS Pathway by Direct Dephosphorylation of ERK1/2 Kinases, *J Biol Chem* **284**: 22048-22058.
- Sallee JL, Burridge K (2009), Density-enhanced Phosphatase 1 Regulates Phosphorylation of Tight Junction Proteins and Enhances Barrier Function of Epithelial Cells, *J Biol Chem* **284**: 14997-15006
- Schlessinger J (2000), New roles for Src kinases in control of cell survival and angiogenesis, *Cell* **100**:293-296
- Senis YA, Tomlinson MG, Ellison S, Mazharian A, Lim J, Zhao Y, Kornerup KN, Auger JM, Thomas SG, Dhanjal T, Kalia N, Zhu JW, Weiss A, Watson SP (2009), The tyrosine phosphatase CD148 is an essential positive regulator of platelet activation and thrombosis, *Blood* **113**:4942-4954
- Shi S (2000), Involvement of c-Src in diperoxovanadate-induced endothelial cell barrier dysfunction, *Am J Physiol* **279**:L441-L451
- Senger DR *et al* (1986), A highly conserved vascular permeability factor secreted by a variety of human and rodent tumor cell lines, *Cancer Res* **46**:5629-5632

- Shalaby F *et al* (1995), Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice, *Nature* **376**:62-66
- Sibbald WJ, Doig G, Inman KJ (1995), Sepsis, SIRS and infection, *Int Care Med* **21**:299-301
- Spring K, Chabot C, **Langlois S**, Lapointe L, Trinh N, Elchebly M, Gavard J, Royal I (2012), Tyrosine phosphorylation of DEP-1/CD148 as a mechanism controlling Src kinase activation, endothelial cell permeability, invasion, and capillary formation, *En correction*
- Solowiej J, bergqvist S, McTigue MA, Marrone T, Quenzer T, Cobbs M, Ryan K, Kania RS, Diel W, Murray BW (2009), Characterizing the effects of the juxtamembrane domain on vascular endothelial growth factor receptor-2 enzymatic activity, autophosphorylation, and inhibition by axitinib, *Biochemistry* **48**:7019-7031
- Taddei A, Giampietro C, Conti A, Orsenigo F, Breviario F, Pirazzoli V, Potente M, Daly C, Dimmeler S, Dejana E (2008), Endothelial adherens junctions control tight junctions by VE-cadherin-mediated upregulation of claudin-5, *Nat Cell Biol* **10**:923-934
- Takahashi T, Takahashi K, Mernaugh R, Drozdoff V, Sipe C, Schoecklmann H, Robert B, Abrahamson DR, Daniel TO (1999), Endothelial localization of receptor tyrosine phosphatase, ECRTP/DEP-1 in developing and mature renal vasculature, *J Am Soc Nephrol* **10**:2135-2145
- Takahashi T, Yamaguchi S, Chida K, Shibuya M (2001), A single autophosphorylation site on KDR/Flk-1 is essential for VEGF-A-dependant activation of PLC- γ and DNA synthesis in vascular endothelial cells, *EMBO J* **20**:2768-2778

- Takahashi T, Takahashi K, St. John PL, Fleming PA, Tomemori T, Watanabe T, Abrahamson DR, Drake CJ, Shirasawa T, Daniel TO (2003), A mutant receptor tyrosine phosphatase, CD148, causes defects in vascular development, *Mol Cell Biol* **23**:1817-1831
- Takahashi H, Shibuya M (2005), The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions, *Clin Sci* **109**:227-241
- Tarcic G, Boguslavsky SK, Wakim J, Kiuchi T, Liu A, Reinitz F *et al* (2009), An Unbiased Screen Identifies DEP-1 Tumor Suppressor as a Phosphatase Controlling EGFR Endocytosis, *Curr Biol* **19**: 1788-1798.
- Thanigaimani S, Kichenadasse G, Mangoni AA (2011), The emerging role of vascular endothelial growth factor (VEGF) in vascular homeostasis: lessons from recent trials with anti-VEGF drugs, *Curr Vasc Pharmacol* **9**:358-80
- Thomas SM, Brugge JS (1997), Cellular functions regulated by Src family kinases, *Annu Rev Cell Dev Biol* **13**:513-609
- Toland A, Rozek LS, Presswala S, Rennert G, Gruber SB (2008), PTPRJ haplotypes and colorectal cancer risk, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **17**:2782-2785
- Tonks NK (2006), Protein tyrosine phosphatases: from genes, to function, to disease, *Nat Rev* **7**:833-846
- Trapasso F, Yendamuri S, Dumon KR, Iuliano R, Cesari R, Feig B, Seto R, Infante L, Ishii H, Vecchione A, During MJ, Croce CM, Fusco A (2004), Restoration of the receptor-type protein tyrosine phosphatase η function inhibits human pancreatic carcinoma cell growth *in vitro* and *in vivo*, *Carcinogenesis* **25**:2107-2114

- Tsuboi N, Utsunomiya T, Roberts RL, Ito H, Takahashi K, Noda M *et al* (2008), The tyrosine phosphatase CD148 interacts with the p85 regulatory subunit of phosphoinositide 3-kinase, *Biochem J* **413**: 193-200.
- Turowski P, Martinelli R, Crawford R, Wateridge D, Papageorgiou AP, Lampugnini MG, Dejana E, Greenwood J (2008), Phosphorylation of vascular endothelial cadherin control lymphocyte emigration, *J Cell Sci* **121**:29-37
- Ulbrich H, Eriksson EE, Lindbom L (2003), Leukocyte and endothelial cell adhesion molecules as targets for therapeutic interventions in inflammatory disease, *TRENDS Pharmacol Sci* **24**:640-647
- Vacca A *et al* (1998), Human lymphoblastoid cells produce extracellular matrix-degrading enzymes and induce endothelial cell proliferation, migration, morphogenesis, and angiogenesis, *Int J Clin Lab Res* **28**:55-68
- Van de Veire S *et al* (2010), Further pharmacological and genetic evidence for the efficacy of PIGF inhibition in cancer and eye disease, *Cell* **141**:178-190
- van Hinsbergh VW, Koolwijk P (2008), Endothelial sprouting and angiogenesis: matrix metalloproteinases in the lead, *Cardiovasc Res* **78**:203-212
- van Nieuw Amerongen GP, van Hinsbergh VWM (2003), Targets for pharmacological intervention of endothelial hyperpermeability, *Vascular Pharmacology* **39**:257-272
- Vincent PA, Xiao K, Buckley KM and Kowalczyk AP (2004), VE-cadherin: adhesion at arm's length, *Am J Physiol Cell Physiol.* **286**:987-997
- Wallez Y, Cand F, Cruzalegui F, Wernstedt C, Souchelnytskyi S, Vilgrain I, Huber P (2007), Src kinase phosphorylates vascular endothelial-cadherin in response to

vascular endothelial growth factor: identification of tyrosine 685 as the unique target site, *Oncogene* **26**:1067-1077

Wallez Y and Huber P (2008), Endothelial adherens and tight junctions in vascular homeostasis, inflammation and angiogenesis, *Biochim Biophys Acta* **1778**:794-809

Waltenberger J *et al* (1994), Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor, *J Biol Chem* **269**:26988-26995

Weis S, Shintani S, Weber A *et al* (2004), Src blockade stabilizes a Flk/cadherin complex, reducing edema and tissue injury following myocardial infarction, *J Clin Invest* **113**:885-894

Weis S, Cui J, Barnes L, Cheresh D (2004(2)), Endothelial barrier disruption by VEGF-mediated src activity potentiates tumor cell extravasation and metastasis, *J Cell Sci* **167**:223-229

Weis SM, Cheresh DA (2005), Pathophysiological consequences of VEGF-induced vascular permeability, *Nature* **437**:497-504

Weis WI, Nelson WJ (2006), Re-solving the cadherin-catenin-actin conundrum, *J Biol Chem* **280**:11675-11682

Weis SM (2008), Vascular permeability in cardiovascular disease and cancer, *Curr Opin Hematol* **15**:243-249

Westweber D, Winderlich M, Cagna G, Nottebaum AF (2008), Cell adhesion dynamics at endothelial junctions: VE-Cadherin as a major player, *TRENDS Cell Biol* **19**:8-15

- Wiener JR, Nakano K, Kruzlock RP, Bucana CD, Bast RC Jr, Gallick GE (1999), Decreased src tyrosine kinase activity inhibits malignant human ovarian cancer tumor growth in a nude mouse model, *Clin Cancer Res* **5**:2164-2170
- Wittchen ES, Haskins J, Stevenson BR (1999), Protein interactions at the tight junction. Actin has multiple binding partners, and ZO-1 forms independent complexes with ZO-2 and ZO-3, *J Biol Chem* **274**:35179-35185
- Wong EYM, Morgan L, Smales C, Lang P, Gubby SE, Staddon JM (2000), Vascular endothelial growth factor stimulates dephosphorylation of the catenins p120 and p100 in endothelial cells, *Biochem J* **346**:209-216
- Xiao K, Allison DF, Kottke MD, Summers S, Sorescu GP, Faundez V, Kowalczyk AP (2003), Mechanisms of VE-Cadherin processing and degradation in microvascular endothelial cells, *J Biol Chem* **278**:19199-19208
- Xiao K, Garner J, Buckley KM, Vincent PA, Chiasson CM, Dejana E, Faundez V, Kowalczyk AP (2005), p120-Catenin regulates clathrin-dependant endocytosis of VE-Cadherin, *Mol Biol Cell* **16**:5141-5151
- Yao H, Ashihara E, Maekawa T (2011), Targeting the Wnt/ β -catenin signaling pathway in human cancers, *Expert Opin Ther Targets* **15**:873-887
- Zhu JW, Brdicca T, Katsumoto TR, Lin J, Weiss A (2008), Structurally distinct phosphatases CD45 and CD148 both regulate B cell and macrophage immunoreceptor signaling, *Immunity* **28**:183-196

