

Université de Montréal

**Étude des mécanismes cellulaires activés par
l'Angiopoïétine-1 et le VEGF régulant la perméabilité
et la migration endothéliales**

par

Malika Oubaha

Programmes de Biologie Moléculaire
Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de PhD
en Programmes de Biologie Moléculaire

Novembre 2012
© Malika Oubaha, 2012

Résumé

L'angiogenèse est la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir d'un réseau vasculaire existant. C'est un phénomène essentiel pour des processus physiologiques et pathologiques. L'activation des cellules endothéliales est contrôlée par plusieurs facteurs de croissance. Le VEGF et son récepteur le VEGFR-2 ont été prouvés comme étant spécifiques et critiques pour la formation des vaisseaux sanguins alors que Tie2, le récepteur auquel se lie l'Ang-1, est requis aussi bien dans le développement vasculaire que dans l'angiogenèse tumorale. Il est connu que l'activation de Tie2 est nécessaire à la stabilisation finale de la vascularisation en inhibant la perméabilité vasculaire induite par le VEGFR-2.

Nous avons premièrement découvert que le facteur de croissance pro-angiogénique, l'Ang-1 contrecarre les effets de perméabilité cellulaire induits par le VEGF en inhibant la production de NO dans les cellules endothéliales. Cet effet inhibiteur de Tie2 intervient directement au niveau de l'activité de l'enzyme eNOS. Suite à l'activation de Tie2 par l'Ang-1, eNOS devient fortement phosphorylé sur la Thr497 après la phosphorylation et l'activation de la PKC ζ . Nos résultats suggèrent que l'inhibition, par Tie2, de la perméabilité vasculaire durant l'angiogenèse serait due, en partie, à l'inhibition de la production de NO.

Deuxièmement nous avons pu distinguer entre deux modes de migration cellulaire endothéliale induits par l'Ang-1 et le VEGF. À l'opposé du VEGF qui promeut une migration individuelle aléatoire, l'Ang-1 induit une migration collective directionnelle. Dans cette étude, nous avons identifié la β -caténine comme un nouveau partenaire moléculaire de la PKC ζ . Cette association de la PKC ζ à la β -caténine amène

le complexe de polarité Par6-aPKC et le complexe des jonctions d'adhérences cellulaires à interagir ensemble à deux localisations différentes au niveau de la cellule endothéliale. Au niveau des contacts intercellulaires, le complexe PKC ζ / β -caténine maintient la cohésion et l'adhésion cellulaire nécessaire pour le processus migratoire collectif. Ce complexe se retrouve aussi au niveau du front migratoire des cellules endothéliales afin d'assurer la directionnalité et la persistance de la migration endothéliale en réponse à l'Ang-1. D'une manière intéressante, lors de l'inhibition de la PKC ζ ou de la β -caténine on assiste à un changement du mode de migration en réponse à l'Ang-1 qui passe d'une migration directionnelle collective à une migration individuelle aléatoire. Ce dernier mode de migration est similaire à celui observé chez des cellules endothéliales exposées au VEGF. Ces résultats ont été corroborés *in vivo* par une polarité et une adhésion défectueuses au cours de la vasculogénèse chez le poisson zèbre déficient en PKC ζ .

En résumé, Ang-1/Tie2 module la signalisation et les réponses biologiques endothéliales déclenchées par le VEGF/VEGFR-2. L'identification des mécanismes moléculaires en aval de ces deux récepteurs, Tie2 et VEGFR-2, et la compréhension des différentes voies de signalisation activées par ces complexes moléculaires nous permettra de mettre la lumière sur des nouvelles cibles thérapeutiques pour le traitement des maladies angiogéniques.

Mots-clés: Cellules endothéliales, VEGF, Angiopoïétine-1, perméabilité, migration, polarité, eNOS, PKC ζ , jonctions d'adhérence

Abstract

Angiogenesis is the formation of new blood vessels from a pre-existing vascular network. It is an essential mechanism for many physiological and pathological conditions. Also, the general mechanism in both conditions remains the same. VEGF and its receptor VEGFR-2 have been proven to be specific and critical for blood vessel formation. The Angiopoietin-1 receptor, Tie2, is required for vascular development as well as in tumor angiogenesis. It is known that the activation of Tie2 is required for vascular stabilization by inhibiting vascular permeability induced by VEGFR-2.

First, we found that the pro-angiogenic growth factor, Ang-1 counteracts the effects of VEGF-induced permeability by inhibiting NO production by endothelial cells. This inhibitory effect of Tie2 acts directly on eNOS activity. Following activation of Tie2 by Ang-1, eNOS becomes highly phosphorylated on the inhibitory site, the Thr497, following PKC ζ phosphorylation and activation. Our results suggest that the inhibition by Tie2 of vascular permeability during angiogenesis is due, in part, to the inhibition of NO production.

In our second study we distinguished between two types of endothelial cell migration induced by Ang-1 and VEGF. At the opposite of Ang-1 that induced collective and directional cell migration, VEGF promoted individual and random cell motility.

We identified β -catenin as a new molecular partner of PKC ζ . This association of PKC ζ with β -catenin brings the Par6-aPKC polarity complex and the adherens junctions complex to interact with each other at two different locations in endothelial cells.

PKC ζ / β -catenin complex is located specifically at cell-cell contacts to maintain cohesion and cell adhesion necessary for the collective migration process. This complex was located also at the leading edge of endothelial cells during migration to ensure the directionality and the persistence of migration in response to Ang-1. In addition, inhibition of PKC ζ or β -catenin switched the migration mode, in response to Ang-1, from directional and collective to a more random and individual cell migration which resembles the type of migration of endothelial cells exposed to VEGF. These results were confirmed *in vivo* by aberrant cell polarity and cell adhesion defects of tip cell during vascular sprouting of intersegmental vessels in PKC ζ deficient zebrafish embryos.

In summary, Ang-1/Tie2 modulates endothelial cell signaling and biological responses induced by VEGF/VEGFR-2. The identification of molecular mechanisms involved in the action of these two receptors, VEGFR-2 and Tie2, and the understanding of the different signaling pathways activated by these molecular complexes will allow us to identify new therapeutic targets for the treatment of angiogenic diseases treatment.

Keywords: endothelial cells, VEGF, Angiopoietin-1, permeability, migration, polarity, eNOS, PKC ζ , adherens junctions.

Table des matières

LISTE DES TABLEAUX.....	x
LISTE DES FIGURES.....	xi
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	xv

CHAPITRE 1

1. Introduction.....	1
1.1 Les Vaisseaux sanguins.....	2
1.1.1 L'endothélium vasculaire.....	2
1.1.2 Les types d'endothélium.....	4
1.1.3 Les jonctions cellulaires.....	5
1.1.3.1 Les jonctions serrées (JS)	7
1.1.3.2 Les jonctions de type Gap ou communicantes.....	9
1.1.3.3 Les jonctions d'adhérences (JA) et régulation de la perméabilité endothéliale.....	10
1.2 Vasculogenèse et Angiogenèse.....	14
1.2.1 Régulation de l'angiogenèse.....	16
1.2.2 Les facteurs angiogéniques.....	19
1.3 Les récepteurs tyrosines Kinase (RTK)	22
1.3.1 RTK et angiogenèse.....	23
1.4 Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF).....	25
1.4.1 La famille du VEGF.....	26
1.4.2 Les isoformes du VEGF-A.....	27

1.4.3 Le VEGF et ses récepteurs.....	29
1.4.3.1 VEGFR-1.....	30
1.4.3.2 VEGFR-3.....	30
1.4.3.4 VEGFR-2.....	31
1.4.3.4.1 Signalisation intracellulaire VEGF/VEGFR-2.....	32
1.4.4 Les corécepteurs au VEGFR-2	35
1.4.4.1 Les neuropilines.....	36
1.4.4.2 Les intégrines.....	37
1.4.4.3 Les héparane-sulfates.....	38
1.4.4.4 VE-cadhérine	39
1.5 Famille des récepteurs Tie.....	41
1.5.1 Les Angiopoïétines (Ang).....	43
1.5.2 Les Protéines de type Angiopoïétines (Angptls).....	46
1.5.3 Signalisation intracellulaire Ang-1/Tie2.....	47
1.5.3.1 Quiescence et maturation des cellules endothéliales.....	48
1.5.3.2 Migration et perméabilité des cellules endothéliales.....	50
1.6 Le monoxyde d'azote.....	51
1.6.1 Les synthèses du monoxyde d'azote (NOS).....	54
1.6.2 Régulation de la synthèse du monoxyde d'azote endothéliale (eNOS).....	56
1.7 Les protéines kinase C (PKC) et la signalisation endothéliale.....	59
1.7.1 Les PKCs classiques (cPKC) et nouvelles (nPKC).....	62
1.7.2 Les PKCs atypiques (aPKCs).....	65

1.8 Polarité cellulaire.....	67
1.8.1 Les complexes de polarité cellulaire.....	70
1.8.1.1 Le complexe Crumbs.....	70
1.8.1.2 Le complexe Scribble.....	71
1.8.1.3 Le complexe de polarité Par-aPKC.....	72
1.9 Migration cellulaire.....	75
1.9.1 La migration cellulaire individuelle et collective.....	76
1.9.2 La migration dirigée ou directionnelle.....	77
1.9.3 Rôle du cytosquelette dans la migration (RhoGTPase)	78
1.10 Objectifs de la thèse.....	79
RESULTATS.....	81
CHAPITRE 2.....	82
CHAPITRE 3.....	126
DISCUSSION.....	188
CONCLUSION.....	201
BIBLIOGRAPHIE.....	205

Liste des tableaux

CHAPITRE 1

Tableau I: Exemples de facteurs pro- et anti- angiogéniques.....	21
--	----

CHAPITRE 3

Supplementary Table I: β -catenin peptides identified by LC-MS/MS.....	181
--	-----

Liste des figures

CHAPITRE 1

Figure 1: Schéma illustrant les composantes moléculaires des jonctions serrées et d'adhérences et cellulaire.....	9
Figure 2: Mécanismes de perméabilité vasculaire.....	13
Figure 3: Vasculogénèse et Angiogénèse.....	16
Figure 4: Les différentes étapes du processus angiogénique	19
Figure 5: Principaux RTK impliqués dans la vasculogénèse et l'angiogénèse.....	23
Figure 6: Structures des récepteurs au VEGF et leurs ligands.....	27
Figure 7: Différentes isoformes du VEGF suite à l'épissage alternatif	29
Figure 8: Les voies de signalisations du VEGFR-2.....	35
Figure 9: Structure des récepteurs Tie.....	42
Figure 10: Représentation schématique de la structure des trois isoformes NOS et ses différents sites consensus de liaison de cofacteurs et de kinase.....	56
Figure 11: Les mécanismes de régulation de l'activité d'eNOS.....	59
Figure 12: Structure des Protéines Kinases C classiques.....	65
Figure 13: Structure des Protéines Kinases C atypiques.....	66
Figure 14: Le complexe de polarité Par (Par-3-Par-6-aPKC).....	74

CHAPITRE 2

Figure 1: Ang-1 stimulation counteracts VEGF-induced transendothelial permeability and NO production.....	113
---	-----

Figure 2: Ang-1 activates PKC independently of PLC γ but does not inhibit VEGFR-2 activation and signalling.....	114
Figure 3: Ang-1 induces phosphorylation of eNOS on the inhibitory Thr497 site.....	115
Figure 4: Phosphorylation of eNOS on Thr497 is required for inhibition of NO production by Tie2.....	116
Figure 5: Inhibition of PKC ζ prevents phosphorylation of eNOS on Thr497.....	117
Figure 6 Overexpression of PKC ζ counteracts VEGF-induced NO production.....	118
Figure 7: PKC ζ knockdown reverses the inhibition by Ang-1 of eNOS, NO release and of endothelial permeability.....	119
Supplementary Figure 1: Ang-1 stimulation counteracts VEGF-induced transendothelial permeability and NO production.....	122
Supplementary Figure 2: Tie2 activation by Ang-1 does not alter activation of VEGFR-2 by VEGF.....	123
Supplementary Figure 3: Overexpression of kinase-dead PKC ζ inhibits Ang1-induced enos phosphorylation at Thr497.....	124
Supplementary Figure 4: PKC ζ knockdown in BLMVEC reverses the inhibition by Ang-1 of eNOS, NO release and of endothelial permeability.....	125

CHAPITRE 3

Figure 1: Ang-1 induces collective directional endothelial cell migration.....	165
--	-----

Figure 2: Ang-1 induces the association of PKC ζ with β -catenin in endothelial cells.....	166
Figure 3: PKC ζ and β -catenin are required for Ang-1 induced persistent cell migration and for leading edge formation.....	167
Figure 4: Ang-1 induces the colocalization of polarity and adherens junction proteins at the leading edge of migrating endothelial cells.....	168
Figure 5: PKC ζ and β -catenin are required for polarized Rac1 activation at the migrating front of endothelial cells.....	169
Figure 6: PKC ζ is required for developmental angiogenesis in zebrafish and for endothelial cell sprouting.....	170
Supplementary Figure 1: PKC ζ associates with β -catenin.....	182
Supplementary Figure 2: Depletion of PKC ζ or β -catenin disrupts in endothelial cells directional and collective cell migration.....	183
Supplementary Figure 3: Cell-cell junctions are required for PKC ζ / β -catenin complex formation.....	184
Supplementary Figure 4: Polarity and adherens junction protein complexes are localized at the leading edge of migrating endothelial cells.....	185
Supplementary Figure 5: Tie2 does not associate with the PKC ζ / β -catenin complex.....	186
Supplementary Figure 6: Fluorescent images of YFP corresponding to FRET time-lapse imaging series presented in Figure 5A.....	187

Liste des abréviations

ABIN2: Inhibiteur du NF- κ B

AGC: Famille des protéines kinase (PKA/PKG/PKC)

Ang : Angiopoïétine

Angptl: Ang-like

AMPc: Adénosine monophosphate cyclique

AMPK: AMP kinase

ASIP: Protéine interagissant avec l'isoforme spécifique α PKC

ATP: Adénosine triphosphate

BAEC: CE de l'aorte bovine

BH4: Tétrahydrobioptérine

BLMVEC: CE microvasculaires pulmonaire bovine

Ca²⁺ : Calcium intracellulaire

E-cadhérine: Cadhérine épithéliale

N-cadherin: Cadhérine Neuronale

VE-cadherin: Cadhérine endothéliale vasculaire

CaM: Calmoduline

CE: Cellules endothéliales

CML: Cellules musculaires lisses

Crb: Crumbs

CRIB: Liaison *interactive* à Cdc42, Rac

DAG: Diacylglycérol

DLG: Disques larges

Dok-R: Downstream of tyrosine kinases

EGF: Facteur de croissance épidermique

EMT: Transition d'épithéliale à mésenchymale

ERK: Kinase régulée par signal extracellulaire

E-sélectine: Sélectine endothéliale

FA : Adhérences focales

FAD: Flavine adénine dinucléotide

FAK: Kinase des adhésions focales
FGF: Facteur de croissance fibroblastique
bFGF: FGF basique
FMN: Flavine mono-nucléotides
GAP: Protéine à activité GTPase
GCs: Guanylate cyclase soluble
GEF: Facteurs d'échange guanine nucléotide
GMPc: Guanosine monophosphate cyclique
GRB: Protéine liée au récepteur de facteur de croissance
GTP: Guanosine tri-phosphate
HDMEC: CE microvasculaires du derme humain
HGF: Facteur de croissance hépatocytaire
Hsp90: Protéine de choc thermique 90
HUVEC: CE vasculaires de la veine ombilicale humaine
ICAM1: CAM intercellulaire
Ig: Domaine immunoglobuline
IGF: Facteur de croissance de l'insuline
IL-4: Interleukine-4
JA: Jonctions d'adhérence cellulaire
JAM: Molécules d'adhésion jonctionnelles
JS: Jonctions serrées
JG: Jonctions de type Gap
JNK: Kinase NT c-Jun
LB: Lame basale
LGLI: Larves létales géantes
L-NMMA: NG-mono-méthyl-L-arginine
MAPK: Protéine kinase activée par les mitogènes
MCP-1: Protéine-1 chimiotactique des monocytes
mDia: Mammalian diaphenous
MEC: Matrice extracellulaire
MMP: Metalloproteinases de la matrice

NADP: Nicotinamide-adénine-dinucléotide phosphate
NF- κ B: Inhibiteur du facteur nucléaire- κ B
NO: Monoxyde d'azote
NOS: Synthèse du NO
eNOS: NOS endothéliale
nNOS: NOS neuronale
iNOS: NOS inductible
NOSIP: NOS interacting Protein
NRK: Normal Rat kidney cells
NRP: Neuropiline
O²⁻: Anions superoxyde
ONOO⁻: Peroxynitrite
PAF: Facteur d'activation plaquettaire
Par: Partitionnement défectueux
PAK: P21 protein (Cdc42/Rac)-activated kinase 1
PALS: Protéine associée à LIN-7
PATJ: PALS1 associés aux protéines des jonctions serrées
p62: Protéine 62
PB1: Phox/Bem1
PDGF: Facteur de croissance dérivé des plaquettes
PDK: Kinase dépendante de PIP3
PDZ: PSD95, Dlg1, zo-1
PECAM: CAM
PG: Prostaglandine
PI3K: Phosphatidylinositol 3 Kinase
PKA: Protéine kinase A
PKC: Protéine kinase C
cPKC: PKC classique
nPKC: PKC nouvelles
aPKC: PKC atypique
PKD: Polykystose rénale

PKC: Protéine Kinase C
PKG: Protéine kinase G
PKA: Protéine kinase AMPc-dépendante
PLA: Phospholipase cytosolique A2
PMA: Phorbol 12-myristate 13-acétate
PP1: Protéine phosphatase 1
PP2A: Protéine phosphatase2A
PS: Phosphatidylsérine
PSD: Post synaptic density protein
Pyk2: Proline-rich tyrosine kinase 2
RACK: Récepteurs pour kinase C active
ROS: Espèces réactives de l'oxygène
RTK: Récepteurs à activité TK
SEMA: Semaphorine
SHP: Protéine tyrosine phosphatase
Sdt: Stardust
SOD: Superoxyde dismutase
TEK: Tunica Internal Endothelial Cell Kinase
TF: Facteur tissulaire
Tiam1: T-cell lymphoma invasion and metastasis-inducing protein 1
Tie: TK with immunoglobulin-2 and EGF-like domain
TNF α : Facteur de nécrose tumorale alpha
TNIP: Inhibiteur du NF- κ B
TK: Tyrosine Kinase
TKI: TK inhibitors
TRPC1: Transient receptor potential channel 1 (TRPC1)
VCAM: CAM vasculaire
VEPTP: Protéines tyrosines phosphatase vasculaire endothéliale
VEGF: Facteur de croissance endothéliale
VEGFR: Récepteur du VEGF
VVO: Organelles vésiculo-vacuolaires

ZIP: Protéine interagissant avec PKC ζ

ZO: Zonula occludens

A mes parents

Remerciements

Ce manuscrit conclut de longues années de travail, je tiens en quelques lignes à exprimer ma reconnaissance et ma gratitude envers toute personne qui a participé de près ou de loin à l'accomplissement de cette thèse.

Tout d'abord un grand merci sans limite à mon directeur de recherche, Dr Jean Philippe Gratton de m'avoir accueilli dans son laboratoire, de m'avoir accordé le soutien académique et financier nécessaire tout au long de mon doctorat. Je vous suis très reconnaissante.

Un Grand Merci à Docteur Lucian Ghitescu d'avoir accepté et pris le temps de lire et de commenter ma thèse.

Merci à tous les membres de mon comité de thèse qui ont supervisé et dirigé mon travail à chaque étape de mon stage doctoral. Un merci particulier au Dr Marie Kmita qui a présidé tous mes comités de thèse et qui a accepté de m'accompagner jusqu'à l'évaluation finale de ma thèse.

Merci à tous mes collaborateurs, spécialement, Dr Jean François Côté et son post-doctorant Yoran Margaron, Dr Nicole Beauchemin et sa post-doctorante Anne-Laure Nouvion.

Merci à tous mes collègues du laboratoire passés et présents. Un merci spéciale pour toi Mariela Garcia Blanes de m'avoir fait participer à ton premier papier. Merci à Yohann Ratureau et Sébastien Thibault de m'avoir donné la chance de collaborer sur l'une des plus élégantes et prestigieuses études sur la perméabilité endothéliale et le monoxyde d'azote.

Mille mercis à toi Fanny d'avoir accepté de lire ma thèse dans un temps record malgré tes nouvelles occupations avec le nouveau Bébé

Chantal Delisle, un grand merci pour ton soutien indéfectible aussi bien sur le plan humain que scientifique.

Merci à mes deux frères Karim et Kamal et à mes chers parents qui étaient et resteront toujours disponibles et à l'écoute, merci de votre soutien

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

1.1 Les vaisseaux sanguins

Le système vasculaire est un système caractérisé par une structure hautement ramifiée en réseau. Les vaisseaux sanguins sont des conduits permettant le transport du sang et l'irrigation de l'ensemble des organes de façon appropriée. Ils forment des circuits fermés de plus de 100000 km de long. Il existe 3 types de vaisseaux sanguins: les artères, les veines et les capillaires qui diffèrent selon leur taille, leur structure et leur fonction, mais ils sont tous tapissés par une couche de cellules endothéliales (CE) faisant face à la lumière vasculaire. Les artères et les veines sont morphologiquement et physiologiquement distinctes et expriment différents facteurs (Ephrines, Notch, Sonic hedgehog, VEGF, Tie2) dès le stade du plexus vasculaire primitif avant même la mise en place d'une circulation sanguine. L'étude de l'interrelation entre ces facteurs permettrait de mieux comprendre la plasticité, la programmation et la signalisation au sein d'un type de cellule endothéliale donné qui pourrait être d'intérêt afin de mieux comprendre les désordres ainsi que les pathologies vasculaires.

1.1.1 L'endothélium vasculaire

L'endothélium est la monocouche pavimenteuse de CE localisées sur la face interne de tous les types de vaisseaux sanguins. C'est le plus grand organe endocrinien fonctionnel du corps humain. Au cours du développement embryonnaire, l'endothélium se différencie à partir d'hémangioblastes pour former des vaisseaux sanguins. Récemment, plusieurs études suggèrent la présence de CE circulantes avec des propriétés de cellules souches qui peuvent se différencier en CE suite à des stimulations par des cytokines¹ ou des facteurs de croissance.² L'endothélium permet le

transport de l'oxygène et des nutriments et constitue en même temps une barrière physique sélective qui contrôle le passage de l'eau, des ions et autres petites molécules du sang vers les différents tissus. Cet emplacement stratégique de l'endothélium entre le sang et les tissus sous-jacents lui confère un rôle polyvalent dans la libération de différentes substances métaboliques actives essentielles pour la régulation vasculaire.³ L'endothélium permet le maintien de la fluidité du sang en produisant des anticoagulants afin d'atténuer l'activité des plaquettes, des antiathéroscléreux et des anti-thrombotiques.⁴ Il promeut la fibrinolyse à travers les tissus et permet l'interaction directe des CE avec les leucocytes et d'autres cellules circulantes,^{5,6} lors des lésions tissulaires et en cas d'inflammation. En effet, les leucocytes expriment des protéines (L-sélectine et les intégrines) qui s'associent avec des molécules d'adhésion (ICAM1, PECAM et VCAM) à la surface des CE qui contrôlent la transmigration des cellules du système immunitaire dans une zone inflammatoire.^{7,8} En plus de la régulation immunitaire, l'endothélium joue un rôle important dans la croissance vasculaire. L'endothélium permet la libération des vasoconstricteurs et des vasodilatateurs qui sont primordiaux pour la régulation du tonus vasculaire, contribuant ainsi à la bonne distribution du débit sanguin et au contrôle de la pression artérielle. Plusieurs vasodilatateurs tel que le monoxyde d'azote (NO) et la prostacycline (PGI₂), ou vasoconstricteurs, tels que l'angiotensine II, l'endothéline (ET), les prostaglandines, le facteur d'activation plaquettaire (PAF) et les espèces réactives d'oxygène (ROS) sont produits par l'endothélium. Ces substances sont libérées sous l'influence des stimulations physiques et chimiques provenant de la circulation ou des tissus environnants.⁹ L'équilibre entre ces deux groupes de facteurs est vital pour le maintien

de l'homéostasie circulatoire. Une perturbation de ce dernier peut entraîner un dysfonctionnement endothélial ce qui cause une altération de la fonction vasculaire et contribue à certaines maladies cardiovasculaires, endocriniennes et métaboliques.¹⁰

1.1.2 Les types d'endothélium

Les CE sont plates et polarisées avec la face apicale en contact avec la lumière du vaisseau (le sang) et la face basale est fixée par des desmosomes et des hémidesmosomes. Elles ont une forme prismatique en générale comme la plupart des cellules épithéliales et peuvent acquérir des propriétés spécifiques selon le territoire anatomique. La morphologie de la cellule endothéliale diffère selon la taille des vaisseaux sanguins. On distingue trois types d'endothélium:

- L'endothélium continu où les CE forment un revêtement uni et ininterrompu. Elles sont parfois enveloppées de péricytes dont le cytoplasme possède des protéines permettant la contractilité du vaisseau. Ce type de CE est trouvé surtout dans les capillaires des muscles, les tissus conjonctifs et les poumons.
- L'endothélium fenestré où les CE forment une couche interrompue par endroit de minuscules pores de 70 nm de diamètre environ, ce qui rend ce type d'endothélium très perméable aux liquides. Ces pores servent aux transferts de liquide dans les organes impliqués dans la filtration ou des échanges de molécules. C'est le type d'endothélium qu'on retrouve dans les villosités de l'intestin grêle, les glomérules rénaux, les glandes endocrines et les procès ciliaires des yeux.
- L'endothélium sinusoïde qui tapisse les capillaires de plus gros diamètre (trois fois plus grand que le fenestré). Il forme une couche inégale et non linéaire avec des

espaces importants entre les CE qui peuvent atteindre 3 μm . Ce type d'endothélium est trouvé dans le foie, la rate, la moelle osseuse et certaines glandes comme l'adénohypophyse, les glandes parathyroïdes et endocrines. Sa forme et sa structure lui permettent de favoriser les transferts de macromolécules organiques du sang vers l'espace interstitiel des tissus (et inversement).

En plus d'être le site d'échange entre le sang et les tissus environnants, l'endothélium est également le site d'initiation de l'angiogenèse qui implique l'extension et le remodelage des vaisseaux sanguins cruciaux pour la croissance et la fonction des tissus.

1.1.3 Les jonctions cellulaires

Les CE sont reliées par des jonctions d'adhérence (JA), les jonctions serrées (JS) et les jonctions de type gap (JG) (Figure 1). Ces jonctions forment des structures adhésives qui maintiennent l'intégrité tissulaire, mais elles doivent être aussi très dynamiques afin de permettre la transmigration des leucocytes lors de la réponse inflammatoire et le remodelage cellulaire durant l'angiogenèse. Les structures jonctionnelles situées aux contacts intercellulaires endothéliaux sont comparables à celles trouvées dans les cellules épithéliales. En revanche, l'organisation des jonctions endothéliales est plus variable et leur topologie est moins restreinte entre les différents types de jonctions (JA, JS et JG) qui sont souvent entremêlées. Les structures jonctionnelles sont denses aux électrons, du fait que les contacts intercellulaires sont bordés par des membranes plasmiques parallèles des cellules avoisinantes (10-20 nm). Par opposition aux cellules épithéliales, les JG sont souvent observées à proximité de la surface luminale. Par

conséquent, le terme «jonction apicale» utilisé pour désigner collectivement JS et JA dans les cellules épithéliales ne peut pas être appliqué à l'endothélium. Les CE présentent un défi particulier pour la régulation de l'adhérence cellule-cellule. La zone de contact intercellulaire endothéliale contient plusieurs protéines transmembranaires à activité adhésive qui sont soit incluses dans des structures jonctionnelles spécifiques, soit localisées le long de la zone de contact. Ces protéines sont essentielles pour l'adhérence intercellulaire et le contrôle de la perméabilité vasculaire aux fluides, aux molécules et à la transmigration des leucocytes.

L'intégrité des jonctions d'adhérence cellulaire doit être maintenue pour l'établissement d'une barrière appropriée pourtant, les jonctions d'adhérence cellulaires doivent préserver une certaine plasticité nécessaire à la croissance et le développement des vaisseaux sanguins. Il faut souligner que les jonctions inter-endothéliales sont des structures dynamiques, soumises à différents mécanismes de régulation. L'extravasation des leucocytes au niveau des sites inflammatoires (surtout dans les veinules post-capillaires) par voie paracellulaire est un exemple de la plasticité de ces structures. Les leucocytes se faufilent à travers la jonction intercellulaire par diapédèse qui est rapidement suivie par une reformation de la jonction cellulaire. En outre, la plasticité des jonctions cellulaires endothéliales est aussi importante durant le remodelage ou durant l'angiogenèse vasculaire en réponse à des facteurs de croissance comme l'Angiopoïétine-1 (Ang-1) et le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF). Récemment, il a été montré que certains constituants des jonctions pouvaient également être impliqués dans l'activité protrusive des cellules permettant

l'invasion cellulaire. Ces propriétés peuvent donc être considérées comme étant des cibles intéressantes pour établir le développement de thérapie antiangiogénique.

1.1.3.1 Les jonctions serrées (JS)

Dans les CE, les JS et les JA se trouvent entremêlées aux niveaux des contacts intercellulaires, tandis que dans les cellules épithéliales les JS ont une localisation plus apicale que les JA. Les protéines transmembranaires qui composent la jonction serrée comprennent les claudines, les occludines et les molécules d'adhésion jonctionnelle (JAM). Ces protéines membranaires s'associent à des protéines cytoplasmiques telles que: la zonula occludens (ZO), l'afadin et Par3.

Les JS des cellules épithéliales sont bien développées et spatialement distinctes comparativement à celles des CE qui sont moins bien structurées et s'intercalent avec les JA. Les protéines jonctionnelles transmembranaires contiennent des domaines extracellulaires pour l'adhésion via des interactions homophiliques avec les cellules adjacentes, formant ainsi une barrière physique. L'occludine est une protéine transmembranaire qui a été identifiée aux JS endothéliales et épithéliales. Elle joue un rôle central dans la régulation de la perméabilité paracellulaire des vaisseaux sanguins.¹¹ Les protéines transmembranaires de la famille des claudines sont également des composantes majeures des JS. Il existe 20 protéines qui composent la famille des claudines et qui sont réparties dans plusieurs types cellulaires. La claudine-5 semble être exprimée spécifiquement dans les CE.¹² La molécule d'adhésion jonctionnelle (JAM) joue un rôle important dans la perméabilité endothéliale, car elle peut participer directement à la fonction de barrière. Elle peut également agir en tant que récepteur qui

interagit avec les intégrines leucocytaires afin de réguler et de diriger la transmigration des leucocytes. Par ailleurs, l'hétérogénéité des jonctions des CE se traduit par l'expression de différentes isoformes spécifiques de JAM.¹³ En plus de ces protéines transmembranaires, il y a aussi des protéines qui forment un complexe sur la face cytoplasmique de la JS, y compris la ZO-1 et la ZO-2. Ces protéines d'échafaudage lient les domaines cytoplasmiques des protéines transmembranaires au cytosquelette d'actine.¹⁴ Les JS sont essentielles surtout dans le maintien de la barrière hémato-encéphalique.

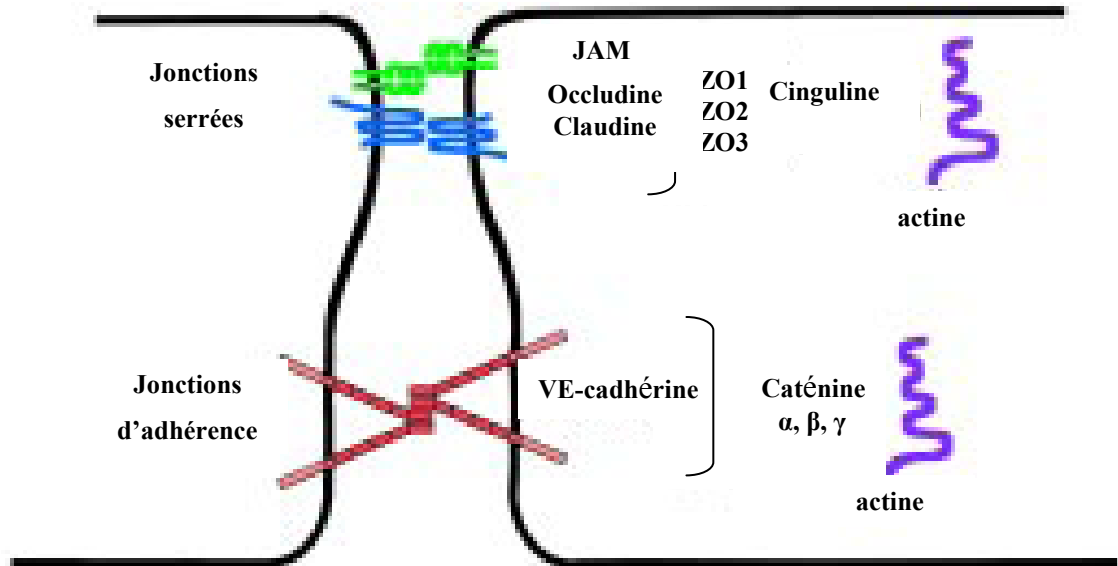


Figure 1: Schéma illustrant les composants moléculaires des jonctions serrées et d'adhérence cellulaire.¹⁵

1.1.3.2 Les jonctions de type Gap ou communicantes

Les jonctions de type Gap sont des jonctions cellulaires spécialisées qui forment des canaux membranaires hydrophiles qui permettent la diffusion passive des ions et des petites molécules entre les cellules.¹⁶ Elles sont formées par des semi-canaux, appelés connexons, appartenant aux deux cellules adjacentes. Chaque connexon est constitué de six sous-unités protéiques appelées connexines qui traversent 4 fois la membrane cellulaire. Il existe plusieurs sous types de connexines. L'extrémité C-terminale de ces protéines possède de nombreux domaines de phosphorylation qui provoquent un changement de conformation qui peut amener soit à la fermeture du canal ou bien à son ouverture. Des études génétiques ont montré que les jonctions communicantes sont

impliquées dans une grande variété de fonctions, telles que l'homéostasie, la régénération et le développement cellulaire.¹⁷⁻²⁰

1.1.3.3 Les jonctions d'adhérence (JA) et la régulation de la perméabilité endothéliale

Les CE contiennent des JA qui permettent l'adhésion entre les cellules adjacentes principalement via un complexe protéique composé de la VE-cadhérine (cadhérine-5, CD144). Cette cadhérine classique de type II est spécifique aux CE et lie via son domaine cytoplasmique les protéines de la famille du répétitif armadillo, notamment la p120-caténine, la β -caténine, et la plakoglobine. Les caténines β et p120 peuvent être aussi dirigées vers le noyau pour réguler l'expression génique. L' α -caténine lie indirectement la VE-cadhérine en se liant à la β -caténine et à la plakoglobine. En plus de ces composantes de base de la JA, plusieurs autres protéines se greffent au complexe et régulent son activité en fonction du type et du stimulus cellulaires. Les CE expriment également des niveaux élevés de la cadhérine neuronale (N-cadhérine), mais celle-ci n'est pas localisée au niveau du contact entre les CE. L'importance de la VE-cadhérine dans le maintien de la barrière endothéliale est soulignée par l'observation que l'injection d'un anticorps bloquant de la VE-cadhérine induit l'infiltration de neutrophiles dans un modèle de péritonite *in vivo*²¹ ainsi qu'une hyperperméabilité vasculaire dans l'interstitium pulmonaire.²² Depuis leur découverte, les caténines α et β ont été considérées comme étant essentielles aux liens entre le domaine cytoplasmique des cadhérines et le cytosquelette d'actine. Cependant, le dogme selon lequel il s'agit d'une interaction quaternaire stable a été contesté par des expériences montrant que l' α -

caténine ne peut pas interagir à la fois avec le complexe cadhérine β -caténine et avec la F-actine.²³ Ceci indique que la liaison à l'actine peut nécessiter d'autres molécules.²⁴ Enfin, la p120 caténine est importante lors de l'entretien de la barrière endothéliale en agissant non pas comme un lien avec le cytosquelette d'actine mais en régulant la stabilité du complexe des cadhérines et en maintenant l'expression de la VE-cadhérine à la surface cellulaire.²⁵ Différents domaines d'adhésion cellulaire sont formés entre les cellules adjacentes et entre les cellules avec leur matrice extracellulaire (MEC), appelés jonctions adhérentes (JA) et contacts focaux respectivement. Ces structures contiennent des complexes multimoléculaires constituant des plateformes de recrutement des protéines intracellulaires qui activent différentes voies de signalisation cellulaire. Dans les CE de souris, ainsi que d'autres modèles *in vivo*, la suppression des molécules d'adhésion intercellulaires cause des défauts vasculaires qui entraînent la mort entre les jours embryonnaires 11.5 et 13.5 (E11.5-E13.5). Pour permettre son bon fonctionnement, la cellule endothéliale doit assurer la régulation et l'intégrité des jonctions entre les cellules.

Les JA sont étroitement régulées par des facteurs de croissances. La stimulation par le VEGF va activer la tyrosine kinase Src qui va phosphoryler la VE-cadhérine sur la tyrosine Y685 et cause sa dissociation de la β -caténine.²⁶ Il en résulte alors une désorganisation du contact cellule-cellule et une perméabilité accrue. La stimulation par le TNF- α conduit également à la phosphorylation des tyrosines Y658 et Y731 de la VE-cadhérine. Cet événement est médié par une cascade de signalisation initiée par PI3K qui implique l'activation de la Pyk2 (proline-rich tyrosine kinase2) et du couple Rac1/Tiam. La phosphorylation par le VEGF des protéines du complexe des jonctions

d'adhérence endothéliale est une voie majeure de la régulation de l'intégrité structurale et du contact cellule-cellule. De plus, les jonctions d'adhérence participent à de multiples fonctions, y compris l'établissement et le maintien de l'adhésion entre les cellules, la perméabilité cellulaire, le remodelage du cytosquelette d'actine, la signalisation intracellulaire et la régulation transcriptionnelle. Par ailleurs, plusieurs études récentes commencent à décrire le rôle des complexes jonctionnelles et spécialement les JA dans la polarité cellulaire.²⁷

Les JA ne sont plus considérées comme une barrière fixe mais plutôt comme des structures très mobiles. Les protéines de JA sont des molécules importantes de la signalisation jouant des rôles divers selon la fonction physiologique de la cellule.

La perméabilité endothéliale dépend en grandes parties des jonctions cellulaires qui permettent de sceller les CE entre elles et d'assurer ainsi leur étanchéité afin de régler l'échange entre le sang et les tissus. Il a été suggéré, que le VEGF peut stimuler la formation d'une variété de voies à travers la barrière endothéliale, parmi lesquelles on retrouve les lacunes transcellulaires, les organelles vésiculo-vacuolaires (VVO) et les fenestrations (Figure 2). Toutefois, ces voies de perméabilité peuvent faire partie d'un même processus. La perturbation de l'adhésion intercellulaire par la dissolution des jonctions entre les CE est l'un de ces mécanismes qui a été très bien étudié.

Lumière Vasculaire

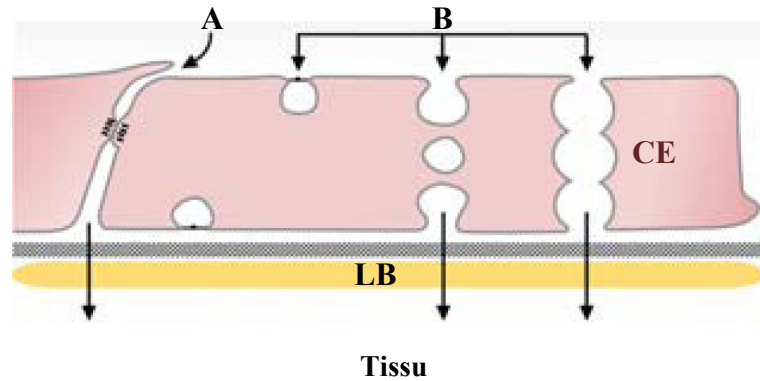


Figure 2: Mécanismes de perméabilité vasculaire. Schéma illustrant différentes voies par lesquelles les molécules peuvent traverser la barrière endothéliale. (A) voie paracellulaire, le transit se fait à travers les jonctions intercellulaires (B) voie transcellulaires, le transit se fait à travers le corps de la cellule endothéliale par le biais des cavéoles ou des vacuoles qui peuvent former une chaîne de vésicules (VVO) connectant la lumière vasculaire au reste du tissu. (LB) lame basale, (CE) cellules endothéliales. Figure adaptée de.^{28,29}

Au niveau de l'endothélium vasculaire, la perméabilité physiologique est essentielle pour l'échange de solutés et de fluides entre le sang et les différents tissus. En effet, Cette perméabilité augmente dans le cas d'inflammation et du cancer où on assiste à une hyperperméabilisation de la paroi vasculaire qui est induite, entre autres, par le VEGF.^{30,31} Plusieurs mécanismes moléculaires sont responsables de l'augmentation de la perméabilité ou le transport transcellulaire (trancytose).

L'exemple de la phosphorylation de la Cavéoline-1, composante essentielle des cavéoles, par Src induit l'hyperperméabilité vasculaire suite à l'adhésion des neutrophiles activés à la surface de l'endothélium vasculaire.³² Des preuves récentes montrent aussi l'implication de la Cavéoline-1 dans la régulation de la perméabilité paracellulaire. En effet la diminution des niveaux de la Cavéoline-1 cause un défaut de distribution des JS (occludine et ZO-1) et une augmentation des fenestrations inter-endothéliales.³³

La perméabilité est une fonction vasculaire étroitement liée à l'angiogenèse développementale et adulte. Une série d'événements de restructuration morphologique bien coordonnée est nécessaire à la formation d'un réseau vasculaire hiérarchique complexe.

1.2 Vasculogenèse et Angiogenèse

Ce sont deux principaux processus de la formation des vaisseaux sanguins (Figure 3). Chez l'embryon, la structure vasculaire est formée par deux processus consécutifs; d'abord la vasculogenèse qui permet la formation d'un plexus vasculaire primitif, et ensuite l'angiogenèse par laquelle de nouveaux vaisseaux poussent à partir des vaisseaux sanguins préexistants en assurant le remodelage et la maturation de la structure vasculaire initiale.^{34,35}

La vasculogenèse est le processus par lequel des vaisseaux sanguins, constitués essentiellement de CE, sont formés par différenciation des précurseurs mésenchymateux. Les CE comme les cellules hématopoïétiques dérivent d'un

précurseur commun, l'hémangioblaste. Les hémangioblastes s'agglutinent et les cellules situées à l'intérieur de l'amas deviennent les cellules hématopoïétiques qui se différencieront ensuite en globules rouges, globules blancs et mégacaryocytes. Les cellules en périphérie se différencieront en angioblastes, précurseurs des CE. La vasculogénèse contribue, pour une grande part, à la mise en place de l'appareil cardiovasculaire et à la formation des réseaux vasculaires propres à chaque organe. En effet, lors de l'embryogénèse, le processus de néovascularisation dépend de l'organe d'origine. La vasculogénèse se trouve prépondérante dans les ébauches d'organes constitués du mésoderme et de l'endoderme tel que le poumon, le pancréas et la rate. En revanche, dans les organes composés de mésoderme et d'ectoderme tel que le cerveau et les reins, la vascularisation s'établit par angiogénèse.³⁶

L'angiogénèse est la combinaison de deux mots grecs, soit angeion, qui veut dire vaisseau, et genesis, qui signifie naissance. C'est un phénomène biologique fondamental, étroitement régulé, responsable de l'expansion du plexus vasculaire primitif et de la construction progressive du réseau vasculaire adulte.³⁷ L'angiogénèse est donc essentielle pour différents processus physiologiques tels que le développement embryonnaire, la reproduction, la cicatrisation et la régénération des tissus. Un déséquilibre dans la régulation de l'angiogénèse conduit à des situations pathologiques. La formation de nouveaux vaisseaux sanguins excessive est associée aux maladies inflammatoires et à la croissance tumorale. Une angiogénèse insuffisante est rencontrée dans les maladies vasculaires ischémiques.³⁸⁻⁴¹ Les mécanismes moléculaires de base qui régulent la formation de la lumière vasculaire sont très comparables à l'état physiologique et pathologique. L'angiogénèse peut se dérouler selon trois mécanismes:

par bourgeonnement ("sprouting"), par élargissement et séparation des vaisseaux déjà formés ("intussusception") ou encore par septation où les cellules poussent à l'intérieur des vaisseaux pour créer des canaux vasculaires séparés.^{42,43}

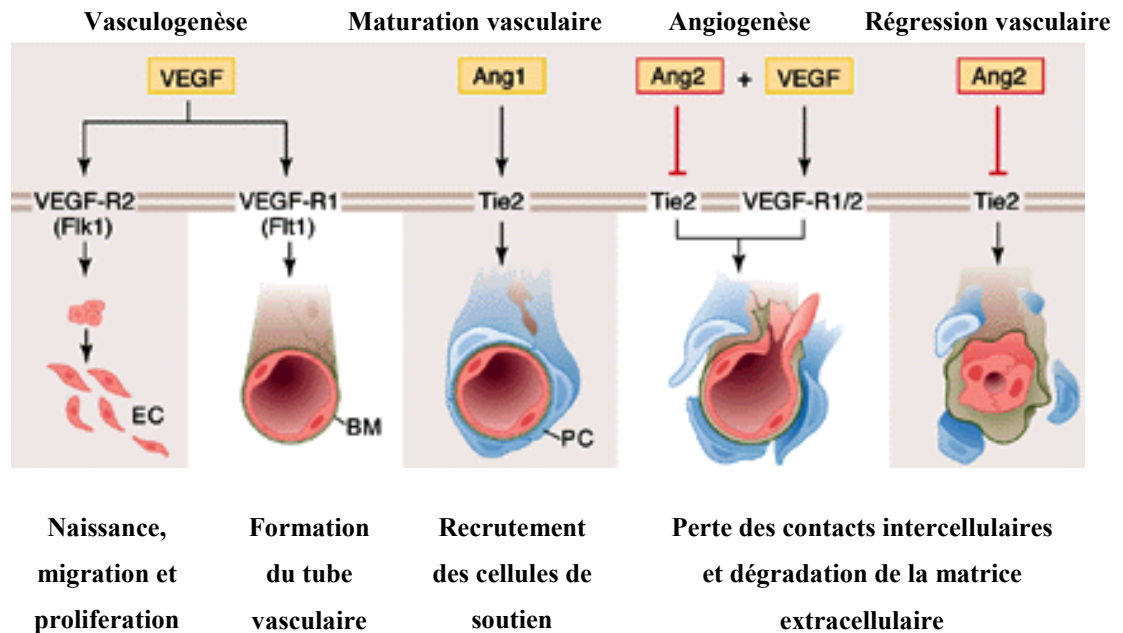


Figure 3: Vasculogenèse et Angiogenèse. EC: Cellules endothéliales, BM: membrane basale, PC: cellules péri-endothéliales

1.2.1 Régulation de l'angiogenèse

L'angiogenèse est un processus complexe qui implique à la fois des composantes cellulaires et extracellulaires. L'activation des CE constitue une étape clé dans ce processus. Plusieurs voies de signalisation mènent à cette activation et engagent un contrôle étroit des régulateurs positifs (proangiogéniques) et négatifs (antiangiogéniques).^{40,44} Une cascade d'événements s'enchaîne, incluant la

prolifération, la perméabilité, la migration, le remodelage, la stabilisation et la normalisation vasculaire afin d'assurer la régulation du réseau vasculaire néoformé.^{45,46}

Le mécanisme d'angiogenèse le plus étudié est celui de l'angiogenèse bourgeonnante qui est caractérisé par différentes étapes (Figure 4). L'initiation de l'angiogenèse, suite à un stimulus angiogène local tel que l'hypoxie, débute par une vasodilatation et une augmentation de la perméabilité des vaisseaux via la dissolution des jonctions d'adhésion intercellulaire. Ensuite, la dégradation de la membrane basale et de la matrice extracellulaire permet la migration et la prolifération des CE qui s'assemblent en tubes, formant ainsi des vaisseaux primitifs. Lors de la maturation, certains de ces vaisseaux deviennent des capillaires après la différenciation des cellules mésenchymateuses, les péricytes. D'autres se transforment en vaisseaux de plus grands calibres (artères et veines) après la mise en place d'une paroi constituée de plusieurs couches de cellules musculaires lisses.⁴⁷

L'angiogenèse physiologique survient pendant la croissance et la réparation des tissus chez l'adulte, ainsi que pendant le développement. L'angiogenèse pathologique est observée dans une grande variété de maladies, tel que les maladies cardiaques, le cancer, les maladies vasculaires et le diabète.

Différents stimuli présents dans un environnement tumoral entraînent la production des molécules angiogéniques afin de contrôler la formation des nouveaux vaisseaux par différents mécanismes. Certains de ces facteurs angiogéniques agissent principalement par une action directe sur les CE, comme le VEGF et le FGF, afin d'initier et d'induire la croissance vasculaire. D'autres facteurs tel que le TGF- β , le PDGF et l'Ang-1 peuvent attirer les cellules du tissu conjonctif comme les pericytes et les cellules du

muscle lisse pour contrôler la stabilisation et la maturation du réseau vasculaire néoformé. D'autres intervenants cellulaires comme les monocytes, les cellules T, les neutrophiles et les plaquettes jouent également un rôle important dans l'induction et la régulation de l'angiogenèse. Différentes cellules souches/progénitrices sont également recrutées au niveau des sites ischémiques et jouent un rôle crucial dans le processus de l'angiogenèse. En effet, des études précliniques ont montré que les cellules souches peuvent induire une néo-vascularisation dans les tissus ischémiques chez différents modèles d'animaux.⁴⁸ Les tumeurs solides ont besoin aussi de déclencher l'angiogenèse pour se développer et croître. En réponse à différents signaux cellulaires, la tumeur passe ainsi de la phase prévasculaire à la phase vasculaire, phénomène appelé «switch angiogénique».⁴⁹ Grâce à sa vascularisation la tumeur peut se nourrir, s'oxygéner et se mobiliser afin de se rendre aux organes éloignés et initier des métastases. Le développement de la vascularisation par l'angiogenèse se produit progressivement, d'abord, un réseau dense, immature, intercalé de nouveaux vaisseaux qui se développent par la germination récursive des bourgeons «sprouts» et leur fusion. Ensuite, le réseau est remodelé en un réseau plus hiérarchisé avec une circulation sanguine. Plusieurs mécanismes moléculaires ont été identifiés dans la régulation de ces branchement ou ramifications vasculaires incluant les cellules se trouvant à la pointe du bourgeon «Tip cell» et les cellules de la tige «Stalk cell». Le développement du système vasculaire embryonnaire requiert un contrôle strict durant la naissance et la croissance des CE qui sont impliquées dans la migration et la ramification de la vascularisation précoce. La fonction de la cellule endothéliale se trouvant à la pointe du bourgeon est d'explorer l'environnement grâce à une expression moléculaire bien

spécifique (VEGFR-2, Wnt et Notch),⁵⁰ tandis que les cellules de la tige prolifèrent et forment la lumière vasculaire⁵¹

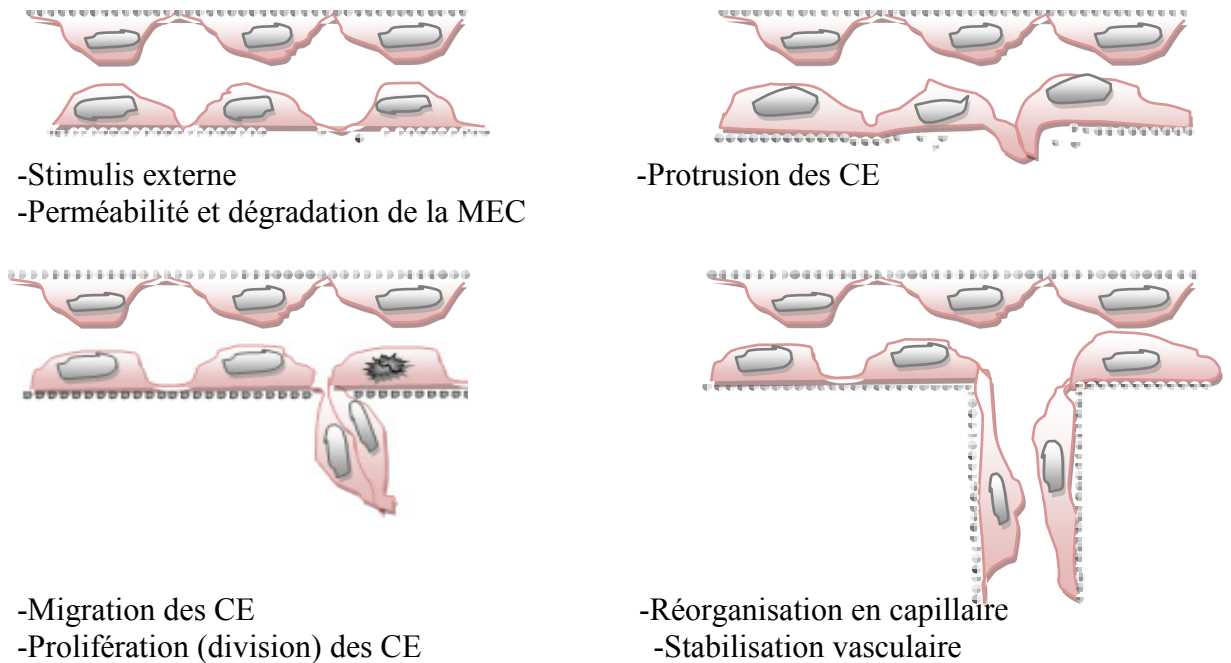


Figure 4: Les différentes étapes du processus angiogénique

1.2.2 Les facteurs angiogéniques

Les molécules angiogéniques, qui agissent par interaction avec des récepteurs à la surface des CE, sont essentiellement des facteurs de croissance, tels que le VEGF, le facteur de croissance des fibroblastes (FGF), le facteur de croissance transformant bêta (TGF- β), le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF) et le facteur de croissance analogue à l'insuline (IGF). Elles interviennent dans différentes étapes du processus angiogénique.

Les facteurs pro-angiogéniques (Tableau I) jouent un rôle essentiel dans la migration et la prolifération des CE. Ils sont, pour la plupart, sécrétés par les cellules tumorales mais peuvent aussi l'être par des cellules du stroma tissulaire normal comme les macrophages ou les fibroblastes.^{52,53} La MEC est également un réservoir considérable pour les facteurs régulateurs de l'angiogenèse.

Les facteurs anti-angiogéniques quand à eux agissent sur les CE en inhibant leur migration, leur prolifération et leur capacité à former des capillaires fonctionnels. Certains de ces inhibiteurs endogènes sont des fragments issus de la protéolyse de grosses protéines, comme l'angiostatine (fragment du plasminogène),^{54,55} l'endostatine (issue du collagène XVIII), Les PAIs (plasminogen activator inhibitors) et les TIMP (tissue inhibitors of metalloproteinases).⁵⁶ Parmi les facteurs angiogéniques, on retrouve aussi les récepteurs tyrosine kinases (RTK) qui jouent un rôle important dans le maintien de la structure et la fonction vasculaire.

Facteurs Pro-angiogeniques	Fonctions	Facteurs Antiangiogeniques	Fonctions
<p>VEGF et PIGF (placenta)</p> <p>VEGF-C</p> <p>VEGFR-1</p> <p>VEGFR-2</p> <p>VEGFR-3</p> <p>EGF et FGF</p> <p>Angiopoïetine-1 et Récepteurs Tie2</p> <p>NO synthase</p> <p>PDGF-BB (<i>Platelet Derived Growth Factor</i>) et récepteurs</p> <p>TGF-β et récepteurs</p> <p>Intégrines</p> <p>VE-cadherine</p> <p>Activateur du plasminogène (tPA)</p> <p>Métalloprotéinases matricielles (MMPs)</p>	<p>Active les VEGFR, augmente la perméabilité des vaisseaux.</p> <p>Stimule la lymphangiogenèse.</p> <p>Stimule l'organisation des néo-CE.</p> <p>Stimule la prolifération des CE vasculaires.</p> <p>Stimule la prolifération des CE lymphatiques.</p> <p>Stimule la prolifération cellulaire.</p> <p>Stabilise les néo-vaisseaux par mobilisation des muscles lisses.</p> <p>Régule la perméabilité et migration cellulaire</p> <p>Recrute les cellules musculaires lisses.</p> <p>Stabilisation par production de la matrice extracellulaire autour des néo-vaisseaux.</p> <p>Récepteurs pour macromolécules matricielles et MMPs.</p> <p>Molécules de jonction entre les CE.</p> <p>Favorise la migration cellulaire et le remodelage matriciel.</p> <p>Remodelage matriciel.</p>	<p>VEGFR-1 NP-1 Angiopoïetine-2</p> <p>Thrombospondine -1</p> <p>Thrombospondine -2</p> <p>Angiostatine</p> <p>Endostatine</p> <p>TGF-β et récepteurs Calreticuline</p> <p><i>Platelet factor-4</i></p> <p>TIMPs</p> <p>Interférons</p> <p>Certaines Interleukines</p> <p>Prothrombine</p>	<p>Capture des VEGF.</p> <p>Capture des VEGF.</p> <p>Antagoniste de Ang-1 (induit la régression des vaisseaux).</p> <p><i>Type 1 repeats</i> (TSR-1) : inhibe la migration cellulaire, la multiplication, l'adhésion et la survie.</p> <p>Provoque l'apoptose.</p> <p>Inhibe la migration cellulaire.</p> <p>Inhibe la survie et la migration cellulaire.</p> <p>Action anti-oncogénique.</p> <p>Inhibe la croissance de l'endothélium.</p> <p>Inhibe la reconnaissance de VEGF et FGF.</p> <p>Inhibent les métalloprotéinases matricielles.</p> <p>Inhibent la migration cellulaire.</p> <p>Inhibent la migration cellulaire.</p> <p>Inhibe la croissance de l'endothélium.</p>

Tableau I: Exemples de facteurs pro- et anti- angiogéniques.

1.3 Les récepteurs tyrosines kinase (RTK)

Les récepteurs de type tyrosine kinase, désignés habituellement par RTK sont des protéines transmembranaires possédant une région extracellulaire impliquée dans la reconnaissance et la fixation du ligand et un domaine intracytoplasmique à activité tyrosine kinase (TK). Ces deux domaines sont reliés entre eux par une région transmembranaire (une séquence hydrophobe) permettant au récepteur d'être ancré dans la membrane (Figure 5). Ils sont formés de deux sous-unités (ou plus) qui lors de la stimulation par un ligand spécifique provoque la dimérisation (ou multimérisation) du récepteur qui s'autophosphoryle sur des tyrosines spécifiques de son domaine intracellulaire. Ces phosphorylations enclenchent des réactions enzymatiques qui seront à l'origine de divers effets biologiques observés et mettent en jeu un ensemble de voies de signalisation complexes. Une fois que le récepteur est phosphorylé, la cellule va l'internaliser par endocytose, le dégrader ensuite dans un lysosome ou le recycler à la surface de la cellule.

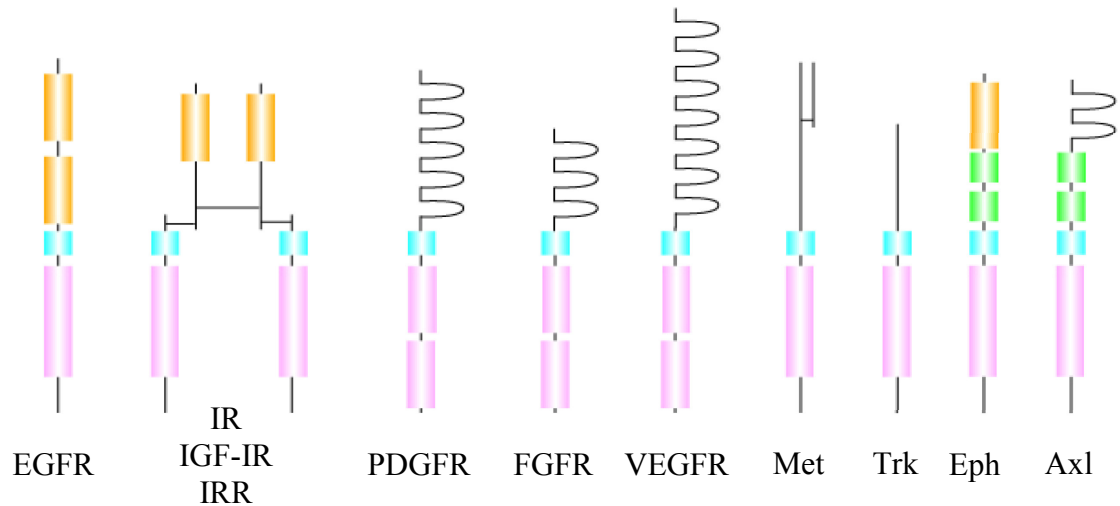


Figure 5: Principaux RTK impliqués dans la vasculogénèse et l'angiogénèse. Les structures des récepteurs sont représentées schématiquement et leurs grands domaines protéiques sont indiqués : || Domaine riche en cystéine, || Domaine transmembranaire, || Domaine TK || Région immunoglobuline, ⌋ Région fibronectine de type III.

1.3.1 RTK et angiogénèse

L'activation des CE ainsi que la stimulation de leur migration et de leur prolifération au cours de l'angiogénèse se font via des facteurs de croissance qui se lient à des récepteurs membranaires. Ces récepteurs sont capables d'initier directement des cascades de réactions et d'interactions moléculaires impliquées dans la transmission du signal. Les RTK qui sont directement impliqués dans l'angiogénèse incluent entre autres les récepteurs pour le VEGF, le FGF, le PDGF, l'Ang-1, l'Ang-2, le HGF (facteur de croissance des hépatocytes) et les Eph (éphrines). La compréhension de la biologie de ces facteurs de croissance et de leurs récepteurs sur les CE ainsi que leur

implication dans l'angiogenèse, en fonction du microenvironnement ou des différentes conditions physiologiques, favorisent le développement de meilleures thérapies ciblées possibles. L'inhibition de l'activité de ces récepteurs est devenue un objectif dans le développement de médicaments anticancéreux. Les agents antiangiogéniques utilisés actuellement comprennent des inhibiteurs de la voie de signalisation du VEGF, y compris les anticorps monoclonaux, des inhibiteurs de tyrosine kinase (TKI). L'utilisation des thérapies anti-RTK s'est avérée efficace. Par exemple, la thérapie anti-VEGF par l'Avastin (bévacizumab), chez les patients atteints d'œdème maculaire, due à une rétinopathie diabétique et les occlusions veineuses, a permis une nette amélioration de leur vision. Pourtant, cette stratégie pourrait être préjudiciable à l'intégrité vasculaire dans le cas de thérapie contre le cancer parce que l'inhibition de l'angiogenèse physiologique par l'inhibition du VEGF ou de la signalisation liée au VEGF risque de provoquer des troubles cardiaques, neurologiques et néphrologiques. Un des RTK les plus étudiés est le récepteur au VEGF (VEGFR) qui a fait l'objet de plusieurs travaux de recherche sur l'angiogenèse. Les récepteurs aux angiopoïétines, Tie, sont les deuxièmes RTK en importance dans le développement du système vasculaire. Ces deux familles de RTK régulent la croissance, la formation et la maturation du réseau vasculaire au stade embryonnaire et joue un rôle clé dans la régulation de l'homéostasie vasculaire chez l'adulte. La structure et la régulation spatio-temporelle de l'expression de ces récepteurs et de leurs ligands témoignent de leur importance dans la fonction du système vasculaire.⁵⁷

1.4 Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF)

Le VEGF joue un rôle majeur dans la formation des vaisseaux sanguins et de leurs ramifications. C'est en 1983 que le VEGF a été décrit pour la première fois par Senger et collaborateurs.⁵⁸ Ils ont partiellement purifié une molécule sécrétée par les lignées de cellules d'hépatocarcinome qui augmentait l'extravasation du bleu d'Evans dans la peau des cochons d'Inde lorsqu'ils sont injectés par voie intraveineuse. Cependant, la structure de la protéine et la séquence d'acides aminés de ce facteur n'ont été décrites qu'en 1990 par le même groupe. Ce peptide a été appelée facteur de perméabilité vasculaire (VPF) ou vasculotropine, car il augmente l'accumulation interstitielle du colorant injecté et stimule la production d'ascite.⁵⁹ Le même groupe avait montré que le VEGF stimule l'angiogenèse et qu'il était aussi un mitogène puissant et spécifique des CE.⁶⁰ Dans la même année, les séquences complètes d'ADN complémentaires codant pour le VEGF et le VPF ont confirmé qu'il s'agissait de la même molécule.^{61,62} Plus tard, un autre groupe a démontré que la même molécule stimulait la migration des CE.⁶³

1.4.1 La famille du VEGF

La famille du VEGF est composée de 7 protéines qui ont été identifiées chez différentes espèces. Cette famille comprend le VEGF-A, le VEGF-B, le VEGF-C, le VEGF-D, le VEGF-E, le VEGF-F et le facteur de croissance placentaire (PIGF) (Figure 6).^{64,65} Le VEGF-A est le plus répandu et le plus étudié et se lie aussi bien au

VEGFR-1 qu'au VEGFR-2. Le VEGF-B (ou VEGF-related factor, VRF) a été cloné et caractérisé en 1996.⁶⁶ Il est structurellement similaire au VEGF et au PlGF. Chez la souris, le VEGF-B existe en deux isoformes, générées par épissage alternatif, de 167 et 186 acides aminés (homodimères de 21 et 32 kDa, respectivement), qui peuvent se lier au VEGFR-1 mais pas au VEGFR-2 ni au VEGFR-3. Le VEGF-B est très abondant dans le cœur, le muscle squelettique et le pancréas.⁶⁷ Il a été associé à la formation de métastases dans les nodules lymphatiques du cancer colorectal, mais son rôle dans la progression tumorale n'a pas été complètement éclairci.⁶⁸ En 1996, Olofsson et Joukov ont publié les séquences d'acides aminés de deux autres protéines, le VEGF-C et le VEGF-D qui promeuvent la mitogenèse et la survie des CE lymphatiques et semblent être nécessaires pour une croissance endothéliale lymphatique.⁶⁸ Les VEGF-C et-D lient les récepteurs VEGFR-2 et -3 ainsi que la NRP-2.^{69,70} Les VEGF-E et -F sont deux homologues du VEGF qui ont été découverts dans le génome du parapoxvirus ORF (ORFV) et dans le venin de plusieurs types de serpents, respectivement.^{71,72} Le VEGF-E et la plupart des variantes des VEGF-F lient exclusivement le VEGFR-2.⁷³⁻⁷⁵ Le PlGF (45 kDa) a été purifié peu de temps après le VEGF avec lequel il a environ 50% d'homologie.⁷⁶ Il présente une haute affinité pour le VEGFR-1 tout comme pour le VEGF-B.^{77,78} L'activation de ce récepteur sur les péricytes ou les cellules musculaires lisses (CML) stimule le recouvrement et la stabilisation des capillaires.⁷⁹ La complexité de la signalisation par le VEGF est amplifiée par le fait que certains membres de la famille sont traités d'une façon post-traductionnelle et post-transcriptionnelle, donnant lieu à de nombreuses isoformes ayant des propriétés de liaison très distinctes.^{80,81}

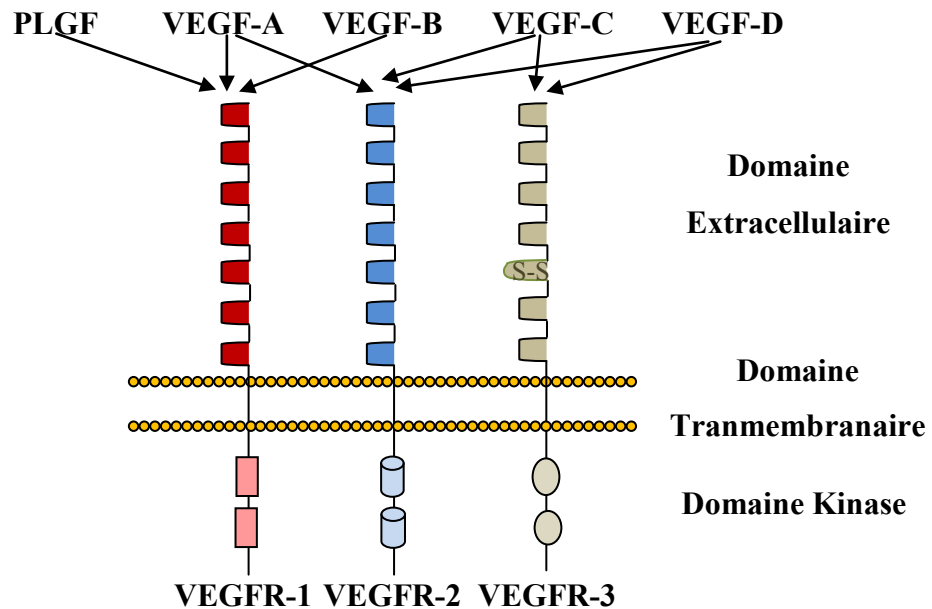


Figure 6: Structure des récepteurs au VEGF et leurs ligands.

1.4.2 Les isoformes du VEGF-A

Le gène du VEGF humain est localisé sur le chromosome 6 (6p21.3), il est organisé en huit exons qui sont séparés par sept introns.^{82,83} L'épissage alternatif de son ARNm aboutit à la formation de plusieurs isoformes, les plus communes étant constituées de 121, 145, 165, 189 et 206 acides aminés nommées respectivement VEGF121, VEGF145, VEGF165, VEGF189 et VEGF206 (Figure 7). Le gène du VEGF murin possède un acide aminé en moins que chez l'homme.⁸⁴ Les différentes isoformes ont des propriétés biologiques spécifiques qui dérivent de leur capacité de liaison à l'héparine et au protéoglycan.⁶⁸

Le VEGF121 est impliqué dans la migration des angioblastes pendant la formation de l'aorte dorsale chez le xénope.⁸⁵ Alors que le VEGF189 intervient dans la maintenance et la spécification vasculaire.⁸⁶ Le VEGF121 et le VEGF165 sont sécrétés dans l'environnement extracellulaire tandis que les VEGF145, VEGF189 et VEGF206 sont associés à la cellule ou à la matrice grâce à leur affinité pour l'héparine. L'isoforme prédominante est le VEGF165 qui est également le plus puissant stimulant de l'angiogenèse.^{83,87} Le VEGF165 appelé aussi VEGF-A ou VEGF a initialement été décrit comme étant le facteur de perméabilité⁸⁸ et de croissance spécifique des CE. Il a été impliqué dans de nombreux processus au cours du développement embryonnaire, l'angiogenèse, la vasculogenèse et l'hématopoïèse chez les vertébrés et non vertébrés. Il contrôle la formation des vaisseaux sanguins au cours du développement postnatal.⁸⁹⁻
⁹¹ Il est impliqué dans la prolifération, la migration et la survie des CE.⁹² La perte d'un seul allèle du VEGF entraîne une létalité embryonnaire précoce, chez la souris, entre E9,5 et E11.^{64,90,93} Alors qu'une surexpression du VEGF chez des souris transgéniques conduit à des anomalies sévères du développement cardiaque et à la mort entre E12,5 et E14.

La fixation du ligand provoque la signalisation transmembranaire et génère ainsi des réponses et des voies de signalisation cellulaire distinctes.⁹⁴ Le VEGF est un régulateur majeur du développement vasculaire embryonnaire^{93,95} et exerce ses fonctions en se liant à deux récepteurs tyrosine kinases, le récepteur au VEGF (VEGFR-1) et le VEGFR-2.⁹⁶ Il peut lier aussi des corécepteurs comme la neuropiline 1 (NP-1) et la neuropiline 2 (NP-2).^{97,98} Les différentes isoformes du VEGF se lient avec différentes affinités aux récepteurs tyrosine kinase VEGFR-1, VEGFR-2 et VEGFR-3.

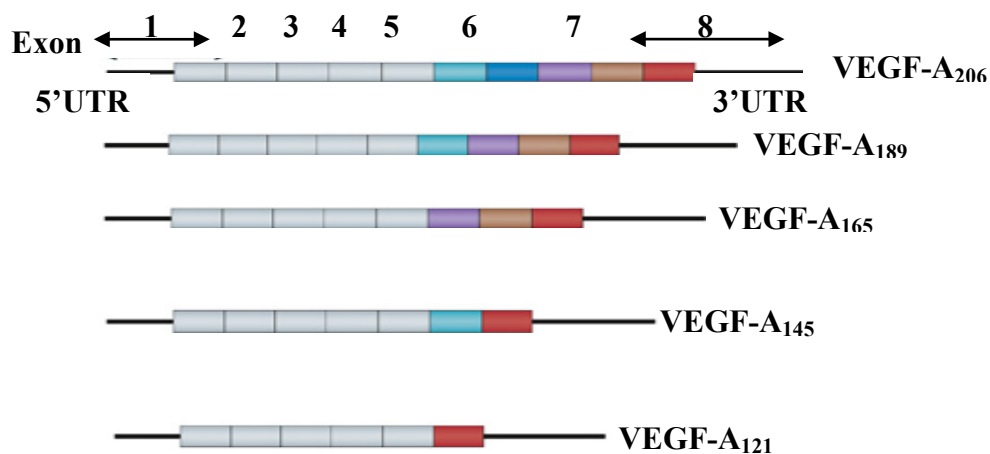


Figure 7: Différentes isoformes du VEGF suite à l'épissage alternatif.⁸⁰

1.4.3 Le VEGF et ses récepteurs

Il existe trois récepteurs de la famille du VEGF à activité TK: VEGFR-1 (fms-like tyrosine kinase-1, Flt-1),^{99,100} VEGFR-2 (fetal liver kinase-1, Flk-1) pour sa version murine ou KDR (kinase insert domain containing receptor) pour son homologue humain¹⁰¹ et VEGFR-3 (fms-like tyrosine kinase-4, Flt-4).¹⁰² Chez l'adulte, le VEGFR-1 et le VEGFR-2 sont exprimés essentiellement au niveau des CE vasculaires, tandis que le VEGFR-3 est localisé principalement au niveau de l'endothélium lymphatique. Chaque sous-type de la famille du VEGF (VEGF-A, -B, -C, -D, -E, -F et PlGF) peut se lier à l'un ou plusieurs de ces récepteurs ce qui résulte en diverses

fonctions biologiques (prolifération, survie, perméabilité, migration, lymphoangiogenèse et angiogenèse).

1.4.3.1 Le VEGFR-1

Le VEGFR-1 lie le VEGF-A avec une affinité supérieure à celle du VEGFR-2.¹⁰³ Pourtant son activité tyrosine kinase n'est que faiblement induite. Parmi les mécanismes identifiés pour expliquer la faible activité tyrosine kinase du VEGFR-1, il y a la présence d'une séquence répressive dans le domaine juxtamembranaire du récepteur.¹⁰⁴ Les propriétés structurelles de la boucle d'activation du VEGFR-1¹⁰⁵ ainsi que le manque de résidus tyrosine à régulation positive contribuent à la faible activité kinase du VEGFR-1¹⁰⁶. En revanche, le VEGFR-1 peut réguler la signalisation au niveau des CE via sa dimérisation avec le VEGFR-2.¹⁰⁷

1.4.3.2 Le VEGFR-3

Le VEGFR-3 est synthétisé sous la forme d'une protéine précurseur de 195 kDa. Le précurseur est clivé au niveau du cinquième domaine de type immunoglobuline (Ig), générant ainsi un peptide qui reste lié à la protéine mère par un pont disulfure¹⁰⁸ (Figure 5). Ce récepteur est activé suite à la liaison au VEGF-C et VEGF-D. Il joue un rôle essentiel dans les CE lymphatiques, mais son expression dans les CE est également induite lors de l'angiogenèse,¹⁰⁹ soit dans le système vasculaire tumoral ou dans les CE de la pointe du bourgeon angiogénique dans la rétine en développement.¹¹⁰ Il existe plusieurs études décrivant les hétérodimères du VEGFR-2 et du VEGFR-3.¹¹¹⁻
¹¹³ Il est intéressant de noter que les hétérodimères fonctionnent différemment des

homodimères. En effet, il a été indiqué que le VEGFR-3 a besoin d'être associé au VEGFR-2 afin d'induire certaines réponses cellulaires au VEGF-C et au VEGF-D. D'autre part, les homodimères du VEGFR-3 ont été impliqués dans l'organisation tridimensionnelle des CE et la formation de la lumière vasculaire.¹¹⁴

1.4.3.4 Le VEGFR-2

Le gène du VEGFR-2 (200-230 kDa) est situé sur le chromosome 4 chez l'homme et sur le chromosome 5 chez la souris. Il est indispensable au cours du développement embryonnaire, car des embryons de souris Flk-1 négatives meurent entre les jours E8.5 et E9.5, dû à l'absence des CE matures.¹⁰¹ Suite à la liaison du VEGF à son récepteur VEGFR-2 dans les CE, une gamme complète de réponses cellulaires est déclenchée telles que la survie, la prolifération, la migration et la formation du tube vasculaire. En plus du VEGF-A, le VEGFR-2 lie le VEGF-C et le VEGF-D.¹¹⁵ La fixation du ligand implique les domaines extracellulaires de type Ig 2 et 3 du VEGFR-2. Le VEGFR-2 possède une forte affinité pour le PlGF et le VEGF-E est le seul ligand connu pour se lier uniquement au VEGFR-2. En plus des CE vasculaires et lymphatiques, le VEGFR-2 est exprimé par les mégacaryocytes et les cellules souches hématopoïétiques.¹¹⁶ Le VEGFR-2 sous sa forme soluble (sVEGFR-2), résultat de l'épissage alternatif, est présent dans divers tissus comme la peau, le cœur, la rate, les reins, l'ovaire et dans le plasma humain et murin.¹¹⁷ Le sVEGFR-2 lie le VEGF-C et empêche ainsi sa fixation au VEGFR-3 ce qui inhibe la prolifération des CE lymphatiques.¹¹⁸ La dérégulation de sVEGFR-2 accompagne la progression du neuroblastome.^{119,120} Il peut également

contribuer à la maturation des vaisseaux en régulant la migration cellulaire et la couverture murale vasculaire.¹²¹

1.4.3.4.1 Signalisation intracellulaire du VEGF/VEGFR-2

Le VEGF se lie au domaine extracellulaire du VEGFR-2 qui va se dimériser et certains résidus tyrosine du domaine intracellulaire seront phosphorylés. Suite à cette liaison ligand-récepteur, divers signaux intracellulaires sont induits (Figure 8) et favorisent ainsi la prolifération, le chimiotactisme, la perméabilité, la migration et l'inflammation cellulaire.^{122,123} Toutes ces réponses physiologiques peuvent être médiées entre autre par la production du monoxyde d'azote (NO) par les CE. Pour induire la production de NO au niveau de la cellule endothéliale, le VEGF active la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) entraînant la phosphorylation d'AKT qui phosphoryle à son tour la synthèse endothéliale de NO (eNOS) augmentant ainsi l'activité enzymatique d'eNOS et la production de NO.¹²⁴

Le VEGF est aussi un mitogène très puissant qui induit la prolifération cellulaire via l'activation des MAP kinases (Mitogen activated protein kinases) ou ERK (extracellular-signal-regulated proteins kinases). La phosphorylation de la tyrosine Y-1175 du VEGFR-2 permet la liaison de la phospholipase C (PLC) γ via son domaine Src homology-2 (SH2). L'activation de PLC γ permet l'hydrolyse du phospholipide membranaire phosphatidylinositol (4,5)-biphosphate (PIP2) et la génération des messagers secondaires: diacylglycerol (DAG) et inositol (1,4,5)-triphosphate (IP3). Le DAG est un activateur physiologique des protéines kinases C (PKC) classiques et nouvelles, impliquées dans l'activation de ERK, via Raf et MEK 1/2. Cette voie joue

également un rôle essentiel dans l'activation de la phospholipase cytosolique A2 (cPLA2) ce qui conduit à la génération de la prostacycline (PGI2).¹²⁵

Le VEGF est un facteur assurant la survie dans les CE vasculaires. Des vaisseaux immatures requièrent des signaux de survie cellulaire en l'absence desquels une apoptose est induite. Le VEGF initie des signaux de survie cellulaire^{126,127} tels que l'activation de la phosphoinositol 3-kinase (PI3K) et de son médiateur, la kinase antiapoptotique AKT/protéine kinase B (PKB).¹²⁸⁻¹³⁰ En effet, l'activation du VEGFR-2 par le VEGF mène à l'activation de l'enzyme PI3K et la production du PIP3 qui fonctionne comme un signal de recrutement membranaire d'AKT et de PDK1 (phosphoinositol-dépendent kinase-1) et permet ainsi l'activation d'AKT. La forme activée d'AKT retournera au cytoplasme pour phosphoryler et inhiber l'activité des protéines pro-apoptotiques telles que Bad, Bax et caspase 9 et ainsi augmenter le niveau de certaines protéines anti-apoptotiques comme AKT1 et Bcl-2.^{90,131} Ces signaux de survie font également intervenir la VE (vascular endothelial)-cadhérine qui est présente au niveau des jonctions entre les CE.^{132,133} Le groupe de Carmeliet a démontré, dans les CE des souris déficientes en VE-cadhérine, que la transmission du signal de survie cellulaire induit par le VEGF-A via AKT et Bcl2 est abolie lorsque la VE-cadhérine est absente ou en présence d'une version tronquée de la VE-cadhérine.¹³² En effet le complexe formé avec le VEGFR-2, β -caténine et PI3K est nettement réduit en absence de la VE-cadhérine fonctionnelle ce qui induit l'apoptose endothéliale. Ceci prouve l'importance du complexe VE-cadhérine/ β -caténine dans le contrôle de la survie endothéliale. Afin d'éviter la mort cellulaire programmée causée par le manque d'adhésion,¹³⁴ la liaison des intégrines au VEGFR-2 permet aussi la survie cellulaire

via l'activation de la protéine kinase des contacts focaux, FAK. C'est une protéine connue pour son rôle dans le maintien des signaux de survie dans plusieurs types de cellules adhérentes dont les CE.¹³⁵ En effet, au sein de nouveaux foyers d'adhésion dans les CE, le VEGF induit une augmentation du recrutement et de la phosphorylation FAK qui permettra un ancrage de la cellule à la MEC et induira des signaux de survie cellulaire.¹³⁶

Il a été démontré dans plusieurs études que le VEGF augmente la perméabilité vasculaire dans les micro-vaisseaux suite à une activation de son récepteur VEGFR-2 sur les CE.^{28,29,59,61,137} En aval du VEGF/VEGFR-2, la PLC γ est activée entraînant la production d'un afflux de Ca²⁺ à travers la membrane plasmique grâce à des canaux cationiques. Par ailleurs, IP3 se lie à un récepteur spécifique présent sur le réticulum endoplasmique, ce qui induit la libération du calcium Ca²⁺ et va permettre la production de NO, inducteur de la perméabilité vasculaire.²⁹

Le VEGF est aussi un facteur pro-migratoire important. Suite à une activation du VEGFR-2 et la phosphorylation d'AKT sur la Ser473, eNOS est phosphorylé sur la Ser1177 (humain et murin). Cette phosphorylation activatrice d'eNOS va mener à la production de NO et une augmentation de la perméabilité mais aussi de la migration cellulaire.¹³⁸ Il a été montré que la signalisation par VEGF/VEGFR-2 induisait également l'activation de plusieurs intégrines ce qui augmente l'adhésion et la migration cellulaire.^{139,140}

Le VEGFR-2 est aussi le récepteur majeur à travers lequel le VEGF régule l'angiogenèse et la vasculogenèse. Ce récepteur est essentiel à la fois pour l'homéostasie et le développement vasculaire sanguin et lymphatique.¹⁰¹

D'autres récepteurs de la famille du VEGF, dépourvus d'activité TK, ont récemment été identifiés. Il s'agit des Neuropilines (NRP), qui sont considérées comme des co-récepteurs des isoformes du VEGF.⁹⁸ La VE-Cadhérine, les intégrines et les héparanes sulfate peuvent aussi jouer le rôle de corécepteurs pour le VEGFR-2 pour moduler son activité.

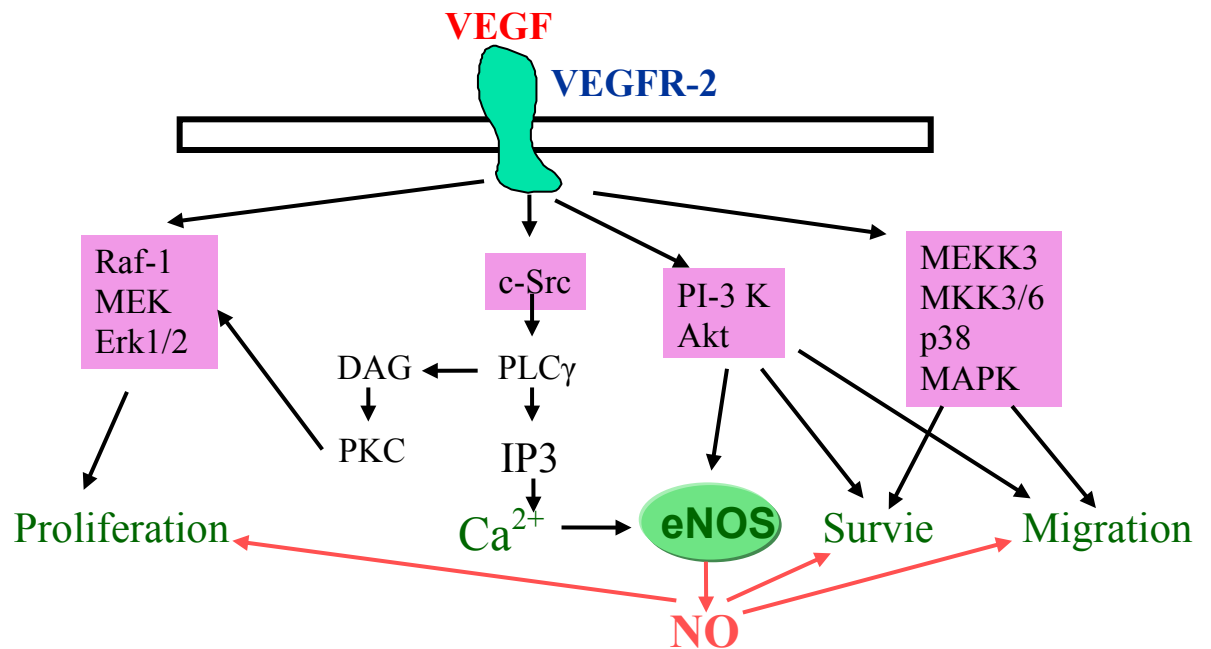


Figure 8: Les voies de signalisations du VEGFR-2 voir ¹⁴¹

1.4.4 Les corécepteurs au VEGFR-2

Différents complexes de récepteurs/co-récepteur sont formés lors de l'activation avec le VEGF. Le couple VEGF/VEGFR-2 permet l'interaction, de manière isoforme-spécifique, avec d'autres protéines exposées à la surface cellulaire qui vont agir comme co-récepteurs dans la signalisation angiogénique. Les Neuropilines -1 et -2 (NRP-1, -

2)¹⁴², les intégrines¹⁴³, l'Ephrine-B2¹⁴⁴ et l'Héparane sulfate protéoglycanes (HSPG)¹⁴⁵ sont les co-récepteurs les mieux caractérisés.

1.4.4.1 Les neuropilines

Les neuropilines (NRPs) sont des glycoprotéines exprimées à la surface cellulaire et qui agissent comme des récepteurs ou des co-récepteurs pour deux classes de ligands: les semaphorines de classe 3 (SEMA3) et certains sous-types de la famille du VEGF. Ils étaient identifiés originellement dans les cellules neuronales, ils sont aussi exprimés par les CE où ils agissent comme co-récepteurs pour le VEGF et augmentent l'affinité de la liaison du VEGF aux récepteurs.⁹⁸ Les NRPs (NRP-1 et NRP-2) sont des récepteurs de 120 à 130 kDa qui ne possèdent pas d'activité TK à cause de leur court domaine intracellulaire.^{146,147} Les NRPs seules ne peuvent pas transmettre des signaux intracellulaires et la formation des complexes avec des corécepteurs est nécessaire.¹⁴⁸⁻¹⁵⁰ Certaines formes solubles à l'état de monomères pourraient agir comme des antagonistes aux activités cellulaires induites par la fixation du VEGF à ses récepteurs. En revanche, des dimères de la NRP-1 soluble favorisent les effets pro-angiogéniques induits par le VEGF.¹⁵¹ La liaison du VEGF à la NRP-1 est très spécifique et l'inhibition de cette dernière dans les CE mène à une diminution de la liaison au VEGFR-2 et à celle de son activité mitogénique.¹⁵² La NRP-2 se lie spécifiquement au VEGFR-3 et joue un rôle important dans le développement du système lymphatique.¹⁵³ Malgré une homologie de structure, la NRP-1 et la NRP-2 ne présentent qu'une homologie de 44% au niveau de leur séquence d'acides aminés.¹⁴² Les souris déficientes en NRP-1 ou NRP-2 présentent des défauts létaux lors du développement

vasculaire et neuronal. Les NRPs sont exprimés à la fois par les vaisseaux matures et en développement ainsi que par les CML, les CE normales et tumorales.^{98,154-157} D'une manière intéressante, certaines isoformes du VEGF se lient simultanément aux deux récepteurs tels que le VEGFR-2 et la NRP-1, même lorsque ceux-ci sont exprimés sur les cellules adjacentes.¹⁵⁸ Cela pourrait être nécessaire afin de promouvoir la migration des CE, leur orientation et leur directionnalité et aussi lorsque les vaisseaux se forment le long de trajectoires bien définies par les cellules nerveuses^{147,152} ou lors du guidage des CE située à la pointe du bourgeon.^{51,159}

1.4.4.2 Les intégrines

Les intégrines sont des molécules d'adhésion cellulaire qui interviennent dans les contacts cellules-matrice extracellulaire. Ces molécules peuvent détecter les forces mécaniques émergeant de la MEC et les convertir en signaux permettant la modulation de la survie cellulaire. En outre, les intégrines régulent l'activité de nombreux récepteurs de facteurs de croissance. Cette coopération entre les intégrines et les récepteurs de facteurs de croissances est nécessaire pour la survie des cellules et l'homéostasie tissulaire.¹⁶⁰ Le développement vasculaire est étroitement contrôlé par les facteurs de croissance et leurs récepteurs, ainsi que par les intégrines et leurs ligands de la MEC.^{161,162} Le dépôt de la membrane basale et les facteurs mécaniques de la MEC transmis via les intégrines participent également à coordonner le bourgeonnement et le remodelage vasculaire en conjonction avec la voie de signalisation du VEGF.¹⁶³ Compte tenu de leur structure transmembranaire, leur capacité de former des associations avec des molécules adaptatrices et de se lier à des

ligands extracellulaires, les récepteurs du VEGF et les intégrines sont bien placés pour servir de pôles fonctionnels au cours du processus angiogénique.¹⁶⁴ Les intégrines forment une famille de récepteurs de la MEC qui peuvent réguler, de façon directe ou indirecte, la fonction des CE en modulant la signalisation intracellulaire et intercellulaire.¹⁶⁵⁻¹⁶⁷ Les complexes formés par les intégrines et le récepteur au VEGF représentent des axes centraux de signalisation lors de l'angiogenèse. L'activation du VEGFR-2 ou $\alpha_v\beta_3$ induit l'association physique des deux récepteurs, ce qui peut aussi être important pour la phosphorylation du VEGFR-2.¹⁶⁸ Les intégrines contenant la sous-unité β_3 se lient spécifiquement au VEGFR-2 et augmentent ainsi la signalisation du récepteur.¹⁶⁹ L'inhibition de $\alpha_v\beta_3$ ou du VEGFR-2 diminue l'activation du VEGFR-2 et la formation du complexe.^{139,170} Il a été rapporté que l'interaction $\alpha_v\beta_3$ /VEGFR-2 conduit à l'activation de SAPK2/p38, à la phosphorylation de FAK sur tyrosine ce qui induit la migration des CE en réponse au VEGF.^{171,172} Récemment, il a été montré que la signalisation en aval des intégrines et du VEGF permettrait l'intégration et la coordination du processus angiogénique dans son ensemble,¹⁷³ alors qu'au cours de la réparation tissulaire, les intégrines $\alpha_1\beta_1$ et $\alpha_2\beta_2$ s'associent au VEGFR-2 et joue un rôle modulateur de la lymphangiogenèse.¹⁷⁴

1.4.4.3 Les héparane-sulfates

L'héparane-sulfate (HS) se lie de plusieurs façons au VEGF et module ainsi sa biologie. Il peut aussi se lier à différents récepteurs et co-récepteurs tels que la NRP1. Toutes les isoformes du VEGF-A (sauf VEGF-A121) lient l'HS.¹⁷⁵ En outre, il a été montré que la quatrième boucle-Ig du VEGFR-1 et les sixième et septième boucles-Ig

de VEGFR-2 interagissent directement avec l'HS.¹⁷⁶ La liaison des HS aux différents complexes de signalisation permet d'augmenter leur stabilité.¹⁷⁷ En outre, la liaison du VEGF à VEGFR-2 en trans par l'HS exprimé sur les cellules adjacentes, telles que les péricytes, augmente l'amplitude et la durée de signalisation probablement en bloquant l'internalisation du récepteur.¹⁷⁸ L'HS sert de réservoir pour les facteurs de croissance qui sont libérés de façon contrôlée permettant la création d'un gradient.¹⁷⁹ Ainsi, les cellules situées à la pointe du bourgeon des vaisseaux sanguins en germination migrent en réponse à ce gradient de VEGF qui est modulé par les interactions avec les HS.⁸⁶ Cette liaison HS-VEGF/VEGF-R joue un rôle primordial dans le développement vasculaire de la rétine de souris¹⁸⁰.

1.4.4.4 VE-cadhérine

La VE-cadhérine est une glycoprotéine membranaire intégrale exprimée exclusivement dans les CE.¹⁸¹ Contrairement aux autres membres de la famille des cadhérines, l'expression de la VE-cadhérine au niveau des jonctions cellulaires est indépendante de sa liaison à β -caténine, ce qui semble être requis pour une stabilisation de la jonction.¹⁸² C'est une molécule d'adhésion responsable de la formation des jonctions adhérentes spécifiquement dans les CE.¹⁸³ Cette régulation de l'adhésion par la VE-cadhérine est cruciale pour l'assemblage efficace des structures vasculaires et le maintien de l'intégrité du réseau vasculaire pendant l'angiogenèse. L'expression de la VE-cadhérine aux jonctions cellulaires permet l'adhésion intercellulaire d'une manière dépendante du calcium, inhibe la prolifération cellulaire (inhibition de contact) et diminue la perméabilité cellulaire et la migration lorsqu'elle est surexprimée dans

différents types cellulaires.¹⁸⁴⁻¹⁸⁶ Elle interagit avec le VEGFR-2 et cette interaction est régulée par la β -caténine.¹⁸⁷ Ceci a été démontré dans des études où le domaine de liaison entre la VE-cadhérine et la β -caténine a été modifié. En éliminant ce domaine, la VE-cadhérine perd sa capacité de se lier au VEGFR-2 ce qui mène à une apoptose endothéliale.¹⁸⁷ La suppression génétique ou la troncation cytoplasmique de la VE-cadhérine chez des souris cause la létalité embryonnaire au jour E9.5. En absence de la VE-cadhérine, les complexes protéiques aux jonctions d'adhérence sont perturbés et les CE sont incapables de former des structures vasculaires. Ces CE présentent également un taux élevé d'apoptose probablement à la suite de la perturbation du signal de survie induit par l'activation de la voie PI3K/AKT en aval du VEGF/VEGFR-2.⁹³ La VE-cadhérine régule la signalisation du VEGFR-2 de différentes manières. Premièrement, elle retient le récepteur à la surface de la membrane cellulaire inhibant sa phosphorylation, ce qui prévient son internalisation vers les compartiments de signalisation intracellulaires.¹⁸⁷⁻¹⁹⁰ Ensuite, elle permet l'association de différentes phosphatases et atténue ainsi la phosphorylation des tyrosines au niveau du récepteur VEGFR-2 ce qui résulte en une diminution de la signalisation.¹⁹¹ En revanche, la modulation de la VE-cadhérine par le VEGFR-2 est essentielle pour la perméabilité vasculaire. L'activation du VEGFR-2 par le VEGF mène à une endocytose de la VE-cadhérine à l'aide de la β -arrestine 2²⁶ alors que l'activation de Tie2 par l'Ang-1 inhibe cette internalisation.¹⁹²

1.5 Famille des récepteurs Tie

Cette famille contient deux récepteurs Tie1 et Tie2. Tie2 (Tyrosine kinase with immunoglobulin-2 and EGF-like domain) connu aussi comme TEK (Tunica Internal Endothelial Cell Kinase) est principalement exprimé sur les CE vasculaires. Tie2 lie tous les ligands Angiopoïétines, alors que Tie1 est un récepteur orphelin.¹⁹³ Le récepteur Tie1 peut lier Tie2 et être activé par le biais de la transactivation de Tie2.¹⁹⁴ À son tour, l'activité de Tie2 est modulée suite à sa liaison à Tie1 qui joue un rôle d'antagoniste en interférant avec l'interaction de l'Ang-1 à Tie2. Les récepteurs Tie sont des monomères présentant un domaine extracellulaire de liaison au ligand, un domaine transmembranaire et un domaine intracellulaire à activité tyrosine kinase (TK). Tie1 et Tie2 ont une structure similaire avec 33 % d'homologie dans le domaine extracellulaire alors que les domaines intracellulaires sont constitués des domaines TK qui sont plus conservés partageant 76% d'homologie de séquence. Les récepteurs Tie se composent de trois domaines de type facteur de croissance épidermique (EGF) flanqués par trois domaines Ig, suivi de trois domaines de type fibrinogène adjacents au domaine transmembranaire^{195,196} (Figure 9).

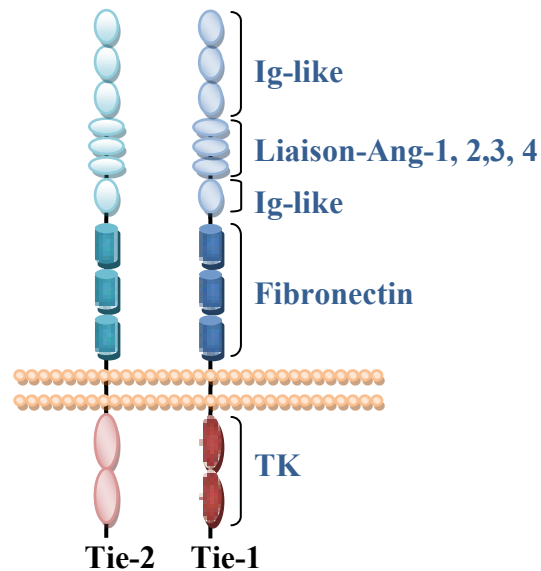


Figure 9: Structure des récepteurs Tie.

Contrairement à la plupart des RTK, ni l'Ang ni Tie2 ne subissent un changement de conformation suite à leur liaison. L'analyse structurale a révélé que l'Ang-1 et l'Ang-2 lient le récepteur Tie2 sur le même site.^{197,198} et leur interaction se fait au niveau d'une petite interface ligand-récepteur. Ce domaine de liaison se compose de résidus conservés au niveau du domaine de type fibrinogène du carboxy-terminal (C-terminal) de l'Ang et du domaine de type Ig-2 de Tie2. Seulement trois des 13 résidus du domaine de liaison de Tie2 à l'Ang-1 diffèrent de celui d'Ang-2.¹⁹⁷ Il est évident d'après le phénotype des souris déficientes en Tie2 que ces récepteurs sont d'une importance majeure au cours du développement embryonnaire et spécifiquement lors de la formation et la stabilisation vasculaire. Les souris déficientes en Tie2 décèdent

aux environs du jour E11.5 en raison d'anomalies cardiaques, d'œdème et d'hémorragie.^{199,200}

1.5.1 Les Angiopoïétines (Ang)

Les Angiopoïétines sont des protéines solubles sécrétées. Elles existent sous forme de dimères ou de multimères. Les Angs sont composées d'un domaine amino-terminal (N-terminal) en superhélice de type coiled-coil et un domaine C-terminal de type fibrinogène grâce auquel se fait la liaison au récepteur Tie2.

Le système des Angs via leur liaison à Tie2 contrôle plusieurs fonctions endothéliales soit, la survie, la migration, l'angiogenèse, la maturation et la stabilisation vasculaire. L'Ang-1 peut entraîner aussi des réponses cellulaires via sa liaison aux intégrines mais indépendamment de sa liaison au récepteur Tie2.²⁰¹ La famille des Angs comprend quatre ligands (Ang-1, Ang-2 et Ang-3/4). Les Angs sont constituées d'un domaine N-terminal comprenant deux résidus cystéines, suivi d'un domaine en hélice α , d'un peptide de liaison et d'un domaine homologue au fibrinogène dans leur partie N-terminale. Ce dernier est impliqué dans la fixation au récepteur et les multiples hélices α forment des structures circulaires organisant les ~~dimères~~ en oligomères de tailles variables.

Les souris déficientes en Ang-1 présentent le même phénotype que des souris déficientes en Tie2 et meurent aux environs du jour E9.5.^{199,200} L'Ang-1 est indispensable pour la stabilisation du réseau vasculaire. Au cours du développement et même chez l'adulte, une surexpression de l'Ang-1 conduit à un remodelage vasculaire et une résistance à la perméabilité vasculaire induite par des médiateurs

inflammatoires.^{202,203} Alors que l'Ang-1 fonctionne comme une cytokine anti-inflammatoire, l'Ang-2 a une fonction pro-inflammatoire et joue le rôle d'antagoniste pour l'Ang-1 dans l'endothélium vasculaire.²⁰⁴

L'Ang-2 augmente la perméabilité vasculaire et rend les vaisseaux sanguins plus susceptibles à l'angiogenèse.^{205,206} Par contre, sous certaines conditions, elle peut également fonctionner comme un agoniste partiel de Tie2.^{207,208} L'Ang-2 est produite par les CE et agit d'une manière autocrine. Elle se trouve emmagasinée dans des granules de stockage endothéliales comme les corps de Weibel-Palade où elle colocalise avec le facteur von Willebrand (VWF).²⁰⁹ Le contenu des corps de Weibel-Palade est libéré en réponse à la stimulation par des cytokines en cas d'inflammation ou de perméabilité vasculaire.^{205,209} L'Ang-2 joue le rôle d'amorce ou de sensibilisateur de l'endothélium vasculaire aux cytokines exogènes pour induire une déstabilisation vasculaire.²⁰⁶ On trouve une forte expression de l'Ang-2 dans la vascularisation tumorale et il a été suggéré que l'Ang-2 peut agir en synergie avec d'autres cytokines telles que le TNF α ²⁰⁶ et le VEGF pour promouvoir l'angiogenèse et la progression tumorale. La quantité de l'Ang-2 stockée dans les différents lits vasculaires *in vivo* pourraient finalement dépendre du degré de réactivité ou de réfraction d'un lit vasculaire à des cytokines inflammatoires ou angiogéniques spécifiques. Par exemple, des quantités importantes d'Ang-2 sont emmagasinées dans l'endothélium vasculaire des microvaisseaux du cerveau, tandis que celles stockées dans les corps de Weibel-Palade du muscle squelettique ou la vascularisation du myocarde sont à peine détectables.²⁰⁶

L'Ang-3 et l'Ang-4 ont été clonées comme des orthologues humain et murin respectivement. Elles partagent seulement 65 % d'homologie de séquence d'acides aminés et semblent exercer des effets pro- ou anti-angiogéniques en fonction des conditions expérimentales.²¹⁰ L'Ang-3 a été rapporté comme un puissant agoniste de Tie2 murin et favorise l'angiogenèse au niveau de la cornée²¹⁰ ainsi que la croissance des xénogreffes des tumeurs de gliome.²¹¹ Cependant, il a été montré que la surexpression de l'Ang-3 inhibe l'angiogenèse tumorale et les métastases pulmonaires dans les modèles de carcinome pulmonaire de Lewis et de carcinome mammaire.²¹² Dans les CE de la veine ombilicale humaine (HUVEC), le traitement avec l'Ang-4 recombinante inhibe la migration dirigée vers le VEGF et le FGF2 (bFGF) *in vitro*, et inhibe aussi l'angiogenèse induite par le FGF2 et le VEGF.²¹³ En revanche, dans le même type cellulaire (HUVEC), il a été rapporté par d'autres que l'Ang-4 induit la migration cellulaire *in vitro*.²¹⁰ De plus, une augmentation de l'expression cytoplasmique de l'Ang-4 a été rapportée dans le cas des adénocarcinomes colorectaux et gastriques chez l'homme.^{214,215} Toutes ces données suggèrent que l'Ang-3 et l'Ang-4 sont impliqués dans l'angiogenèse mais leur contribution à la tumorigenèse, leur rôle et leur interaction avec d'autres facteurs angiogéniques ont besoin d'être éclaircis. Plusieurs études dans la littérature concernant les activités de l'Ang-3 et l'Ang-4 sont parfois contradictoires et les résultats dépendent en grande partie du contexte cellulaire.²¹⁶ Cependant, il reste beaucoup à apprendre sur les mécanismes moléculaires et l'activité biologique des Angs, spécialement l'Ang-3 et l'Ang-4 ainsi que les membres les plus récemment découverts de la famille des protéines de type angiopoïétines (Angiopoietin-like).

1.5.2 Les protéines de type angiopoïétines (Angptls)

Les Angptls sont une famille de glycoprotéines sécrétées présentant une forte homologie avec les angiopoïétines et joue un rôle aussi dans la régulation de l'angiogenèse.²¹⁷ Toutefois, les Angptls sont des ligands orphelins exprimés spécifiquement par l'endothélium.^{218,219} Elles ne peuvent pas se lier aux récepteurs des angiopoïétines, Tie1 et Tie2. À ce jour, la famille des Angptls est composée de sept membres Angptls (1-7). Les Angptls et les Angs ont deux domaines en communs, un premier domaine «coiled-coil» à l'extrémité NT et un deuxième domaine de type fibrinogène à l'extrémité CT.²²⁰ Les Angptls font l'objet d'une attention considérable en raison de leur possible implication dans l'angiogenèse, le métabolisme des lipoprotéines²²¹ et l'expansion des cellules souches hématopoïétiques *in vitro*. Les souris déficientes en Angptl-4 présentent beaucoup d'hémorragie, d'œdème, d'inflammation et une perméabilité vasculaire accrue.²¹⁸ En effet, chez ces souris, le complexe VEGFR-2/VE-cadhérine est altéré dans les CE ce qui induit une perturbation des jonctions adhérentes. L'injection *in vivo* de l'Angptl-4 recombinante humaine protège contre la dissociation du complexe VEGFR-2/VE-cadhérine induite par le VEGF.²²² Trois partenaires moléculaires lient directement l'Angptls-4 soit l'intégrine $\alpha 5\beta 1$, la VE-cadhérine et la claudine.²²³ L'Angptl-4 est le membre de la famille des Angptls le plus étudié car elle pourrait constituer une cible pertinente pour la protection vasculaire thérapeutique visant à contrecarrer les effets du VEGF dans des maladies vasculaires.

1.5.3 Signalisation intracellulaire Ang-1/Tie2

Chez les souris déficientes en Ang-1 ou en Tie2, le réseau vasculaire est immature, instable et manque de couverture cellulaire murale, ce qui laisse suggérer que la signalisation Ang-1/Tie2 est essentielle pour le recrutement des cellules de soutien (pericytes ou CML). L'effet antiperméable induit par la liaison de l'Ang-1 à Tie2 a été rapporté dans différents contextes et il a été associé à la stabilisation des jonctions endothéliales^{224,225}, du cytosquelette^{202,226} et à la régulation d'autres voies de signalisation cellulaire. Dans les CE, les multimères d'Ang-1 se lient à Tie2 qui forme à son tour des dimères ou des multimères, ce qui engendre son autophosphorylation. Tie2 activé lie plusieurs autres effecteurs et protéines adaptatrices tel que Grb2 (growth factor receptor bound protein-2), Dok-R ou Dok2 (downstream of tyrosine kinases), eNOS et la sous unité p85 de la PI3K.^{227,228} Tie2 peut aussi recruter des phosphatases comme SHP2²²⁹ et VE-PTP (protéines tyrosines phosphatase vasculaire endothéliale) qui provoquent sa déphosphorylation.²³⁰ L'Ang-1 est un facteur de croissance qui active Tie2 afin de promouvoir plusieurs réponses biologiques importantes pour la croissance et le remodelage vasculaire.

La phosphorylation de Tie2 induite par l'Ang-1 permet l'activation de la voie PI3K et l'activation de la protéine kinase AKT. Cette voie permet l'activation des voies impliquées dans la survie cellulaire telle que la survivine.²³¹ Elle inhibe aussi les voies pro-apoptotiques comme la caspase 9 et BAD.²³² L'activation d'AKT induit également la phosphorylation et l'inactivation du facteur de transcription de type «forkhead» (FOXO-1) qui contrôle l'expression de l'Ang-2. Tie2 joue un rôle important dans l'inflammation en recrutant l'inhibiteur du facteur nucléaire- κ B (NF- κ B) (ABIN2 ou

TNIP2). Ce recrutement conduit à une inhibition de la voie NF-κB importante dans l'induction de l'expression des gènes inflammatoires et de l'expression des molécules d'adhésion telles que: ICAM1, VCAM1 et E-sélectine. L'Ang-2 augmente également leur expression en bloquant la fonction de l'Ang-1. L'Ang-1 protège contre les chocs endotoxiques induits par les lipopolysaccharides (LPS) et empêche ainsi la perméabilité vasculaire.²³³ Elle bloque aussi l'expression et l'activité du facteur tissulaire (TF) qui est un initiateur de la coagulation sanguine et réduit l'adhérence des leucocytes aux CE stimulées par le VEGF.²³⁴

1.5.3.1 Quiescence et maturation des cellules endothéliales

Le maintien d'une quiescence et d'une stabilisation cellulaires endothéliales requiert une association étroite avec les cellules péri-endothéliales (péricytes et CML). L'activation de Tie2 augmente l'expression de HB-EGF (Heparin-binding epidermal-like growth factor) qui stimule la migration des CML de manière paracrine.²³⁵ Le facteur de croissance HGF (hepatocyte growth factor) et la sérotonine semblent également constituer des cibles via lesquels l'Ang-1 joue un rôle dans la migration des CML. Néanmoins, Il a été rapporté que l'activation de Tie2 par l'Ang-1 permet la survie et l'architecture adéquate du réseau vasculaire rétinien malgré l'absence complète des cellules péri-endothéliales. Ceci montre que l'Ang-1 agit via des mécanismes alternatifs, autres que les cellules de soutien, pour assurer la stabilisation vasculaire. Les effets fonctionnels de l'Ang-1 peuvent être dépendants ou indépendants de sa liaison à son récepteur Tie2. Les intégrines constituent une de ces voies alternatives de la signalisation par l'Ang-1. L'Ang-1 induit l'adhésion et l'étalement

des CE par l'intermédiaire des intégrines $\alpha_v\beta_1$ et $\alpha_v\beta_5$.²³⁶ L'Ang-1 peut également induire la survie des myocytes cardiaques déficientes en Tie2 d'une manière intégrine-dépendante.²⁰¹ Il est intéressant de noter que le récepteur Tie2 peut lui-même lier l'intégrine $\alpha_v\beta_1$ afin de promouvoir l'angiogenèse à la suite d'une stimulation par l'Ang-1.²³⁷ Récemment, il a été aussi démontré que l'Ang-1 se lie à des monocytes et induit la migration de ces cellules par un mécanisme qui est indépendant à la fois de Tie-2 et des intégrines, mais qui nécessite l'activation de PI3K.²³⁸

Le phénotype quiescent des CE est maintenu par la signalisation intracellulaire continue en aval de l'interaction Ang-1/Tie2. L'Ang-1 forme des associations de plusieurs molécules de Tie2 au niveau des jonctions cellulaires inter-endothéliales et participe à la survie de l'endothélium. L'Ang-1 induit des complexes uniques de Tie2 dans les CE en migration versus les cellules confluentes à l'état de quiescence. L'Ang-1 lié à la matrice induit l'adhésion cellulaire, la motilité et l'activation de Tie2 au niveau des contacts cellule-matrice. En revanche, dans les cellules confluentes l'Ang-1 induit la translocation de Tie2 vers les contacts cellule-cellule et permet la formation des complexes homotypiques de type trans (Tie2-Tie2). Ces complexes comprennent notamment la phosphatase VE-PTP ce qui conduit à une inhibition de la perméabilité paracellulaire. Plusieurs protéines de signalisation ont été préférentiellement activées par Tie2 au niveau des contacts entre les cellules ou entre les cellules et la matrice où l'Ang-2 inhibe l'activation de Tie2 induite par l'Ang-1. Des analyses à l'aide de biopuces à ADN ont montré que des CE vasculaires stimulées à l'Ang-1 ont clairement un profil d'expression génétique qui diffère selon la présence ou l'absence des contacts cellule-cellule, ce qui implique que la signalisation en aval de l'Ang-1/Tie2 dépend

étroitement de la localisation spatiale de Tie2. Ce nouveau type d'activation des RTK dépendant du microenvironnement cellulaire pourrait expliquer comment la voie de signalisation de l'Ang-1/Tie2 joue deux rôles distincts et complètement contradictoires dans la quiescence vasculaire et l'angiogenèse.

1.5.3.2 Migration et perméabilité des cellules endothéliales

L'activation de Tie2 stimule la migration des CE par l'activation de la voie PI3 kinase qui inclut le recrutement des protéines adaptatrices Grb14 et Shp2 au récepteur Tie2. Le recrutement des protéines Dok-R et Nck2 ou Grb4 par Tie2 semble également jouer un rôle dans le contrôle de la migration des CE.²³⁹⁻²⁴¹ La migration cellulaire endothéliale serait induite suite à une translocation de Tie2 et de sa liaison à l'Ang-1 au niveau de la MEC. Aux contacts cellules-matrice, la voie AKT se trouve bloquée, alors que, Dok-R est phosphorylé. Dok-R activé interagit avec ras-GAP, Nck et Crk qui sont toutes des molécules impliquées dans la migration cellulaire, la prolifération, la réorganisation du cytosquelette et la régulation de la cascade de signalisation Ras.²⁴² Les effets inhibiteurs de l'activation de Tie2 sur la perméabilité endothéliale impliquent plusieurs voies de signalisations en aval d'Ang-1/Tie2. Src participe à l'augmentation de la perméabilité endothéliale induite par le VEGF en induisant la phosphorylation et, par le fait même, la redistribution de la VE-cadhérine. Il a été démontré que la séquestration de Src par Tie2 par le biais de mDia (mammalian diaphenous) prive le VEGFR-2 de cet acteur (Src) essentiel dans la perméabilité endothéliale.¹⁹² L'Ang-1 agit comme un facteur de protection vasculaire en limitant aussi l'adhérence des leucocytes et des neutrophiles ainsi que la transmigration à

travers la barrière endothéliale.^{243,244} Ainsi, l'axe de signalisation endothéliale Ang-1/Tie2 pourrait jouer un rôle anti-inflammatoire clé dans diverses maladies comme l'asthme, les rhumatismes et le choc septique. Il reste à déterminer si l'inhibition de l'activation de Src via Tie2 agit, dans chacun de ces cas pathologiques, seule ou en combinaison avec d'autres mécanismes potentiels tels que l'activation de PKC ζ ,²⁴⁵ des GAP pour les RhoGTPases²⁰² ou encore l'inhibition de la signalisation calcique.²⁴⁶ Afin de comprendre comment l'Ang-1/Tie2 augmente la stabilité et l'imperméabilité endothéliale, il faut délimiter tous les mécanismes moléculaires spécifiques par lesquels chaque catégorie de facteurs induit la perméabilité vasculaire afin de faciliter l'identification des cibles supplémentaires dans le processus d'inhibition de la perméabilité cellulaire par l'Ang-1. Nous avons démontré que l'Ang-1 peut exercer sa fonction d'anti-perméabilité via une nouvelle voie de signalisation qui contrecarre la perméabilité induite par le VEGF via l'inhibition de la production du monoxyde d'azote (NO) par les CE.²⁴⁵

1.6 Le monoxyde d'azote

Le NO est un gaz lipophile généré par la synthèse du monoxyde d'azote (NOS). Ce médiateur gazeux a d'abord été identifié comme le facteur relaxant dérivé de l'endothélium (EDRF) par Furchgott et Zawadzki,³ puis comme le NO.²⁴⁷⁻²⁴⁹ La libération du NO peut être stimulée par une simple augmentation du flux sanguin conduisant à l'augmentation des forces de cisaillement sur l'endothélium ou par des agents tels que la bradykinine, la thrombine, l'acétylcholine, la sérotonine et le VEGF.²⁵⁰

Physiologiquement, le NO est synthétisé à partir de l'acide aminé L-arginine. Il induit directement la vasodilatation et la relaxation des CML vasculaires²⁵¹ par l'activation de la guanylate cyclase soluble (GCs). L'augmentation subséquente de la guanosine monophosphate cyclique (GMPc) contribue à la relaxation des muscles lisses et au maintien de la pression artérielle au repos. Le NO est également considéré comme une molécule anti-athérogène et anti-thrombotique grâce à sa capacité d'inhiber l'agrégation plaquettaire, l'adhérence des cellules inflammatoires, la prolifération des CML et la régulation de la pression artérielle.^{251,252} Une altération dans la production de NO va entraîner la dysfonction endothéliale et le développement de plusieurs maladies vasculaires.²⁵³ Dans le système cardiovasculaire, la synthèse de NO par la L-arginine peut être bloquée pharmacologiquement par une variété d'analogues de ce dernier. Ces inhibiteurs de la NOS comme le NG-mono-méthyl-L-arginine (L-NMMA) peuvent induire une vasoconstriction, la formation de thrombus et l'athérogenèse.^{254,255} En plus du NO, les CE génèrent des anions superoxide O_2^- . Les CE produisent constamment de faibles niveaux de cet oxydant (O_2^-) qui sont significativement augmentés lorsque les cellules sont activées.²⁵⁶ L'inactivation des anions superoxide se fait principalement par la superoxide dismutase (SOD). Pourtant le premier mécanisme de la perte rapide de NO est son interaction avec le superoxide.²⁵⁷ Si les niveaux d' O_2^- sont significativement élevés, le NO entre en compétition avec O_2^- pour se lier à la SOD, une réaction qui limite la disponibilité de NO.^{258,259} Ceci réduit le NO qui est remplacé par une production du peroxy-nitrite ($ONOO^-$), résultat de l'interaction de NO avec l' O_2^- , qui est aussi un oxydant très puissant.

Le NO comme plusieurs autres médiateurs antiathérogènes est un puissant vasodilatateur dont la source majeure est l'endothélium. Il exerce également des effets anti-inflammatoires *in vitro* et *in vivo* tels que l'inhibition de l'expression des molécules d'adhésion endothéliales (VCAM-1, ICAM-1), du facteur tissulaire (TF)²⁶⁰ ainsi que la libération des chimiokines tel que la protéine-1 chimiotactique des monocytes (MCP-1).²⁶¹ Le NO tout comme le ONOO⁻ modifie chimiquement les acides aminés et les acides nucléiques bien spécifiques contenant un groupement thiol (généralement des cystéines) de certaines protéines ou de simples peptides et de modifier ainsi leurs fonctions.²⁶² La nitrosylation par le NO est une des modifications post-traductionnelles qui joue un rôle important dans la détermination de l'activité de certaines protéines. En effet, la nitrosylation de la β -caténine va causer sa dissociation du complexe des jonctions d'adhérence.²⁶³ La nitrosylation de la dynamine augmente son activité GTPase et facilite ainsi sa redistribution à la membrane ce qui a pour effet d'augmenter l'internalisation des récepteurs de la surface cellulaire²⁶⁴ alors que la nitrosylation de c-Src augmente son activité kinase.²⁶⁵

Le NO est crucial pour le maintien d'une pression artérielle normale ainsi que le maintien d'un tonus artériel bas dans la circulation systémique et pulmonaire, au repos.²⁶⁶ Ainsi, de faibles concentrations de NO protègent les cellules contre l'apoptose alors que des concentrations élevées causent la mort cellulaire comme dans le cas d'un infarctus cérébral, du sepsis ou du diabète. Il existe beaucoup de maladies vasculaires associées à la formation accrue du superoxyde par la NADPH oxydase.²⁶⁷⁻²⁶⁹ Ainsi, dans un endothélium dysfonctionnel on assiste à une diminution de NO en faveur d'une libération d'O₂⁻. Un déséquilibre entre la production de NO et O₂⁻ semble être

une caractéristique commune à beaucoup de maladies cardiovasculaires comme l'insuffisance cardiaque.

La régulation de la production de NO dans les CE est très complexe, elle peut se faire par de multiples mécanismes, notamment le ciblage de l'enzyme eNOS, les modifications postraductionnelles, la modulation des facteurs qui régulent l'activité de NOS ou les interactions protéine-protéine.

1.6.1 Les synthèses du monoxyde d'azote (NOS)

La production NO est catalysée par une famille d'enzymes appelées NOS. Il existe trois isoformes distinctes de NOS: de type 1 ou neuronale (nNOS), de type 2 ou inducible (iNOS) et de type 3 ou endothéliale (eNOS). Cette dernière a été initialement clonée et identifiée dans les CE.

La transcription basale d'eNOS est contrôlée par deux régions régulatrices qui lient différents types de facteurs de transcription. Ces régions contiennent également des nucléotides méthylés qui limitent la transcription d'eNOS.²⁷⁰ L'ARNm d'eNOS est d'environ 4052 nucléotides et a une demi-vie de 10 à 35 heures. Par conséquent, la synthèse de la protéine est susceptible de persister longtemps après que l'expression du gène soit réprimée. La présence de sites consensus au niveau du promoteur d'eNOS fait que les niveaux de transcription génique d'eNOS sont élevés suite au stress,^{271,272} à l'exercice^{273,274} ou à un état hypoxique.²⁷⁵

Dans les vaisseaux sanguins, eNOS est une protéine membranaire périphérique, trouvée dans tous les types de CE, qui peut être activée par des forces mécaniques (débit et pression). Le NO est produit par la conversion de la L-arginine en L-citruline.

Plusieurs cofacteurs sont nécessaires pour cette réaction et permettent le transfert d'électrons pendant l'oxydation de la L-arginine tels que: la nicotinamide-adenine-dinucléotide phosphate (NADP), la flavine mono-nucléotides (FMN), la flavine adénine dinucléotide (FAD), la calmoduline (CaM) et la tétrahydrobioptérine (BH4) qui maintient la dimérisation d'eNOS. La synthèse endothéliale du monoxyde d'azote se compose d'un domaine oxygénase à son extrémité NT qui contient les sites de liaison pour l'hème, la L-arginine et le BH4, ainsi qu'un domaine réductase où se trouve les sites de liaison pour la NADPH, la FMN, la FAD et la CaM (Figure 10). eNOS est exprimée de façon constitutive et l'enzyme active fait partie d'un complexe multi-protéique formant le dimère NOS.

Le stress oxydatif et la présence des capteurs de NO, les ROS, réduisent la disponibilité de NO et causerait le découplage de NOS. En effet, plutôt que la production de NO, c'est le O^{2-} qui est généré suite à la dissociation du complexe d'hème ferreux dioxygène du domaine oxygénase de NOS. Il a été proposé qu'une augmentation de la production des cytokines et autres médiateurs de l'inflammation, en association avec le stress oxydatif, aggrave la dysfonction endothéliale dans les maladies cardiovasculaires et métaboliques endocriniennes. L'incapacité des vaisseaux sanguins de produire ou de répondre au NO est un aspect majeur de la dysfonction endothéliale. En effet, les souris déficientes pour le gène eNOS sont hypertendues et cette hypertension est essentiellement associée à une réduction de la relaxation endothéliale.

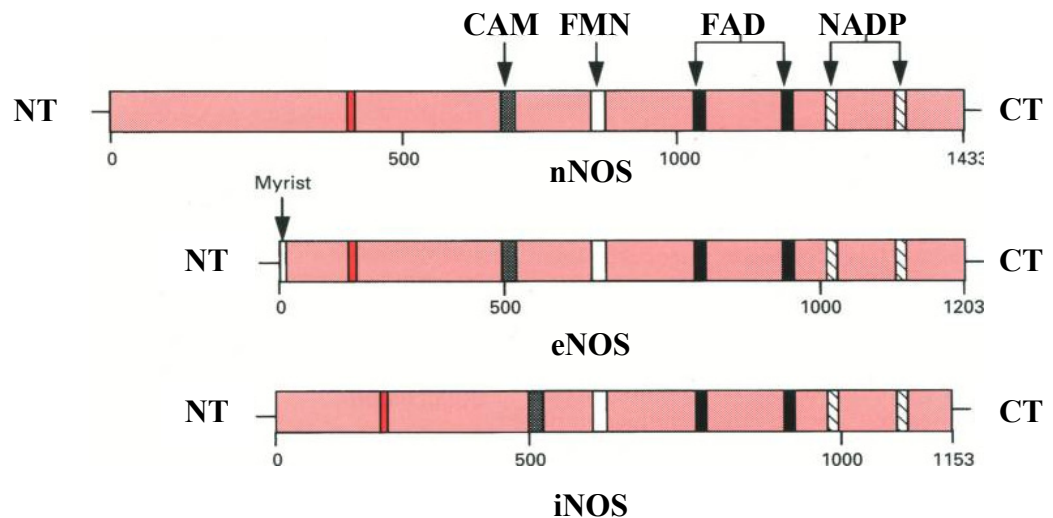


Figure 10: Représentation schématique de la structure des trois isoformes de NOS et de leurs différents sites de liaison aux cofacteurs.

1.6.2 Régulation de la synthèse du monoxyde d'azote endothéliale (eNOS)

eNOS est une enzyme bien établie comme molécule de signalisation clé dans le système vasculaire. L'activité d'eNOS et sa localisation subcellulaire sont contrôlées par les interactions protéine-protéine, les fluctuations du calcium intracellulaire et les modifications post-traductionnelles comme la myristoylation la palmitoylation et la phosphorylation.

Les interactions protéine-protéine vont soit activer soit inhiber eNOS. Par exemple la protéine de choc thermique 90 (Hsp90), une chaperonne moléculaire ubiquitaire, est l'une des protéines qui s'associe à eNOS et qui est bien étudiée.

L'association Hsp90/eNOS est d'abord importante pour le repliement correct de la protéine eNOS. Il a été démontré que cette interaction est aussi importante pour la promotion de la réponse angiogénique et elle se trouve modulée dans diverses maladies vasculaires.²⁷⁶⁻²⁷⁹ En revanche, la liaison d'eNOS à la cavéoline va entraîner une inhibition de son activité enzymatique alors que sa liaison à la calmoduline en présence du calcium intracellulaire déplace l'interaction inhibitrice d'eNOS avec la cavéoline-1 et favorise ainsi sa liaison à Hsp90, sa phosphorylation, son activation et par la suite la production de NO. NOSIP est aussi un partenaire moléculaire d'eNOS qui va se lier à sa région CT du domaine oxygénase. L'interaction de la protéine NOSIP à eNOS favorise la translocation d'eNOS à partir des cavéoles vers les sites intracellulaires, ce qui cause une diminution de la production de NO.²⁸⁰

La localisation subcellulaire d'eNOS est aussi importante pour la régulation de son activité. eNOS est principalement situé aux cavéoles où son activité est plus élevée par rapport aux formes associées au Golgi et au cytosquelette d'actine.²⁸¹

Les modifications post-traductionnelles sont des mécanismes complexes et précis de la régulation de l'activité d'eNOS. L'enzyme est à la fois myristoylée au niveau du domaine NT précisément sur le résidu glycine en position 2 et elle est palmitoylée au niveau des résidus cystéines aux positions 15 et 26.²⁸²⁻²⁸⁴ La myristoylation d'eNOS lui permet une localisation au niveau de l'appareil de Golgi où elle y est palmitoylée. Finalement, la protéine myristoylée et palmitoylée est destinée à la membrane des cavéoles riches en cholestérol.

Les événements de phosphorylation et de déphosphorylation d'eNOS sont étroitement régulés dans le temps afin de favoriser le fonctionnement optimal de

l'enzyme. Différentes kinases (PKC, PKA, AKT, AMPK) et phosphatases (PP2A, PP1) vont s'associer à eNOS afin de réguler son état de phosphorylation (Figure 11). Les événements de phosphorylation vont entraîner soit une activation d'eNOS soit son inactivation en fonction de la kinase impliquée et du site de phosphorylation d'eNOS. L'activation d'eNOS exige la fixation du complexe calcium-calmoduline. Le calcium provient soit des réserves intracellulaires ou à partir de l'influx du calcium du milieu extracellulaire. La déphosphorylation d'eNOS est assurée par les phosphatases PP2A et PP1 agissant sélectivement et respectivement sur les Ser-1177 et Thr-497.²⁸⁵ La phosphorylation d'eNOS, au niveau de sérines et thréonines spécifiques^{286,287} survient en réponse à une grande variété de stimuli mécaniques et pharmacologiques. Cette régulation implique en plus des kinases et des phosphatases, des interactions avec d'autres voies de régulation d'eNOS. Plusieurs kinases potentielles dont AKT, PKA et l'AMPK ont la capacité de phosphoryler eNOS sur la Ser1179 (séquence bovine) et Ser1177 (séquence humaine).²⁸⁸ Cette phosphorylation activatrice cause une augmentation marquée de la libération de NO. Par contre, la phosphorylation sur la thréonine (Thr497 ou Thr495) inhibitrice par la protéine kinase C inhibe l'activité de l'enzyme eNOS.^{245,289,290}

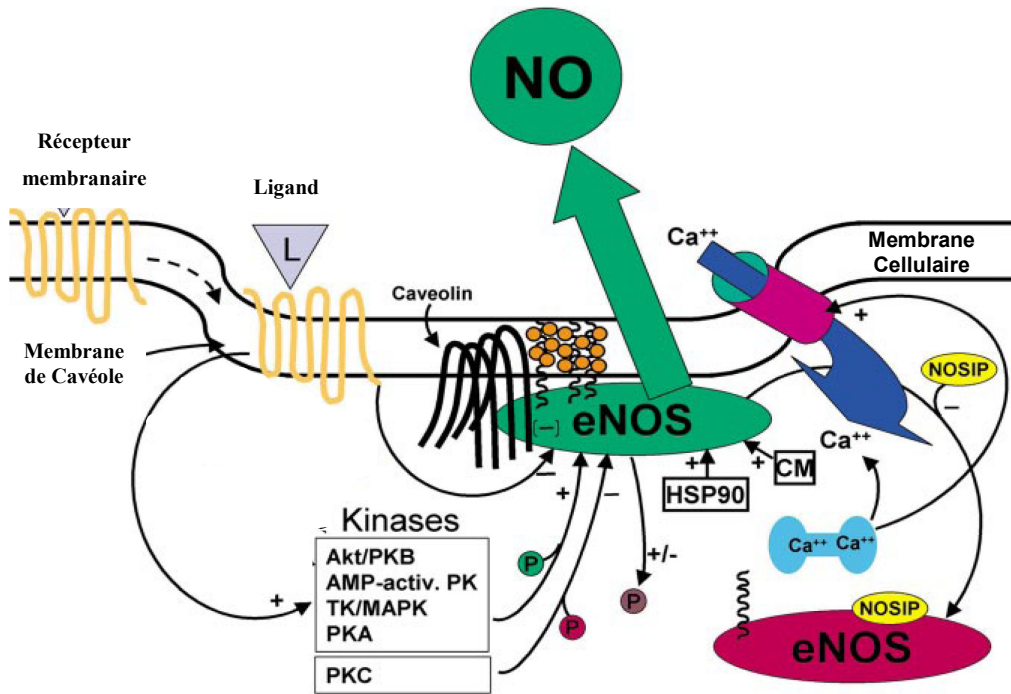


Figure 11: Les mécanismes de régulation de l'activité d'eNOS. La liaison du ligand (L) à son récepteur transmembranaire déclenche une cascade de signalisation intracellulaire. L'activation des kinases (AKT, AMP, PKA, PKC) va induire la phosphorylation d'eNOS et son interaction avec différentes molécules (HSP90, Cavéoline-1, NOSIP, Calcium (Ca⁺⁺)/Calmoduline (CM)) ce qui va entraîner soit l'activation (vert) ou l'inhibition (rouge) de l'enzyme eNOS.

1.7 Les protéines kinase C (PKC) et la signalisation endothéliale

La protéine kinase C a été découverte par Yasutomi Nishizuka en 1977. Les PKCs appartiennent à la famille AGC (protéine kinase AMPc-dépendante (PKA)/protéine

kinase G (PKG)/PKC).²⁹¹ Les kinases AGC se composent d'un noyau catalytique dont l'activité est contrôlée par un domaine régulateur. Les PKCs sont des protéines sérine/thréonine kinases, importantes dans la médiation de la signalisation à la surface cellulaire²⁹². Ils jouent un rôle clé dans de nombreuses fonctions cellulaires.²⁹³ La dépendance de la famille des PKCs aux lipides a grandement facilité l'identification des activateurs en amont de ces kinases. Les régulateurs physiologiques des PKCs, y compris les facteurs de croissance et les hormones, induisent la génération du diacylglycérol (DAG) et la libération du Ca^{2+} intracellulaire. La famille des PKCs est composée de multiples isoformes qui fonctionnent dans une large variété de systèmes biologiques.²⁹⁴

La famille des PKCs est subdivisée en trois catégories qui sont définies par des critères de classification se basant sur leurs propriétés de régulation et d'activation (Newton, 2001).

Les PKCs conventionnelles ou classiques (cPKCs) (PKC- α , - β 1, β 2-et- γ) sont activées par la phosphatidylsérine (PS), le Ca^{2+} et le DAG ou les phorbol esters tels que le phorbol 12-myristate 13-acétate (PMA). Un mécanisme similaire d'activation des cPKCs s'applique pour les nPKCs, à l'exception qu'ils sont insensibles au Ca^{2+} , les PKCs nouvelles (nPKCs) (PKC- δ , - ϵ , - θ et - η) sont activées par le PS, DAG ou PMA, mais pas par le Ca^{2+} et les PKCs atypiques (aPKCs) (PKC ζ et - ι/λ) ne sont activés ni par le Ca^{2+} ni par le DAG ou le PMA.²⁹³⁻²⁹⁶ Toutes les isoformes de PKC se composent d'un domaine catalytique et d'un domaine régulateur contenant des sites de liaison pour les activateurs de PKC. Ils régulent plusieurs fonctions vasculaires et sont essentiels à l'homéostasie cellulaire et tissulaire. Étant donné leur rôle central dans l'homéostasie

vasculaire, il n'est pas surprenant que l'expression ou l'activité de certaines de ces kinases soit altérée dans les maladies humaines, en particulier le cancer et des pathologies affectant des vaisseaux sanguins (athérosclérose, cardiomyopathie, rétinopathie, néphropathie et neuropathie). De multiples modifications de différentes isoformes de PKCs causent plusieurs altérations et dérégulations des processus cellulaires et vasculaires y compris la dysfonction endothéliale, la perméabilité vasculaire, l'angiogenèse, la croissance cellulaire, l'apoptose, la dilatation des vaisseaux, l'épaississement de la membrane basale et l'expansion de la matrice extracellulaire. Un défaut d'expression ou d'activité des PKCs entraîne aussi des altérations de l'activité enzymatique d'autres protéines telles que la protéine kinase activée par les mitogènes (MAPK), la phospholipase cytosolique A2 (PLA2) ainsi que l'altération de plusieurs facteurs de transcription. Des essais cliniques utilisant des inhibiteurs de PKC ont été menés avec quelques résultats positifs, notamment l'utilisation d'un inhibiteur de l'isoforme PKC β qui est utilisé dans le cas de la rétinopathie diabétique non proliférative et la néphropathie. L'activation des PKCs a été associée aussi à une augmentation de la perméabilité aux macromolécules à travers la barrière endothéliale.^{297,298} En outre, de nombreux travaux sur la régulation des PKCs ont été faits dans un contexte d'hyperglycémie et de diabète. Le groupe de Inoguchi et collaborateurs a montré que le PMA inhibe les communications intercellulaires au niveau des jonctions des CE de l'aorte bovine (BAEC).²⁹⁹ L'activation des PKCs entraîne également un dysfonctionnement de l'endothélium par une augmentation de la vasodilatation, de la modification de la biodisponibilité de NO, de l'expression du VEGF et de son action sur la diminution de la production de la

prostacycline, de la thromboxane (vasoconstricteur dépendant de la cyclogénase) et de l'endothéline-1.³⁰⁰⁻³⁰²

Les PKCs, via l'expression de facteurs de croissance tels que le VEGF, permettent de moduler la perméabilité endothéliale vasculaire ainsi que la néovascularisation.³⁰³ Il a été rapporté que la PKC β est nécessaire pour induire la perméabilité des CE rétinienne en réponse au VEGF en modifiant la phosphorylation de l'occludine.³⁰⁴ Inversement, les PKCs peuvent induire une vasoconstriction dans les CE de la rétine causée par une augmentation de l'expression de l'endothéline-1 qui est un puissant vasoconstricteur.³⁰⁵ Il est aussi possible que l'activation des PKCs induise une augmentation de la contractilité du muscle vasculaire lisse comme ce qui a été rapporté au cours du diabète.³⁰⁶ De nombreuses études ont montré que l'activation des PKCs peut se faire également par une simple association à la membrane et l'interaction avec d'autres protéines. Ces interactions modifient ou stabilisent la conformation active des PKCs. Ces divergences dans la fonction et la régulation des différentes isoformes de PKC existent malgré une forte homologie de séquences entre elles.

1.7.1 Les PKCs classiques (cPKC) et nouvelles (nPKC)

Les isoformes de cPKCs se composent d'un domaine régulateur NT contenant un domaine de pseudo-substrat (PS), deux domaines C1 (C1a et C1b), un domaine C2 et un domaine kinase C-terminal. Le domaine régulateur NT des cPKCs contient un site de liaison au pseudo-substrat, un domaine C2 de liaison au Ca²⁺ et deux domaines C1 qui peuvent se lier au DAG et aux phorbol-esters. L'activation des PKCs en général se fait lorsque les niveaux de Ca²⁺ et/ou DAG augmentent dans la cellule et ils se lient

aux domaines C2 et C1 respectivement. Une fois recrutées à la membrane plasmique, les cPKCs subissent un changement de conformation qui expose leur domaine kinase lui permettant ainsi d'exercer sa fonction catalytique.

Les isoformes des cPKCs et des nPKCs sont structurellement conservées²⁹¹ à l'exception du domaine C2 des isoformes cPKCs qui lie le Ca^{2+} , le même domaine dans les nPKCs ne le lie pas. Le domaine catalytique dans le CT est hautement conservé entre les isoformes et contient le domaine de liaison à l'ATP, le site de liaison du substrat, les trois sites de phosphorylation sur le domaine kinase (Figure 12). Les différentes isoformes ont des effets divers dans la régulation cellulaire. L'utilisation de différentes approches telles que la surexpression des isoformes, des inhibiteurs spécifiques pour les différentes isoformes (Gö6976 pour les cPKCs, Rottlerin pour PKC θ et la Calphostin pour les nPKCs), l'expression des dominants négatifs, la délétion ciblée d'une isoforme spécifique ou l'introduction des peptides inhibiteurs qui interfèrent avec les interactions intramoléculaires ou intermoléculaires a permis de déterminer les mécanismes de régulation des PKCs. Il existe des phosphorylations qui se font de manière constitutive et non régulée par des stimuli externes et ne sont donc pas déterminantes de la spécificité de l'activité des isoformes. Le premier de ces événements de phosphorylation a lieu sur une thréonine conservée dans la boucle d'activation (Thr566); la phosphorylation sur ce site semble être essentielle pour l'activité de la plupart des isoformes.^{307,308} La kinase, PDK-1 a été identifiée comme étant la kinase responsable de la phosphorylation de la boucle d'activation de PKC.^{309,310} La phosphorylation sur les deux autres sites (hydrophobe et d'autophosphorylation) au niveau du CT contribue à la stabilité de la kinase.³¹¹ La

phosphorylation de ces sites rend la PKC catalytiquement compétente et résistante aux protéases et aux phosphatases. Toutefois, la PKC phosphorylée est encore dans une conformation inactive dans laquelle la poche de liaison au substrat est occupée par le domaine du pseudo-substrat. Dans le cytoplasme, Les PKCs se trouvent dans une conformation auto-inhibée. Les stimuli induisant la génération du DAG et du Ca^{2+} conduisent à l'activation des cPKCs et nPKCs par le biais d'un certain nombre d'étapes bien définies.^{311,312} Premièrement, la liaison du DAG au domaine C1 augmente l'affinité de la PKC à la membrane. Dans le cas des isoformes cPKCs qui sont également régulées par Ca^{2+} , il a été suggéré que le Ca^{2+} à son tour augmente l'affinité du domaine C1 pour le DAG. Ensuite, l'interaction avec les lipides membranaires fournit l'énergie nécessaire pour déloger le pseudo-substrat de la poche de liaison au substrat et permet ainsi d'activer la kinase. Une fois activé, la PKC peut alors se lier à ses substrats et les phosphoryler à la membrane. La translocation membranaire est souvent utilisée comme un signal d'activation pour la PKC, néanmoins, la PKC active peut être ciblé vers d'autres emplacements de la cellule. Le domaine régulateur NT de la PKC contient des sites de liaison à différentes protéines. L'interaction de PKC à ses substrats permettrait probablement le ciblage de la kinase activée vers des sites subcellulaires où se trouvent des substrats spécifiques comme les récepteurs pour kinase C active (RACK), ainsi que d'autres protéines interagissant avec PKC.^{313,314} Alors que les deux classes d'isoformes (classiques et nouvelles) dépendantes des lipides sont activées par la voie canonique, peu de choses sont connues sur l'activation de la troisième classe de PKC, les PKCs atypiques.

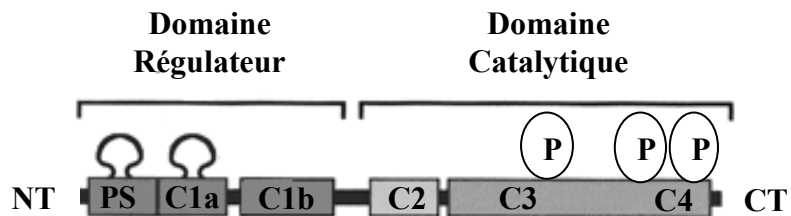


Figure 12: Structure des Protéines Kinases C Classiques. C1 et C2 sont les domaines de fixation respective de DAG et Ca^{2+} , C3 est le domaine de fixation du substrat, C4 est le domaine catalytique ou kinase contenant les sites de phosphorylation, PS est le domaine de liaison au pseudosubstrat. Figure modifiée.³¹⁵

1.7.2 Les PKCs atypiques (aPKC)

Cette classe des PKCs contient deux isoformes, soit: PKC ι et PKC ζ (Figure 13). Ces deux isoformes présentent une forte homologie structurale, mais jouent probablement différentes fonctions et ont différentes localisations cellulaires. En effet, malgré la grande homologie de séquence (72%) entre les deux isoformes, des études de ciblage génétique chez la souris ont révélé des rôles très spécifiques pour les deux isoformes *in vivo*. La déficience génétique de la PKC ι cause la létalité durant les premiers stades embryonnaires³¹⁶ tandis que les souris mutantes pour la PKC ζ sont viables mais présentent des défauts de signalisation dans la voie NF κ B et IL-4^{317,318} ainsi que des défauts dans le système immunitaire. Les aPKCs sont impliquées dans de nombreux processus biologiques tels que la prolifération³¹⁹, la survie, la migration^{320,321}, l'inflammation et la polarité cellulaire³²². Les aPKC ont été bien étudiées

principalement en tant que composantes du complexe de polarité Par (Par3-Par6-aPKC) qui a émergé récemment comme étant un régulateur essentiel de la polarité cellulaire dans différents organismes allant des nématodes jusqu'aux mammifères.³²³⁻³²⁶

La fonction d'une isoforme PKC spécifique peut varier entre différents types cellulaires, ce qui implique que la réponse cellulaire dépend aussi du partenaire moléculaire de PKC dans différentes voies de régulation et de signalisation cellulaire.

Les aPKC sont indépendantes des lipides pour leur activation et peuvent être régulées entre autre par les interactions protéine-protéine. La régulation des aPKCs se fait principalement via leur domaine régulateur C1 riche en cystéines. Plusieurs interactions protéine-protéine ont été identifiées pour les aPKCs. Les protéines Par-4 et Par6 se lient à aPKC via leur domaine PB1 (Phox/Bem1) alors que sa liaison avec p62/ZIP et Par3 se fait à travers le domaine kinase C-terminal.³²⁷⁻³³¹

Si le rôle d'aPKC ζ a été démontré dans la polarité cellulaire surtout dans les cellules épithéliales et astrocytes, son rôle dans la polarité des CE reste encore ambigu.

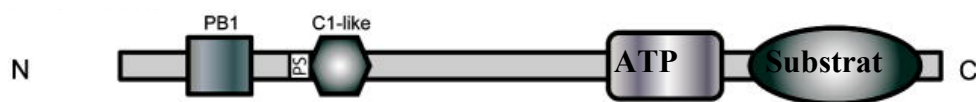


Figure 13: Structure de la Protéine Kinase C atypique avec les différents domaines de liaison aux protéines PB1, au PS (pseudo substrat), à l'ATP et au substrat, N (domaine N-terminal), C (domaine C-terminal). Figure modifiée.³¹⁵

1.8 Polarité cellulaire

La polarité cellulaire repose sur l'organisation asymétrique des structures et des composants cellulaires. Elle est cruciale à la fois pendant le développement et chez l'adulte, elle participe à des fonctions cellulaires telles que la division, la différenciation, la morphogenèse des organismes uni- et pluricellulaires, la migration cellulaire, la transmission polarisée synaptique neuronale et la préservation de la barrière épithéliale. Les cellules en migration ou les neurones en développement ont besoin d'établir une polarité définissant l'avant et l'arrière de la cellule. Cette polarité est établie avec un cytosquelette qui dirige les différentes extensions et protrusions membranaires au front de la migration mais aussi avec un trafic des composants moléculaires qui sont essentiels à l'extension de la membrane et l'adhésion cellulaire à l'avant de la cellule. Le maintien de la polarité cellulaire implique de nombreux processus qui doivent être coordonnés et de manière étroitement régulée. Au cours du développement, le processus fondamental de la polarisation cellulaire est établi très tôt et il est contrôlé par des protéines évolutivement conservées qui intègrent des repères de polarité intrinsèques et extrinsèques. Différentes voies de signalisation et complexes protéiques comprenant les RhoGTPases, les complexes de polarité (Par, Crumb et Scribble) et leurs effecteurs en aval y compris le cytosquelette, les voies de trafic vésiculaire d'endocytose et d'exocytose régulent ensemble la distribution asymétrique des différents joueurs moléculaires entre les différents domaines cellulaires (avant-arrière, apical-basal).

La polarité cellulaire a été extensivement étudiée au niveau des cellules épithéliales. Ces dernières ont un caractère distinctif de l'axe de polarité apico-basale pour le

transport des ions et des solutés à travers l'épithélium. En revanche, les cellules mésenchymateuses migratoires ont un axe avant-arrière de la polarité. Les mécanismes impliquant les différents joueurs moléculaires de la polarité cellulaire se conservent depuis les organismes inférieurs comme la levure jusqu'aux cellules de mammifères.³³²⁻³³⁵

La polarité endothéliale se distingue très tôt au cours du développement avec la surface apicale faisant face à l'intérieur vers la lumière vasculaire éventuelle et la surface basale ou basolatérale qui fait face à l'extérieur vers la MEC. Les CE s'orientent dans le plan du vaisseau (polarité cellulaire planaire) en réponse aux forces de cisaillement causées par le flux sanguin.³³⁶ Dans un réseau vasculaire en développement, au fur et à mesure que les CE se divisent, elles vont orienter leur fuseau de division de telle façon que le plan du clivage sera toujours perpendiculaire à l'axe du vaisseau sanguin afin de permettre la prolifération cellulaire le long de l'axe vasculaire.³³⁷ Par conséquent, on assiste à deux types de polarité dans les vaisseaux sanguins: une polarité apicale/basolatérale nécessaire pour la régulation de la transcytose et la formation de la lumière vasculaire et une polarité dans le plan du tube vasculaire appelée polarité planaire. Il est relativement difficile de localiser les complexes de polarité dans les domaines apical ou basolatérale des CE, en partie, parce que les deux domaines sont très proches et à la limite confondus. Dans une étude récente, les auteurs ont constaté que lors de la formation de l'aorte dorsale chez des embryons de souris, les marqueurs apicaux sont localisés à la face interne des CE avant la formation de la lumière vasculaire.³³⁸ Ils confirment aussi que les jonctions intercellulaires sont requises pour ce processus. Il a aussi été rapporté que la protéine

de polarité Par3 est importante pour le maintien de cette polarité endothéliale et la formation de la lumière vasculaire.³³⁹

Le défi des études dans ce domaine, en effervescence depuis les 10 dernières années, est de comprendre comment les différents effecteurs moléculaires régulent les processus de rupture de la symétrie cellulaire qui génère la polarité nécessaire pour exercer les différentes activités cellulaires. De nombreuses cellules deviennent polarisées en réponse à un signal spécifique, ce qui engendre une réorganisation du cytosquelette, une redistribution protéique au niveau de la membrane plasmique et même une réorientation de certaines organelles comme les centrosomes, les centrioles et l'appareil de Golgi. La polarité cellulaire est importante lors de la migration cellulaire dirigée où la polarisation avant-arrière est nécessaire à la morphologie asymétrique des cellules qui migrent en réponse à un signal extracellulaire ou intracellulaire. La régulation de ces processus est soumise à un contrôle spatio-temporel bien précis. Une polarisation cellulaire aberrante causée par des anomalies dans les complexes macromoléculaires de polarité conduit à une variété de maladies notamment le cancer. La polykystose rénale (PKD) où les kystes épithéliaux remplacent les tubules rénaux normaux est un exemple de maladie où la polarité est fortement affectée. L'architecture dans les tissus et les organes est formée lorsque les cellules épithéliales et les autres types cellulaires sont organisés en structures polarisées. La fonction, l'intégrité ainsi que la signalisation à travers ces tissus sont orchestrées par les complexes de jonctions dans le domaine apical en collaboration avec les complexes de polarité Par et Crumbs et dans le domaine latérale avec le complexe Scribble et les interactions dynamiques avec la membrane basale. De plus on

commence à découvrir que tous ces complexes de polarité sont intimement liés et régulent de concert, avec les jonctions cellulaires et les protéines composant le cytosquelette l'établissement d'une polarité cellulaire.

1.8.1 Les complexes de polarité cellulaire

Il existe trois complexes de polarité très conservés: Par (le partitionnement défectueux), Crumbs et Scribble qui contrôlent le processus de la polarisation cellulaire chez différents organismes. Les protéines de polarité ont été initialement étudiées chez la drosophile (*Drosophila melanogaster*) et le nématode (*Caenorhabditis elegans*), mais ils ont tous au moins un homologue chez les mammifères.

1.8.1.1 Le complexe Crumbs

Trois gènes Crumbs (Crb) apparentés sont maintenant répertoriés chez les mammifères. La protéine Crb2 ressemble fortement à Crb1, tandis que Crb3 se distingue par un domaine extracellulaire très court. Toutes les protéines Crumbs qui ont été identifiées ont un domaine cytoplasmique extrêmement bien conservé ce qui prouve l'importance de ce domaine dans la fonction de cette protéine.³⁴⁰ Crumbs se situe au centre d'un réseau d'interactions entre des molécules cytoplasmiques d'échafaudage PALS1 ((protéine associée à LIN-7)-1) et PATJ (PALS1 associé aux protéines des jonctions serrées) et des protéines directement liées au cytosquelette d'actine.³⁴¹ Chez la drosophile, Crb régule la polarité des cellules épithéliales et la morphogénèse des photorécepteurs. L'homologue de Crb3 chez les mammifères est principalement exprimé dans les cellules épithéliales et il est considéré comme un

déterminant du domaine apical de la cellule. La surexpression de Crb3 dans les cellules non polarisées induit la formation des jonctions serrées. PATJ est lié au complexe par le biais de Crb3 et les protéines des jonctions serrées des cellules épithéliales polarisées.³⁴²

1.8.1.2 Le complexe Scribble

Scribble est une protéine cytoplasmique qui interagit avec DLG (Discs large) et LGL1 (Lethal giant larvae). Ce complexe a été décrit pour la première fois chez *D. melanogaster*. L'expression des protéines mutantes de ce complexe dans les tissus épithéliaux cause une perte de leur morphologie polarisée. Les trois protéines sont impliquées dans la formation et la fonction des synapses neuronales. Chez les vertébrés, Scribble se lie directement à LGL1 et indirectement à DLG1. Les protéines du complexe Scribble sont considérées comme des suppresseurs de tumeurs chez la drosophile et les mammifères. Chez les cellules épithéliales polarisées de mammifères, les protéines du complexe Scribble ont une localisation basolatérale tandis que Crumbs et Par3 se localisent principalement aux jonctions serrées au niveau apicale. Les cellules épithéliales constituent le modèle par excellence pour l'étude des bases moléculaires qui contrôlent l'établissement et le maintien de la polarité. Des preuves génétiques et biochimiques au niveau des cellules épithéliales ont montré l'implication de différents complexes protéiques dans la formation et le maintien des jonctions serrées. Ces complexes de polarité sont constitués de protéines à domaine PDZ³⁴³ qui lient souvent, mais pas exclusivement, des protéines à leur extrémité C-terminale. Chez *D. melanogaster* Stardust (Sdt), l'homologue de PALS chez les mammifères, interagit

avec la protéine transmembranaire Crumb à travers son domaine PDZ.³⁴⁴⁻³⁴⁶ PALS1 lie aussi PATJ, une protéine à plusieurs domaines PDZ³⁴⁷ et ils forment ensemble un complexe subapical. Le site de colocalisation de ces protéines correspond au site d'initiation de la formation des jonctions serrées chez les organismes supérieurs.³⁴⁸ Des mutations au niveau de Crb ou de Sdt causent un défaut de polarité dans les cellules épithéliales de *D. melanogaster*.³⁴⁹ Il existe un troisième complexe de polarité composé de Par3, Par6, aPKC et Cdc42-GTP qui se trouve au niveau apical et colocalise avec Sdt et PALS1 dans les épithéliums de *D. melanogaster* et les mammifères respectivement.^{322,329,350}

1.8.1.3 Le complexe de polarité Par-aPKC

Le complexe Par3-Par6-aPKC est important pour déterminer la polarité de nombreux types cellulaires, notamment dans les neuroblastes de *D. melanogaster* et de *Caenorhabditis elegans* et dans les cellules épithéliales de mammifères.^{323,351,352} Le complexe de polarité Par est conservé au cours de l'évolution et ce, des nématodes jusqu'aux humains. Il régule la polarité apico-basale dans les cellules épithéliales et contrôle la division cellulaire asymétrique, la différenciation neuronale et la migration cellulaire.³³⁵

Les gènes de ce complexe ont été d'abord identifiés chez *C. elegans*. Deux de ces gènes codent pour deux protéines à domaine PDZ soit, Par3 et Par6 qui, avec la Ser/Thr kinase atypique aPKC, constituent le complexe de polarité Par. Par3 contient trois domaines PDZ, tandis que Par6 n'en contient qu'un seul.^{322,329,352} Par6 possède aussi un motif CRIB (Cdc42, Rac-interactive binding) qui permet l'interaction avec certains

membres de la famille des petites protéines G telles que Cdc42 et Rac.^{322,329,353} La liaison de Cdc42 à Par6 rend disponible le domaine NT de Par6 pour d'autres interactions. Par6 a la capacité d'activer aPKC, ce qui entraîne la phosphorylation du domaine CR3 de Par3 aussi connu comme ASIP (atypical PKC isotype-specific interacting protein) ou Bazooka.^{327,354} aPKC interagit donc avec Par3 via son domaine kinase et par son domaine régulateur avec Par6.³⁵¹ Par3, Par6 et aPKC sont exprimés de manière ubiquitaire et sont impliqués dans les différents processus de polarisation cellulaire (Figure 14). L'activité kinase d'aPKC est un événement clé dans la signalisation de la polarité cellulaire. Elle est nécessaire pour le fonctionnement du complexe Par et la phosphorylation des protéines cibles. La polarisation des cellules épithéliales a été identifiée par la localisation spécifique des structures telles que les jonctions serrées au domaine apical de la membrane cellulaire et certains complexes de polarité.³²⁴ Les composantes moléculaires du complexe Par-aPKC jouent un rôle dans la migration polarisée des cellules en réorientant leur centrosome ou leur appareil de Golgi tel que observé lors de la migration dirigée des astrocytes dans des essais de fermeture de plaie et lors de la migration des neurones.³⁵⁵⁻³⁵⁷

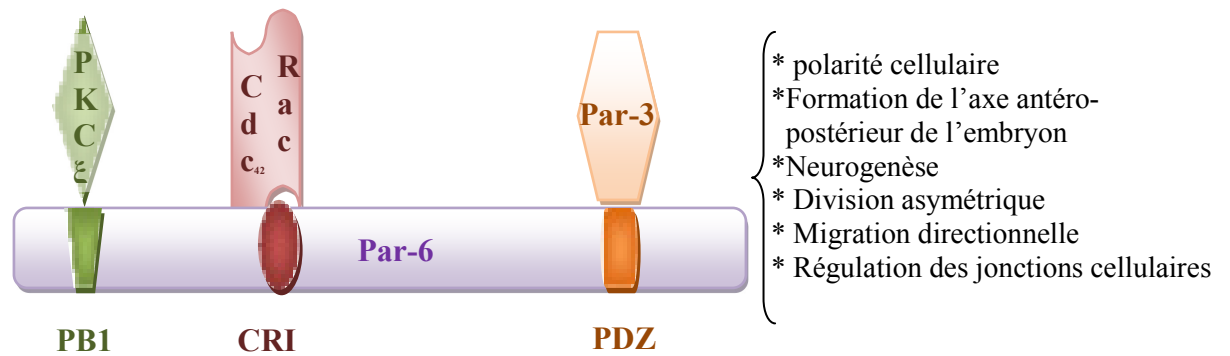


Figure 14: Le complexe de polarité Par (Par3-Par6-aPKC). Les interactions protéine-protéine, les différents domaines de liaisons (PB1 CRI, PDZ) et les différentes fonctions du complexe.

aPKC agit en contrôlant des événements locaux de signalisation dans plusieurs systèmes de migration cellulaire. Lors de l'activation des intégrines au front de migration des astrocytes, le complexe Par6-aPKC ζ s'active et une cascade de signalisation impliquant l'activation de la protéine Cdc42 conduit à un repositionnement du centrosome dans une région qui fait face au front de migration.³⁵⁷ Plus récemment, il a été constaté que dans les cellules NRK (cellules de rein de rat), l'aPKC est nécessaire pour la guérison des plaies. Dans ce contexte il été montré qu'elle interagit physiquement avec des complexes d'exocytose via la protéine d'échafaudage Kibra.³⁵⁸ Cette interaction est nécessaire pour la localisation d'aPKC avec le complexe d'exocytose au front de la migration des cellules où ils contrôlent l'activation locale d'autres protéines kinases additionnelles soit ERK et JNK (c-Jun N-terminal kinase) qui contrôlent la phosphorylation de la paxilline, composante des

adhésions focales. Plusieurs interactions moléculaires entre les trois complexes de polarité cellulaires ont été identifiées. L'exclusion mutuelle du complexe Scribble et du complexe des jonctions apicales contrôle la polarité apico-basale. La phosphorylation de Par1 et de LGL1 par aPKC³⁵⁹⁻³⁶¹ altère leur conformation, inhibant ainsi leur activité ce qui cause leur dissociation de la membrane apicale.³⁶² Cette régulation négative permet le maintien d'une distribution asymétrique des différents régulateurs et complexes de polarité.

Un défaut dans la régulation des protéines de polarité Par a été rapporté dans plusieurs types de cancers caractérisés par des cellules malignes qui perdent les connexions à la membrane basale et deviennent très prolifératives, mobiles et envahissantes.³⁶³⁻³⁶⁵

1.9 Migration cellulaire

La migration cellulaire est un processus essentiel pour plusieurs situations physiologiques et pathologiques tel que le développement embryonnaire, la dissémination tumorale et le processus métastatique. Elle contrôle la morphogénèse et l'inflammation et sa dérégulation cause un large éventail de maladies, y compris les syndromes auto-immuns, l'inflammation chronique et le cancer. Les études dans le domaine de la migration cellulaire commencent à définir comment la migration d'une cellule individuelle et celle des cellules en groupe est coordonnée et balisée et comment les cellules interagissent avec leurs cellules voisines et avec les changements de leur microenvironnement. Tous ces facteurs contrôlent la migration chez les organismes métazoaires qui peut prendre différentes formes et modes.

1.9.1 La migration cellulaire individuelle et collective

La morphologie cellulaire dépend du microenvironnement dans lequel les cellules migrent, de l'expression des molécules et des récepteurs d'adhésions à la surface cellulaire et finalement de leur signalisation intracellulaire. Les cellules peuvent être de petite taille et migrer rapidement comme les cellules du système immunitaire qui migrent du sang vers les tissus spécifiques. Les cellules de plus grosse taille vont migrer plus lentement car elles présentent des structures d'actine plus complexes avec des contacts d'adhérence focaux plus larges.

La migration individuelle peut être aléatoire (non dirigée) en absence de chemoattractant externe ou dirigée en sa présence. Dans ce dernier cas, le processus migratoire répond à toute l'architecture moléculaire établie pour la migration directionnelle (voir paragraphe suivant). La migration des cellules individuelles implique souvent une transition d'un état épithélial à mésenchymal (EMT) au cours de laquelle il y a un affaiblissement de l'adhésion entre les cellules.³⁶⁶ En revanche, de nombreux types cellulaires migrent en tant que groupes cohérents à la fois pendant le développement embryonnaire ou lors des processus métastatiques reliés au cancer. De plus, la voie empruntée par des cellules métastatiques (la lymphe ou le sang) et leur origine influence le type de migration cellulaire.³⁶⁷

La migration collective peut prendre plusieurs formes. En chaîne, les cellules sont liées physiquement entre elles en formant un train ou la cellule locomotive ou (leader) va guider la migration. Ce type de migration a été observé pendant la dissémination de différentes cellules tumorales durant les métastases et lors du bourgeonnement vasculaire au cours du développement. Pour se faire, les cellules coordonnent le

mouvement des couches multicellulaires en formant une rangée de cellules uniques au front migratoire. Ces cellules sont appelées, cellules locomotives et guident de multiples rangées cellulaires qui vont les suivre grâce à des liaisons très étroites les unes avec les autres. La migration collective des cellules dans les tissus caractérise de nombreux processus biologiques importants, tels que la cicatrisation des plaies, le développement de l'organisme et la dissémination des métastases durant le cancer. Des expériences récentes sur la cicatrisation des plaies montrent que le comportement collectif de la migration des cellules peut être assez complexe. La migration directionnelle collective des cellules est essentielle pour presque tous les organismes au cours du développement embryonnaire et dans la vie adulte et contribue aussi à des conditions pathologiques. Ce type de migration est essentiel lors de l'embryogenèse durant laquelle les cellules migrent vers un emplacement bien précis en vue de construire un embryon normal. De nombreuses cellules ont résolu ce problème en suivant un gradient de chemoattraction normalement sécrété par les tissus cibles. Récemment, un mécanisme alternatif a été proposé où des signaux intracellulaires sont capables de générer la polarité cellulaire et la migration directionnelle en absence de tout chemoattractant externe.^{368,369}

1.9.2 La migration dirigée ou directionnelle

Les cellules en migration sont guidées par les contacts cellule-cellule comme dans les cellules progénitrices neuronales qui migrent vers des couches spécifiques du cerveau en utilisant la glia radiale comme trajets de migration. La migration directionnelle soutenue (ou persistante) des cellules épithéliales est essentielle pour la régénération de

l'épithélium en cas de blessure. La migration directionnelle des cellules dépend de la mise en place d'une polarité avant-arrière stable.³⁷⁰ Ce type de migration est déterminé par l'activation locale d'un réseau de signalisation très complexe incluant les RTK, les RhoGTPases, les molécules d'adhésion et les complexes de polarité cellulaire. Les signaux extracellulaires provenant de l'environnement vont activer la petite GTPase Cdc42 conduisant à une cascade d'événements qui inclut l'assemblage des protéines des complexes de polarité, l'orientation stable du cytosquelette et le trafic membranaire dans la direction de la migration.³⁷¹⁻³⁷³ Dans les cellules épithéliales, la migration directionnelle est d'une importance particulière dans la fermeture des plaies où la migration dirigée des cellules au bord de la plaie est nécessaire pour une réparation tissulaire efficace.³⁶⁷ Le dérèglement de la migration directionnelle, peut contribuer aux métastases dans les tissus épithéliaux.^{367,374} Toutes ces formes de migration cellulaire requièrent la régulation spatio-temporelle d'une panoplie de protéines incluant des récepteurs membranaires, des kinases, des phosphatases, des molécules adaptatrices et des composantes de l'adhésion cellulaire et du cytosquelette. Les petites protéines G jouent un rôle important dans l'établissement et le maintien de cette architecture polarisée de la cellule en migration dans une grande variété de contextes cellulaires. Plusieurs études ont démontré la localisation restreinte et spécifique des RhoGTPases lors de la migration cellulaire dirigée.

1.9.3 Rôle du cytosquelette dans la migration cellulaire (RhoGTPase)

Les GTPases Rho sont une famille de protéines connues pour leur rôle dans la régulation du cytosquelette et la migration cellulaire.³⁷⁵⁻³⁷⁷ L'activité des RhoGTPases

peut être régulée soit positivement par des facteurs d'échange guanine nucléotide (GEFs) ou négativement par des protéine à activité GTPase (GAP).³³⁴ L'inhibition de Cdc42 ainsi que son activation constitutive perturbent l'orientation cellulaire.^{332,333,378,379} Ceci indique que l'activation des RhoGTPases doit être temporellement et spatialement limitée afin de promouvoir avec succès la polarisation cellulaire. Pendant la migration cellulaire dirigée, lors de la fermeture des plaies, le Cdc42 est recruté au front migratoire des cellules afin d'établir la polarité de la cellule en migration.^{333,380-382} Rac peut être activé par des signaux extracellulaires comme les RTK et les récepteurs couplés aux protéines G. Rac, ainsi que ses effecteurs en aval tels que PAK et les protéines WAVE, jouent un rôle clé dans la régulation de la polymérisation de l'actine et la promotion de la formation des lamellipodes au front des cellules en migration. En plus de son rôle dans la régulation du cytosquelette, Rac s'est révélé être un important joueur moléculaire au niveau des jonctions cellule-cellule³⁸³ et dans la modulation de la perméabilité cellulaire.³⁸⁴

1.10 Objectifs de la thèse

L'objectif général de cette thèse était d'étudier les mécanismes cellulaires et moléculaires, activés par l'Angiopoïétine-1 et le VEGF, qui régulent les jonctions d'adhérence cellulaires, la perméabilité et la migration endothéliale. Les deux objectifs spécifiques étaient:

Objectif 1: Le VEGF est une puissante cytokine angiogénique qui augmente la perméabilité vasculaire. Le NO libéré par les CE, après l'activation d'eNOS contribue aux effets proangiogéniques et de perméabilité induite par le VEGF. L'Ang-1 via sa

liaison au récepteur Tie2 sur les CE possède aussi des propriétés proangiogéniques comme le VEGF. Cependant, contrairement au VEGF, l'Ang-1 protège les vaisseaux sanguins de l'hyperperméabilité, ce qui contribue à leur stabilisation. Étant donné le rôle central de NO dans la perméabilité accrue en réponse au VEGF, nous voulions vérifier l'hypothèse selon laquelle l'Ang-1 inhibe la production de NO et contrecarre l'augmentation de la perméabilité transendothéliale induite par le VEGF. Nos objectifs étaient de:

- Vérifier si l'Ang-1 interfère avec la voie de signalisation du VEGF vers eNOS et la production de NO.
- Déterminer la voie de signalisation et le mécanisme moléculaire impliqué dans l'inhibition de la perméabilité endothéliale par l'Ang-1.

Objectif 2: Nous avons identifié PKC ζ comme un nouveau régulateur de la perméabilité endothéliale en aval d'Ang-1/Tie2. Étant donné l'appartenance de PKC ζ au complexe de polarité Par et son implication dans la migration cellulaire dirigée, nous voulions examiner l'hypothèse que la PKC ζ pourrait réguler la migration polarisée dans les CE en réponse à l'Ang-1. Afin de vérifier cette hypothèse, Il a fallu: Premièrement, identifier de nouveaux partenaires moléculaires associés à PKC ζ suite à une stimulation à l'Ang-1.

Deuxièmement, étudier le rôle fonctionnel de ces nouvelles associations avec la PKC ζ en aval de la voie de signalisation Ang-1/Tie2 dans la promotion de la migration cellulaire.

RÉSULTATS

CHAPITRE 2

Article 1: Phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase by atypical PKC ζ contributes to Angiopoietin-1–dependent inhibition of VEGF-induced endothelial permeability *in vitro*.

ACCORD DES COAUTEURS

1. Identification de l'étudiant et du programme

Malika Oubaha

Programme de Biologie Moléculaire

PhD Biologie Moléculaire

2. Description de l'article

Titre: Phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase by atypical PKC ζ contributes to Angiotensin-1-dependent inhibition of VEGF-induced endothelial permeability *in vitro*

Ordre des auteurs: Malika Oubaha and Jean-Philippe Gratton.

Blood. 2009 Oct 8;114(15):3343-51

État actuel de l'article: Publié

3. Déclaration de tous les coauteurs

A titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis en accord pour que Malika Oubaha inclus cet article dans sa thèse de doctorat qui a pour titre: Étude des mécanismes cellulaires activés par l'Angiotensine-1 et le VEGF régulant la perméabilité et la migration endothéliales.

Jean-Philippe Gratton

Coauteur

Signature

Date

CONTRIBUTION DES AUTEURS

J'ai réalisé toutes les expériences.

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

Jean-Philippe Gratton.

Phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase by atypical PKC ζ contributes to Angiopoietin-1-dependent inhibition of VEGF-induced endothelial permeability *in vitro*

Malika Oubaha and Jean-Philippe Gratton

Laboratory of Endothelial Cell Biology, Institut de recherches cliniques de Montréal (IRCM), Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada.

Correspondence: Jean-Philippe Gratton, IRCM, 110 des Pins Ave West, Montreal, QC, H2W 1R7, Canada

Running title: Inhibition of eNOS by Angiopoietin-1

Key words: VEGF, VEGFR-2, eNOS, nitric oxide, Tie2, Angiopoietin-1, endothelial permeability, protein kinase C ζ

Word count abstract: 200

Word count main text: 4927

Figures: 7

Supplemental Figures: 4

References: 48

ABSTRACT

Vascular endothelial growth factor (VEGF) is a potent angiogenic cytokine that also increases vascular permeability. Nitric oxide (NO) released from endothelial cells, following activation of endothelial NO synthase (eNOS), contributes to proangiogenic and permeability effects of VEGF. Angiopoietin-1 (Ang-1), via Tie2 receptors, shares many of the proangiogenic properties of VEGF on endothelial cells. However, in contrast to VEGF, Ang-1 protects blood vessels from increased plasma leakage which contributes to their stabilization. Since eNOS-derived NO is central to increased permeability in response to VEGF, we investigated if Ang-1 interferes with VEGF signaling to eNOS. We demonstrate that Ang-1 stimulation of endothelial cells inhibits VEGF-induced NO release and transendothelial permeability. In contrast to VEGF stimulation, Ang-1 causes a marked PKC-dependent increase in phosphorylation of eNOS on the inhibitory threonine 497. Furthermore, using pharmacological inhibitors, overexpression studies and siRNA-mediated gene silencing, we demonstrate that atypical PKC ζ is responsible for phosphorylation of eNOS on Thr497 in response to Ang-1. In addition, PKC ζ knockdown abrogates the capacity of Ang-1 to inhibit VEGF-induced NO release and endothelial permeability. Thus, inhibition of NO production by Ang-1, via phosphorylation of eNOS on Thr497 by PKC ζ is responsible, at least in part, for inhibition of VEGF-stimulated endothelial permeability by Ang-1.

INTRODUCTION

Nitric oxide (NO) produced by endothelial cells modulates many of the important proangiogenic properties of vascular endothelial growth factor (VEGF). Indeed, NO released from endothelial cells in response to VEGF stimulation, via activation of VEGF receptor-2 (VEGFR-2), is an essential regulator of post-natal angiogenesis. Direct support for the role of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in increased blood vessel permeability in response to VEGF was provided by the fact that eNOS deficient mice display reduced albumin extravasation following subdermal VEGF administration.¹³⁸ Similarly, blood vessels of tumors implanted onto eNOS deficient mice are less leaky than vessels from tumors on wild type animals.³⁰ Following VEGFR-2 activation, eNOS activity is increased by PI3-kinase-dependent activation of AKT which results in phosphorylation of eNOS on serine 1177 (1179 in bovine eNOS) and leads to increased eNOS activity and NO release.^{124,130,385} Simultaneously, dephosphorylation of threonine 497 (Thr497) of bovine eNOS is thought to release the inhibitory modulation afforded by basal phosphorylation of this residue.^{285,386,387} PKC activity, possibly through PKC α ,³⁸⁸ is thought to be responsible for basal phosphorylation of the Thr497 residue and therefore maintains eNOS in a less active state. However, it has also been suggested that the PKC isoforms α , δ and ϵ are upstream of Akt activation and eNOS phosphorylation on Ser1177.³⁸⁹ Together, these post-translational modifications contribute significantly to the positive and negative regulation of eNOS activity and consequently to NO release from endothelial cells following exposure to VEGF.

Angiopoietin-1 (Ang-1), through activation of the tyrosine kinase receptor Tie2, is also proangiogenic and leads to the stabilization of blood vessels which is associated with decreased vascular permeability.^{200,203,390,391} Interestingly, Ang-1 and VEGF play separate but essential roles in embryogenesis: VEGF acts early in vascular development by contributing to the formation of the initial vascular plexus, whereas Ang-1 acts during the subsequent remodeling of the vasculature into a hierarchical network of mature vessels.³⁹² Consistent with their established roles in angiogenesis, VEGF and Ang-1 share common signaling pathways that lead to survival, proliferation and migration of endothelial cells but play antagonistic roles in the regulation of endothelial permeability.^{192,202,234,393}

The cellular mechanisms by which Ang-1 counteracts increased transendothelial permeability stimulated by VEGF are still being defined. In the present study, we identify a clear relationship between inhibition of NO release by Ang-1 and inhibition of in vitro endothelial permeability stimulated by VEGF. We delineate a specific molecular mechanism in which atypical PKC ζ is required downstream of Tie2 to phosphorylate eNOS on Thr497 which inactivates the enzyme, abrogates NO production and inhibits endothelial permeability stimulated by VEGF.

METHODS

Cell culture

Bovine aortic endothelial cells (BAEC) and bovine lung microvascular endothelial cells (BLMVEC), obtained from VEC Technologies (Rensselaer, NY), were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (HyClone, Logan, UT), 2.0 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin. COS-7 cells were cultured in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum (Invitrogen), 2.0 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin.

Reagents and antibodies

Recombinant Human VEGF-A (VEGF herein) was obtained from the BRB Preclinical Repository of the NCI-Frederick Cancer Research and Development Center and recombinant human Ang-1 from R&D systems, were used for cell stimulation throughout this study. PKC inhibitors; Bisindolylmaleide I; Gö6976 ; myristoylated PKC ζ pseudosubstrate inhibitor were from Calbiochem (San Diego, Ca). FITC-labeled dextran (molecular weight: 40,000 Da) was from Invitrogen. The NOS inhibitor, *N*_ω-Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride (L-NAME) and Phorbol 12-Myristate 13-acetate (PMA) were from Sigma–Aldrich. The primary antibodies used were: anti-VEGFR-2 (mAb), anti-Tie2 (pAb), anti-PKC ζ (mAb) from Santa Cruz Biotechnology, anti-eNOS (mAb) from BD Transduction Lab. Anti-p-Tyr⁷⁸³-PLC γ 1(pAb), PLC γ 1 (pAb), p-p44/42-Erk (Thr²⁰²/ Tyr²⁰⁴) (mAb), p44/42-Erk (Thr²⁰²/ Tyr²⁰⁴) (pAb), p-

Ser⁴⁷³-Akt (pAb), Akt (pAb), p-Thr⁴⁹⁷-eNOS (pAb), p-Ser¹¹⁷⁹-eNOS (pAb), pan-p-Ser⁶⁶⁰-PKC β 2 (pAb), p-Thr⁴¹⁰- PKC ζ (pAb), PKC α (pAb and PKC ζ (pAb) were all from Cell Signaling and anti-phosphotyrosine (4G10) was from Upstate Biotech.

Plasmids and transfections

Plasmids coding for bovine eNOS (in pcDNA3), human VEGFR-2 (in pRK7) and human Tie2 (in pcDNA3) used in this study were described elsewhere.^{394,395} Flag-PKC ζ and kinase-dead PKC ζ (in pCMV5) were generously provided by Dr. Michel Cayouette (IRCM, Montreal, QC, Canada). Kinase-dead K855A-Tie2 was generated by site-directed mutagenesis (Stratagene) using the following forward primers: 5'-CGGATGGATGCTGCCATCGCAAGAATGAAAGAATATGCCTCC-3'. Bovine T497A and S1179D-eNOS expression plasmids were generously provided by Dr. William C. Sessa (Yale University School of Medicine, New Haven, CT, USA). T497A/S1179D-eNOS was generated using S1179D-eNOS as template and the following forward primer: 5'-GCATCACCAGGAAGAAGCCCTTTAAGGAAGTGGCC-3'. All constructs were sequenced to confirm the presence of the mutations. COS-7 cells, BLMVEC and BAEC were transfected using Lipofectamine 2000 according to manufacturer's protocol (Invitrogen).

Immunoprecipitations and immunoblotting

For immunoprecipitations, cells were solubilized with a lysis buffer containing 1% NP-40, 0.1% SDS, 0.1% Deoxycholic acid, 50 mM Tris (pH 7.4), 0.1 mM EDTA, 0.1 mM

EGTA, 20 mM sodium fluoride, 1 mM sodium pyrophosphate and 1 mM sodium orthovanadate. Soluble proteins were incubated with primary antibodies (2 μ g) at 4°C for 2 hours. Protein A-Sepharose (Sigma) (50 μ l of a 50% slurry) was added and incubated for an additional hour. The immune complexes were precipitated by centrifugation, washed 3 times with lysis buffer, boiled in SDS sample buffer, separated by SDS-PAGE, transferred onto a nitrocellulose membrane (Hybond ECL, Amersham) and western blotted. Antibody detection was performed by a chemiluminescence-based detection system (ECL, Amersham) or by a LI-COR Odyssey infrared imaging system (LI-COR Biosciences) using Alexa 680 and Alexa 800 labeled secondary antibodies (Invitrogen).

Nitric oxide release

Cell media was processed for the measurement of nitrite (NO_2^-), the stable breakdown product of NO in aqueous solution, by NO-specific chemiluminescence using a NO analyzer (NOA 280i, GE Ionics Instruments).³⁹⁶ For the measurement of accumulated NO production from transfected COS-7 cells, culture medium were collected 48 h post-transfection and proteins removed by ethanol precipitation. Agonist stimulated-NO production from BAEC and BLMVEC was performed on serum-starved cells (6 h), 48 h post-transfection. The media was processed for measurement of nitrite levels 30 min following stimulation.

Endothelial permeability assay

Permeability across endothelial cell monolayers was measured using type I collagen-

coated transwell units (6.5-mm diameter, 3.0- μ m-pore-size polycarbonate filter; Corning Costar Corporation). BAEC or BLMVEC cells were plated 48 h post transfection at a density of 10^5 cells per well and were cultured for 3 to 4 days until the formation of a tight monolayer. Cells were serum starved for 1 h in DMEM containing 1% bovine serum albumin (BSA) prior to pretreatment with NOS inhibitors (30 min). VEGF (40 ng/ml) and/or Ang-1 (100ng/ml) were added to the upper chambers in presence of 1 mg/ml of FITC-labeled dextran (molecular weight: 40 kDa). Endothelial permeability was measured by collecting 50 μ l of sample from the lower compartment which was diluted with 300 μ l of phosphate-buffered saline (PBS) and measured for fluorescence at 520 nm when excited at 492 nm with a Wallac Victor ³V spectrophotometer (Perkins Elmer).

Immunofluorescence

BAEC were cultured on 0.1% gelatin-coated cover slips. Serum-starved cells were stimulated for 15 min with Ang-1 (100ng/ml). Cells were then washed briefly with cold PBS and fixed for 15 min in PBS containing 3.5% paraformaldehyde. Cells were rinsed with PBS and permeabilized with 0.3% Triton in PBS for 5 min. Fixed cells were blocked with 1% BSA and then incubated for 1 h with the primary antibodies in 0.1% BSA in PBS (mouse anti-eNOS at 1:200 and rabbit anti-p-Thr⁴⁹⁷-eNOS at 1:100). Bound primary antibodies were visualized following 1 h of incubation using Alexa Fluor 488-labeled goat anti-rabbit (1:100) and Alexa Fluor 568-labeled goat anti-mouse (1:100) (Molecular Probes). Mounted cover slips were observed using a Zeiss LSM 510 imaging system.

siRNA-mediated gene silencing of PKC ζ

PKC ζ -siRNA as well as a nonsilencing control siRNA were obtained from Santa Cruz Biotechnology. The working concentration of siRNA duplexes applied was 35 μ M. BLMVEC and BAEC were transfected with PKC ζ -siRNA or nonspecific control siRNA by using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Transfected cells were starved in serum-free medium (6 h) 48 h post-transfections and then exposed to the indicated concentrations of Ang-1, VEGF or both.

Statistical Analysis

Values are reported as mean \pm SEM. Data were analyzed by ANOVA followed by Bonferroni's *post hoc* test. P value less than 0.05 was considered as statistically significant.

RESULTS

Angiopietin-1 prevents VEGF-induced endothelial permeability and NO release from endothelial cells.

Stimulation of NO production by endothelial cells has been implicated in the induction of vascular permeability by VEGF.¹³⁸ Because Ang-1 has been shown to inhibit vascular permeability stimulated by VEGF, we verified the possibility that Ang-1 decreases VEGF-induced endothelial permeability via inhibition of NO production. First, we show that the ability of VEGF to increase passage of FITC-labeled dextran (Mw: 40 KDa) across a monolayer of bovine aortic endothelial cells (BAEC) is completely blocked when cells are co-stimulated with Ang-1 (Figure 1A). Similarly, pre-treatment of the BAEC monolayer with a NOS inhibitor, L-NAME, abolished the increase in endothelial permeability in response to VEGF (Figure 1A). To determine if inhibition of VEGF-stimulated endothelial permeability by Ang-1 could result from an interference with NO production, we monitored the effect of Ang-1 on VEGF-stimulated NO release from BAEC. Similar to its effects on endothelial permeability, Ang-1 failed to induce NO production and, more importantly, inhibited NO production stimulated by VEGF (Figure 1B). These effects of Ang-1 on VEGF-induced endothelial permeability and NO release were also observed in cultured bovine lung microvascular endothelial cells (BLMVEC) (Figure S1). Taken together, these results demonstrate that Ang-1 may interfere with VEGFR-2-stimulated NO release from endothelial cells and suggest that this may contribute to the inhibition by Ang-1 of endothelial permeability stimulated by VEGF.

Ang-1 activates protein kinase C independently of PLC γ .

To decipher the molecular mechanisms underlying the inhibitory effect of Ang-1 against VEGF-induced NO production and vascular permeability, we examined if VEGFR-2 activation by VEGF is altered by co-stimulation with Ang-1. Stimulation of endothelial cells with Ang-1, which caused tyrosine phosphorylation of Tie2 (Figure S2, bottom panel), did not affect the capacity of VEGF to induce auto-phosphorylation of VEGFR-2 (Figures 2A and S2, top panels). Reciprocally, VEGF stimulation did not interfere with induction of Tie2 phosphorylation by Ang-1 (Figures 2A and S2, bottom panels). These results suggest that Ang-1 acts downstream of VEGFR-2 activation to modulate VEGF-stimulated NO production and transendothelial permeability.

To determine VEGF-dependent signaling pathways that are affected by Ang-1, we investigated if stimulation of BAEC with Ang-1 altered the ability of VEGF to activate Akt and MAPK pathways. VEGF or Ang-1 stimulation of BAEC both induced phosphorylation of Akt and Erk1/2. Simultaneous treatment of cells with VEGF and Ang-1 did not alter the kinetics of phosphorylation of both signaling pathways (Figure 2B). Next, we examined the effect of Ang-1 stimulation on phospholipase C γ (PLC γ) activation and show, as previously described, that Ang-1 stimulation fails to induce PLC γ phosphorylation²⁴⁶. Furthermore, Ang-1 treatment of BAEC did not interfere with the capacity of VEGF to induce PLC γ phosphorylation (Figure 2B). These results are inline with previous reports showing that Ang-1, in contrast to VEGF, is unable to induce intracellular calcium mobilization in endothelial cells.²⁴⁶ Lastly, protein kinase C (PKC) activation was monitored using a pan phospho-PKC antibody that recognizes

the activated status of classical and novel PKC isoforms (pan phospho-PKC β II-Ser⁶⁶⁰). Both VEGF and Ang-1 stimulation of BAEC markedly increased the phosphorylation levels of PKCs with Ang-1 displaying more rapid activation kinetics. Interestingly, VEGF treatment in combination with Ang-1 also induced PKC phosphorylation with kinetics identical to Ang-1 stimulation alone. Since Ang-1 activates PKCs independently of PLC γ , this suggests that classical PKC isoforms, which are dependent on mobilization of intracellular calcium for their activation, are not implicated.

Phosphorylation of eNOS on Thr497 is required for eNOS inhibition by Tie2.

It is well established that PKC activity inhibits eNOS via phosphorylation of Thr497,^{386,397} thus we examined the possibility that phosphorylation of eNOS by PKCs contributes to its inhibition by Ang-1. We first monitored phosphorylation of eNOS on Ser1179 and Thr497 residues in response to Ang-1 or VEGF stimulation. In agreement with the reported reciprocal regulation of eNOS activity by coordinated dephosphorylation of Thr497 and phosphorylation of Ser1179,^{386,397} stimulation of BAEC with VEGF caused a rapid decrease in Thr497 phosphorylation levels which coincides with a marked increase in phosphorylation of Ser1179 of eNOS (Figures 3A-B). In contrast to VEGF, Ang-1 stimulation caused a rapid and marked increase in Thr497 phosphorylation of eNOS (Figures 3A-B). Interestingly, co-treatment of BAEC with VEGF and Ang-1 resulted in a significant increase in phosphorylation levels of Thr497. The co-stimulation completely abolished the dephosphorylation of Thr497 observed with VEGF stimulation alone. In contrast, Ser1179 phosphorylation was not significantly different for each of the agonists used alone (Figure 3B). To confirm the

involvement of Tie2 in these Ang-1-mediated effects, we overexpressed Tie2 alone or in combination with VEGFR-2 in COS-7 cells and monitored phosphorylation levels of eNOS on Thr497 (Figure 3C). Similarly to stimulation of BAEC with VEGF, VEGFR-2 expression decreased the levels of eNOS phosphorylation on Thr497. In contrast, Tie2 overexpression, alone or in combination with VEGFR-2, significantly increased levels of Thr497 phosphorylation indicating that Tie2 activity counteracts the effects of VEGFR-2 on the Thr497 residue of eNOS.

To investigate if Thr497 phosphorylation in response to Ang-1 is localized intracellularly where eNOS has been shown to be activated, the Golgi and plasma membrane,³⁹⁸ we examined the cellular localization of p-Thr⁴⁹⁷-eNOS (green) and eNOS (red) by immunofluorescence confocal microscopy in sparse or confluent BAEC. Figure 3D shows that, in control unstimulated conditions, phospho-specific eNOS antibody showed a relatively uniform staining throughout the cell. Following Ang-1 stimulation for 15 min, p-Thr⁴⁹⁷-eNOS staining in BAEC is markedly increased at the plasma membrane and perinuclear level, where it colocalizes in part with eNOS staining (red). No staining was observed when cells were incubated with secondary antibodies alone (data not shown).

To verify that Tie2-mediated Thr497 phosphorylation of eNOS results in inhibition of NO release, we measured NO release from COS-7 cells transfected with eNOS in presence of VEGFR-2 and/or Tie2 (Figure 4A; left panels). Expression of VEGFR-2 led to a marked increase in eNOS-derived NO production from transfected cells. Similarly to the stimulation of BAEC with VEGF and Ang-1, co-expression of Tie2

with VEGFR-2 resulted in a complete inhibition of eNOS activity and NO production (Figure 4A; left panels). In a separate set of experiments, we confirmed that kinase activity of Tie2 is important for this inhibitory effect. COS-7 cells were again co-transfected with VEGFR-2 and wild type Tie2 or a kinase dead Tie2 construct (lysine 855 substituted for alanine; K855A-Tie2) (Figure 4A; right panels). In contrast to wild type Tie2, the inactive mutant K855A-Tie2 was unable to inhibit NO production stimulated by VEGFR-2 (Figure 4A; right panels).

In order to confirm the obligatory role for Thr497 phosphorylation in the inhibitory effects of Tie2, we performed similar experiments in COS-7 cells co-transfected with eNOS constructs that are not phosphorylatable at the Thr497 position (T497A-eNOS) along with Tie2 and/or VEGFR-2 and monitored NO production (Figure 4B). In contrast to cells expressing wild type eNOS (Figure 4A), Tie2 failed to inhibit NO production when co-transfected with VEGFR-2 in T497A-eNOS expressing cells (Figure 4B). Similarly, in a separate set of experiments the inhibitory effects of Tie2 on VEGFR-2-induced NO release were not observed when both receptors were co-transfected with eNOS constructs that are phosphomimetic at the Akt phosphorylation site Ser1179 and not phosphorylatable at Thr497 (T497A/S1179D-eNOS) (Figure 4C). These data strongly suggest that phosphorylation of eNOS at the Thr497 position following Tie2 activation can potentially block endothelial production of NO stimulated by VEGFR-2.

PKC ζ is required for phosphorylation of eNOS on Thr497 in response to Ang-1.

Our data demonstrate that Tie2 activation results in eNOS inhibition via phosphorylation of the putative PKC inhibitory phosphorylation site, Thr497, and suggest that activation of PKCs by Ang-1 is accomplished independently of intracellular calcium mobilization. To demonstrate the implication of PKCs in Ang-1 signaling to eNOS, we treated BAEC with Bisindolylmaleide I (Bis I), a wide spectrum PKC inhibitor, and monitored phosphorylation on Thr497 in response to Ang-1 stimulation (Figure 5A). Bis I pretreatment of cells significantly reduced Ang-1-induced phosphorylation of eNOS on Thr497 confirming that PKC activity is necessary for Thr497 phosphorylation in response to Ang-1 (Figure 5A). In contrast, pretreatment with a specific inhibitor of classical (calcium-dependent) PKC isozymes, Gö6976 did not prevent Ang-1-stimulated phosphorylation of Thr497 of eNOS (Figure 5B). This confirms that calcium-dependent classical PKCs are not involved in this phosphorylation event induced by Ang-1. Next, we attempted to further determine the PKC isoform responsible for Thr497 phosphorylation in response to Ang-1. BAEC and BLMVEC (data not shown) were treated with PMA for 24 hrs in order to downregulate all diacyl-glycerol dependent novel and classical isoforms of PKC. As expected, PMA treatment drastically reduced the expression levels of PKC α (classical) and PKC δ (novel) without affecting levels of PKC ζ (atypical) (Figure 5C). Interestingly, despite the absence of classical and novel isoforms, Ang-1 still induced a significant increase in Thr497 phosphorylation. This indicates that atypical PKC may be involved. Interestingly, when BAEC were pretreated with a cell-permeable myristoylated PKC ζ pseudo-substrate inhibitor, Ang-1-induced phosphorylation on Thr497 of eNOS was

significantly reduced (Figure 5D). In parallel to eNOS phosphorylation on Thr497, Ang-1 stimulation does induce PKC ζ phosphorylation on Thr410, which is inhibited by the pseudo-substrate inhibitor (Figure 5D). To verify if PKC ζ could induce phosphorylation of eNOS on Thr497, we transiently expressed a Flag tagged PKC ζ construct (Flag-PKC ζ) in BAEC and monitored Thr497 phosphorylation levels. Indeed, cells that overexpress PKC ζ display a marked increase in Thr497 and PKC ζ phosphorylation levels (Figure 6A). Interestingly, phosphorylation on Ser1179 was also increased in cells overexpressing PKC ζ . However, VEGF-stimulated NO release was significantly inhibited in cells overexpressing PKC ζ demonstrating that eNOS activation was prevented by PKC ζ -mediated phosphorylation of Thr497 which seems to prevail over the activating phosphorylation on Ser1179 (Figure 6B). Finally, to highlight the specific requirement of PKC ζ kinase activity in these effects, we overexpressed a kinase-dead PKC ζ construct in BAEC which did not affect the basal phosphorylation levels of eNOS but markedly inhibited Ang-1-stimulated phosphorylation of eNOS on Thr497 (Figure S3).

Next, we downregulated PKC ζ expression by siRNA in order to confirm its role in Ang-1-induced phosphorylation on Thr497. Transfection of siRNA against PKC ζ in BAEC (Figure 7A) and in BLMVEC (Figure S4A) resulted in a reduction of PKC ζ expression levels of more than 50% without affecting the expression of PKC α and δ . Downregulation of PKC ζ markedly reduced Ang-1-stimulated phosphorylation of eNOS on Thr497 in BAEC (Figure 7A) and in BLMVEC (Figure S4A). Finally, to establish a direct link between PKC ζ activation by Ang-1 and, inhibition of NO production and of transendothelial permeability, we determined if knockdown of PKC ζ

by siRNA could interfere with the inhibitory effects of Ang-1. Gene silencing of PKC ζ in BAEC (Figure 7B) and BLMVEC (Figure S4B) eliminated the counteracting effects of Ang-1 on VEGF-induced NO production (Figure 7B) without affecting VEGF-stimulated NO release (Figure 7B and S4B). Similarly, knockdown of PKC ζ abolished the inhibitory effects of Ang-1 on VEGF-stimulated endothelial permeability in BAEC (Figure 7C) and BLMVEC (Figure S4C). These results suggest that PKC ζ activity is responsible for the inhibitory effects of Ang-1 on VEGF-induced endothelial permeability via inhibition of NO release from endothelial cells.

DISCUSSION

It is well established that VEGF and Ang-1 share many functional properties that contribute to the induction of angiogenesis and vasculogenesis.^{89,200,240} However, in contrast to VEGF, Ang-1 enhances vascular maturation and stabilization and acts as an anti-inflammatory agent by modifying endothelial cell adhesion molecules and cell-to-cell junctions.^{192,399} Ang-1 is also known to maintain the integrity of the endothelial barrier against a variety of inflammatory challenges and to protect the vasculature from vascular leakage.^{203,243,390}

In this study, we aimed at understanding how Ang-1 inhibits endothelial permeability induced by VEGF. Our results show that Ang-1 not only fails to increase endothelial permeability but also inhibits VEGF-induced permeability. Interestingly, pharmacological inhibition of eNOS with L-NAME completely abolished VEGF-stimulated passage of FITC-labeled dextran across a monolayer of endothelial cells (Figure 1). This confirms that eNOS and NO contribute to increased endothelial permeability stimulated by VEGF.^{138,400,401} Our results also provide evidences that Ang-1 interferes with VEGFR-2-stimulated NO release from endothelial cells and that this effect is mediated by Tie2 (Figure 4A). Overall, this suggests that acute blockade of NO production by Ang-1 may contribute to the inhibition of endothelial permeability (Figure 1). Ang-1 induces proliferation, migration, and survival of endothelial cells.^{234,393,402} However, the effects of Ang-1 on eNOS activity remain controversial. Our study supports previous findings showing that short-term Ang-1 stimulation of endothelial cells is incapable of inducing NO-dependent increase of

intracellular cGMP levels.⁴⁰³ Others have reported that some of the proangiogenic effects of Ang-1 are dependent on NO and that long-term stimulation of endothelial cells does result in a modest, in comparison to VEGF, but significant increase in NO production.⁴⁰⁴⁻⁴⁰⁶ It is important to note that in these latter studies the angiopoietins used were engineered Ang-1/Ang-2 chimeras and this may explain some of the differences observed. In addition, we have exposed BAEC to Ang-1 concentrations of up to 500 ng/ml for 24 hr without detecting any significant increase in NO levels (results not shown). Nonetheless, we cannot exclude the possibility that some of the *in vivo* proangiogenic effects of Ang-1 are dependent on eNOS and NO. However, these effects could result from a direct action of Ang-1 at the eNOS gene expression level rather than an acute activation of signaling pathways leading to eNOS activation and NO production.^{233,407} Interestingly, many studies, including ours, do show that Ang-1 does induce phosphorylation of eNOS on Ser1179 and that it is also a potent activator of Akt in endothelial cells.⁴⁰³⁻⁴⁰⁵ To explain the inability of Ang-1 to induce NO release, we examined the phosphorylation levels of the inhibitory Thr497 residue of eNOS. In contrast to VEGF, Ang-1 induces phosphorylation on Thr497, which contributes to eNOS inhibition regardless of the fact that Ang-1 also induces phosphorylation on Ser1179. This underscores the importance of a coordinated dephosphorylation of Thr497 and phosphorylation of Ser1179 for optimal eNOS activation. The consequence of Thr497 phosphorylation on eNOS activity has been previously revealed by the phosphomimetic mutation of Thr497 on eNOS to Asp which generates a form of eNOS markedly less active than WT when challenged with agonists that are also capable of inducing phosphorylation on Ser1179.⁴⁰⁸ Our results

confirm that increased phosphorylation on Thr497 in response to Ang-1 results in a less active eNOS even though Ang-1 also induces phosphorylation on Ser1179. Thus, the observed increase in phosphorylation of eNOS at Thr497 following Tie2 activation by Ang-1 (Figure 3) explains the potent antagonistic effect of Ang-1 on VEGF-stimulated NO production. Furthermore, the mutation of Thr497 to alanine on eNOS proves that Thr497 phosphorylation is required for inhibition of NO production by Tie2. Indeed, in contrast to expression of WT-eNOS, NO release from VEGFR-2-stimulated T497A-eNOS expressing cells is not inhibited by co-expression of Tie2, confirming the necessity of Thr497 phosphorylation for inhibition of NO release by Tie2 activation (Figure 4). Moreover, the dual mutation T497A/S1179D on eNOS also reveals that phosphorylation on Thr497 is essential for the inhibitory effects of Tie2 even in the context of a phosphomimetic mutation at the 1179 position. Interestingly, the double mutant still retains, to some extent, the capacity to be further activated by VEGFR-2. This indicates that cellular mechanisms other than phosphorylation by Akt, possibly intracellular calcium mobilization or changes in protein-protein interactions, are also involved for maximal activation of eNOS by VEGFR-2.^{124,409-413}

Our results also indicate that protein kinase C activity plays an important role in the signaling axis that leads to the modulation of eNOS activity by Ang-1. Interestingly, Ang-1 stimulation does not activate PLC γ , which confirms previous findings demonstrating that Ang-1 cannot elicit an increase in intracellular calcium.²⁴⁶ This also suggests that activation of PKCs in response to Ang-1 is achieved in a calcium-independent manner. Thus, the increase in eNOS phosphorylation levels on the putative inhibitory PKC site, Thr497, following Ang-1 stimulation is most probably

dependent on activity of calcium-independent PKC isozymes. Moreover, Gö6976, a specific inhibitor of calcium-dependent classical PKCs, did not inhibit Thr497 phosphorylation of eNOS by Ang-1 (Figure 5). Importantly, Ang-1 stimulation still induced phosphorylation on Thr497 in cells where classical and novel PKC isozymes were downregulated by a prolonged exposure of cells to PMA. This allowed us to suggest that atypical PKCs might be involved in this effect of Ang-1. Finally, by combining experiments using cell permeable peptide inhibitors (Figure 5), overexpression studies (Figure 6) and siRNA mediated gene silencing (Figure 7), we identified atypical PKC ζ as being important for Ang-1-mediated Thr497 phosphorylation. Importantly, inhibition of PKC ζ expression abrogates the capacity of Ang-1 to interfere with VEGF-induced NO production and to increase endothelial permeability in vitro. Our results do not exclude the participation of the other atypical PKC isoform, PKC ζ/ι in Ang-1 signaling, however, we demonstrate that activation of PKC ζ by Ang-1 seems to restrain NO production and may explain the protective effects of Ang-1 against eNOS-dependent increases in vascular permeability. Interestingly, when PKC ζ is overexpressed in endothelial cells, VEGF-stimulated NO release is inhibited similar to a co-stimulation of cells with VEGF and Ang-1 (Figure 6). Also, we demonstrate for the first time that Ang-1 stimulation induces the phosphorylation of endogenous PKC ζ in endothelial cells (Figure 5D). It has previously been shown that thrombin-mediated endothelial permeability is prevented by dominant-negative PKC ζ .⁴¹⁴ Our results show that PKC ζ opposes VEGF-stimulated NO release and endothelial permeability in vitro. It is an interesting possibility that PKC ζ acts both as a positive or negative modulator of endothelial permeability

depending on the factor involved. Nonetheless, Ang-1 stimulation induces phosphorylation and activation of PKC ζ in endothelial cells and the full consequences of these remains to be investigated. Interestingly, atypical PKCs have been associated with the formation of tight junctions in polarized epithelial cells^{327,352} The implication of atypical PKC ζ in the stabilization of the endothelium in ways that don't involve NO is also very plausible and warrants more investigation.

The protective effects of Ang-1 against vascular leakage have been well documented. It also remains clear that multiple independent or interconnected signaling pathways are involved in these effects. For example, it has been elegantly demonstrated that Ang-1 inhibits vascular permeability through the sequestration of Src kinase via mDia resulting in altered VEGF signaling at cell-to-cell junctions.¹⁹² Also, c-Src has recently been shown to positively regulate Akt and eNOS activity in response to VEGF.⁴¹¹ However, our results show that Ang-1 does not influence VEGF-induced Akt and eNOS phosphorylation on Ser1179. This suggests that the inhibition of Src may act in parallel to the inhibition of eNOS for the blockade of endothelial permeability by Ang-1. In addition, it has also been shown that disruption of endothelial cell junctional complexes by VEGF is impaired by Ang-1 and that PKC ζ inhibition blocks VEGF-mediated dissociation of β -catenin from VE-cadherin.³⁹⁹ Others have shown that the antipermeability effects of Ang-1 are due to the altered ability of VEGF to increase Ca²⁺ influx through TRPC1 channels in presence of Ang-1.²⁴⁶ Finally, it has been suggested that Ang-1 stimulation activates p190 RhoGAP which results in RhoA inhibition and in stabilization of the endothelial monolayer.²⁰² Our study now adds a

new layer of regulation to this process by demonstrating that Ang-1 inhibits endothelial permeability by preventing the release of an essential modulator of vascular permeability *in vitro* and *in vivo*, nitric oxide. Overall, this demonstrates that multiple and essential signaling pathways do converge to provoke the stabilization of the endothelium. It remains to be shown if some of these signaling pathways are specifically solicited *in vivo* in certain physiological or pathological conditions.

In summary, we provide herein the first evidence that inhibition of endothelial permeability by Ang-1 results, at least in part, from the inhibition of NO release in response to VEGF and that this is due to the phosphorylation of eNOS on the inhibitory Thr497 site by PKC ζ .

2.6 ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Chantal Delisle for expert technical support and Daniela Baggio for secretarial assistance. This work was supported by grants (MOP-86464 and MOP-53295) from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) to J.P.G. M.O. was a recipient of a studentship from the CIHR funded Training Program in Cancer Research at IRCM. J.P.G. holds a Tier 2 Canada Research Chair.

2.7 Contributions: M.O. performed research, analyzed data and wrote the paper; J.P.G. designed research, analyzed data and wrote the paper.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Ang-1 stimulation counteracts VEGF-induced transendothelial permeability and NO production. (A) Transendothelial permeability was determined by measuring the passage of FITC-dextran through a monolayer of BAEC. Passage of FITC-dextran was measured following exposure of BAEC to VEGF, Ang-1, or VEGF and Ang-1 in combination (at the indicated concentrations). In some cases, cells were pre-treated with the NOS inhibitor, L-NAME, as indicated. The data represent permeability to FITC-dextran expressed as the mean fold increases \pm SEM with respect to untreated cells. (B) NO released in the culture media of BAEC subjected to 30 min stimulation with Ang-1 (100 ng/ml), VEGF (40 ng/ml) or both. Samples of culture media were taken for nitrite quantification as described under "Methods". Data are the average \pm SEM of at least 4 experiments. * $P < 0.05$.

Figure 2. Ang-1 activates PKC independently of PLC γ but does not inhibit VEGFR-2 activation and signaling. (A) BAEC were stimulated with VEGF (40 ng/ml), Ang-1 (100 ng/ml) or both simultaneously for the indicated times. VEGFR-2 and Tie2 tyrosine phosphorylation levels were monitored in VEGFR-2 and Tie2 immunoprecipitates (IP). Equal immunoprecipitation levels from BAEC lysates were confirmed by western blot (wb). Figure S2 shows the complementary treatments and immunoprecipitates. These experiments were repeated at least 3 times with identical results. (B) Activation of AKT, MAPK, PKC and PLC γ , using the indicated phospho-specific antibodies, was monitored in BAEC stimulated with Ang-1 (100 ng/ml), VEGF (40 ng/ml) or both simultaneously for the indicated times. Equal protein loading

was confirmed by reprobing the membranes with antibodies against total Akt, MAPK and PLC γ . These experiments were repeated at least 3 times with similar results.

Figure 3. Ang-1 induces phosphorylation of eNOS on the inhibitory Thr497 site.

(A) BAEC were stimulated with Ang-1 (100ng/ml), VEGF (40ng/ml) or both simultaneously for the indicated times. Cell lysates were probed for eNOS phosphorylation on Thr497 and Ser1179 using phospho-specific antibodies. Equal protein loading was confirmed by western blotting for total eNOS. (B) Densitometric ratio of results presented in A of p-Thr⁴⁹⁷-eNOS (right panel), or p-Ser¹¹⁷⁹-eNOS (left panel) levels relative to total eNOS. Data were normalized with respect to control unstimulated cells. Bar graph represents the average of 5 experiments expressed as mean \pm SEM; * P<0.05. (C) Tie2 counteracts the effects of VEGFR-2 on Thr497 residue of eNOS. Phosphorylation levels of eNOS on Thr497 were monitored in COS-7 cells transfected with eNOS plasmids in combination with expression vectors coding for VEGFR-2, Tie2 or both. Total cell lysates were analyzed for p-Thr⁴⁹⁷-eNOS and total eNOS. Bar graph shows the p-Thr⁴⁹⁷/total eNOS densitometric ratio expressed as mean \pm SEM of 4 independent experiments; * P<0.05 compared to phosphorylation levels of eNOS expressed with VEGFR-2. (D) Cellular localization of p-Thr⁴⁹⁷-eNOS in sparse (upper panels) or confluent (lower panels) BAEC following Ang-1 stimulation. BAEC were cultured on 0.1% gelatin-coated cover slips. Serum-starved cells were either untreated or treated with 100 ng/ml Ang-1 for 15 min. Cells were fixed, permeabilized, and incubated with anti-p-Thr⁴⁹⁷-eNOS (pAb) (*green*) and anti-eNOS (*red*) primary antibodies. Immunofluorescent staining was performed as

described under "Methods" and observed by confocal microscopy (63X objective).

Figure 4. Phosphorylation of eNOS on Thr497 is required for inhibition of NO production by Tie2. (A) The effect of Tie2 on NO production stimulated by VEGFR-2 was measured in transfected COS-7 cells. Cells were co-transfected with expression vectors coding for eNOS in combination with VEGFR-2 and wild type Tie2 (left panels) or in separate sets of experiments the kinase-dead K855A-Tie2 constructs (right panel). Levels of NO released in the media following transfection were measured as in 1B. Expression levels of the transfected proteins were monitored by western blotting (wb) (lower panels). The inactivity of K855A-Tie2, in contrast to WT-Tie2 was determined by anti-phospho-tyrosine western blotting of Tie2 immunoprecipitates (IP) (inset; left panel). NO released from COS-7 cells transfected with expression vectors coding for (B) T497A-eNOS single mutant or (C) T497A/S1179D-eNOS double mutant in combination with VEGFR-2, Tie2 or both, was measured by chemiluminescence as described above. Equal transfection levels were monitored by western blotting (wb) using anti-VEGFR-2, anti-Tie2 and anti-eNOS antibodies. Data are the average \pm SEM of at least 4 experiments * $P < 0.05$.

Figure 5. Inhibition of PKC ζ prevents phosphorylation of eNOS on Thr497. (A) BAEC were pre-treated with PKC inhibitors, (A) Bisindolylmalmeide I (Bis I; 0.5 μ M) or (B) Gö6976 (0.5 μ M) for 30 min prior to Ang-1 (100ng/ml) stimulation for the indicated times. Cell lysates were probed for eNOS phosphorylation on Thr497 using phospho-specific antibodies. Equal protein loading was confirmed by western blotting

for total eNOS. Inhibition of PKC activity was confirmed by western blotting using anti-pan-p-Ser⁶⁶⁰-PKC β 2 antibodies. (C) BAEC were treated for 24h with Phorbol 12-Myristate 13-acetate (PMA; 5 μ M) to downregulate classical and novel PKC isozymes. Cells were then stimulated with Ang-1 (100ng/ml) for the indicated times. Membranes were probed with anti-p-Thr⁴⁹⁷eNOS antibodies. Equal protein loading was confirmed by western blotting for total eNOS. Cellular levels of PKC isozymes PKC activity was confirmed by western blotting using anti-PKC α -PKC ζ and -PKC ζ antibodies. (D) BAEC were treated with a myristoylated PKC ζ pseudosubstrate inhibitor (Myr-PKC ζ -PS; 10 μ M, 30 min) and stimulated for the indicated times with Ang-1 (100 ng/ml). Total cells lysates were analyzed for p-Thr⁴⁹⁷-eNOS and p-Thr^{410/403}-PKC ζ levels. Equal protein loading was confirmed by blotting for total eNOS and PKC ζ . These experiments were repeated at least 3 times with similar results.

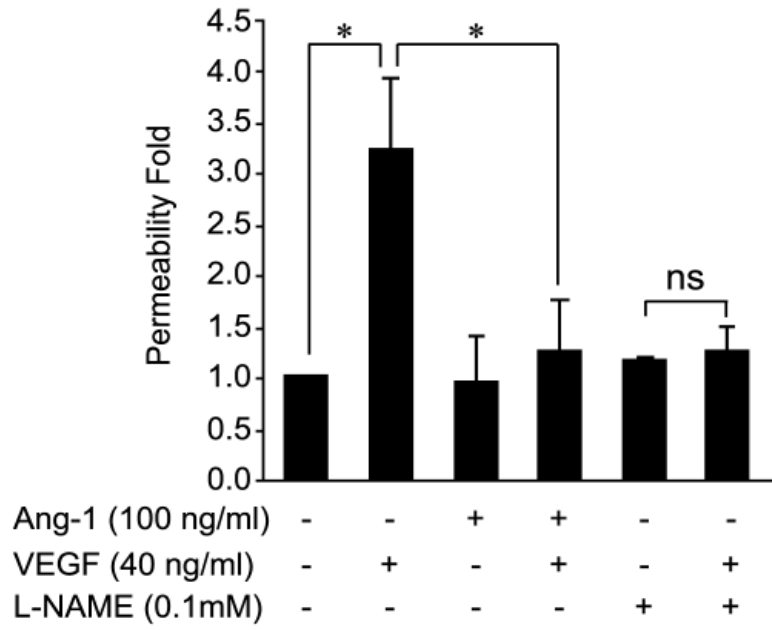
Figure 6. Overexpression of PKC ζ counteracts VEGF-induced NO production (A)

BAEC were transfected with an empty vector or with a Flag-PKC ζ expression vector and total cells lysates were analyzed for p-Thr⁴⁹⁷-eNOS, p-Ser¹¹⁷⁹-eNOS, p-Thr^{410/403}-PKC ζ . Transfection efficacy was verified using anti-Flag antibodies. Total eNOS and total PKC ζ levels were monitored to confirm equal protein loading and overexpression, respectively. (B) BAEC were transfected with an empty vector or with a Flag-PKC ζ expression vector. Serum starved cells were stimulated with VEGF (40 ng/ml; filled bars) for 30 min. Samples of culture media were taken for nitrite quantification as described under "Methods". Transfection efficacy was verified using anti-Flag antibodies. Total eNOS and total PKC ζ levels were monitored to confirm equal protein

loading and overexpression, respectively (lower panels).

Figure 7. PKC ζ knockdown reverses the inhibition by Ang-1 of eNOS, NO release and of endothelial permeability. (A) BAEC were transfected with siRNA targeted against PKC ζ or with control siRNA. 48h following transfections, cells were starved for 6 hours before Ang-1 stimulation (100ng/ml) for the indicated times. Membranes were probed with antibodies against p-Thr⁴⁹⁷-eNOS and eNOS. PKC ζ knockdown was confirmed by western blotting (wb). Cellular levels of PKC α and PKC ζ were not affected by PKC ζ -siRNA. (B) BAEC were transfected with PKC ζ -siRNA (35uM; filled bars) or control siRNA (35uM; open bars). 48h post-transfection cells were starved for 6 hours before stimulation with VEGF (40ng/ml), Ang-1 (100ng/ml), or both for 30 min. Samples of culture media were taken for the quantification of NO released as described under "Methods". PKC ζ knockdown was confirmed by western blotting and eNOS protein levels were monitored to confirm equal protein loading (inset). (C) Permeability to FITC-dextran was determined in confluent BAEC monolayers transfected with PKC ζ -siRNA (35uM; filled bars) or control siRNA (35uM; open bars) before stimulation with VEGF (40ng/ml), Ang-1 (100ng/ml), or both for 30 min. Data represent permeability to FITC-dextran expressed as the mean fold increase \pm SEM with respect to untreated cells. PKC ζ knockdown was confirmed by western blotting and eNOS protein levels were monitored to confirm equal protein loading (inset). * P<0.05.

A



B

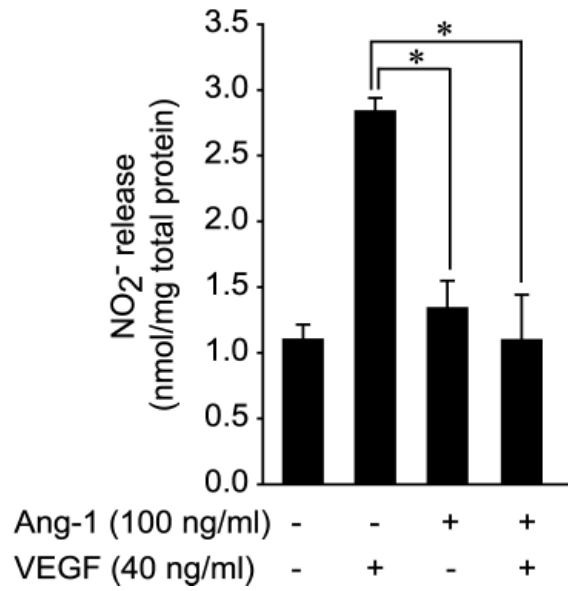
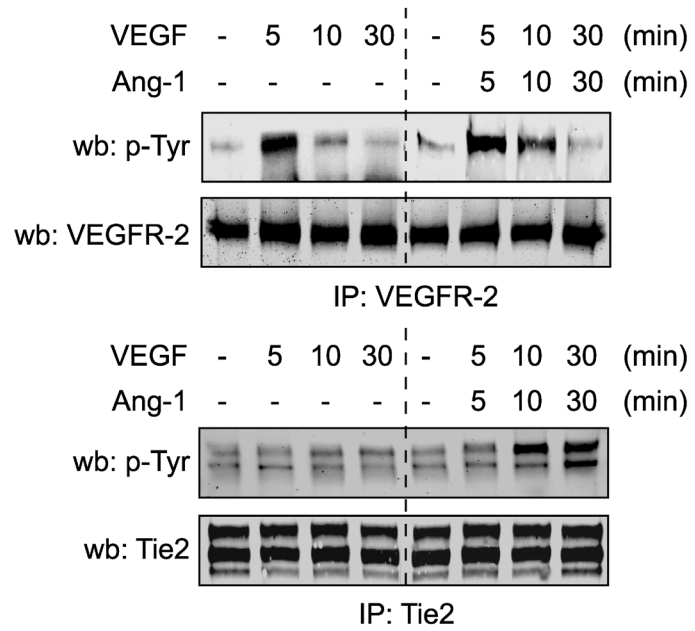


Figure 1

A



B

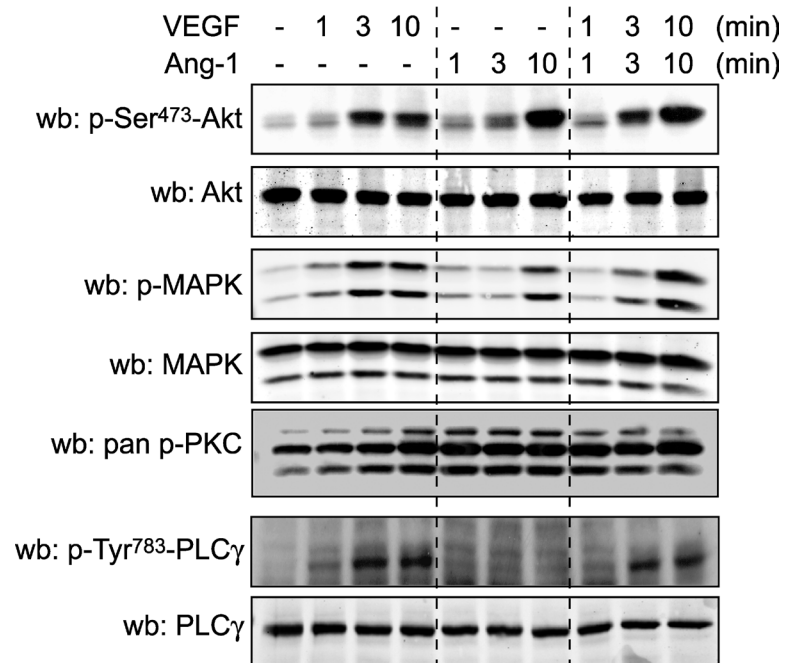


Figure 2

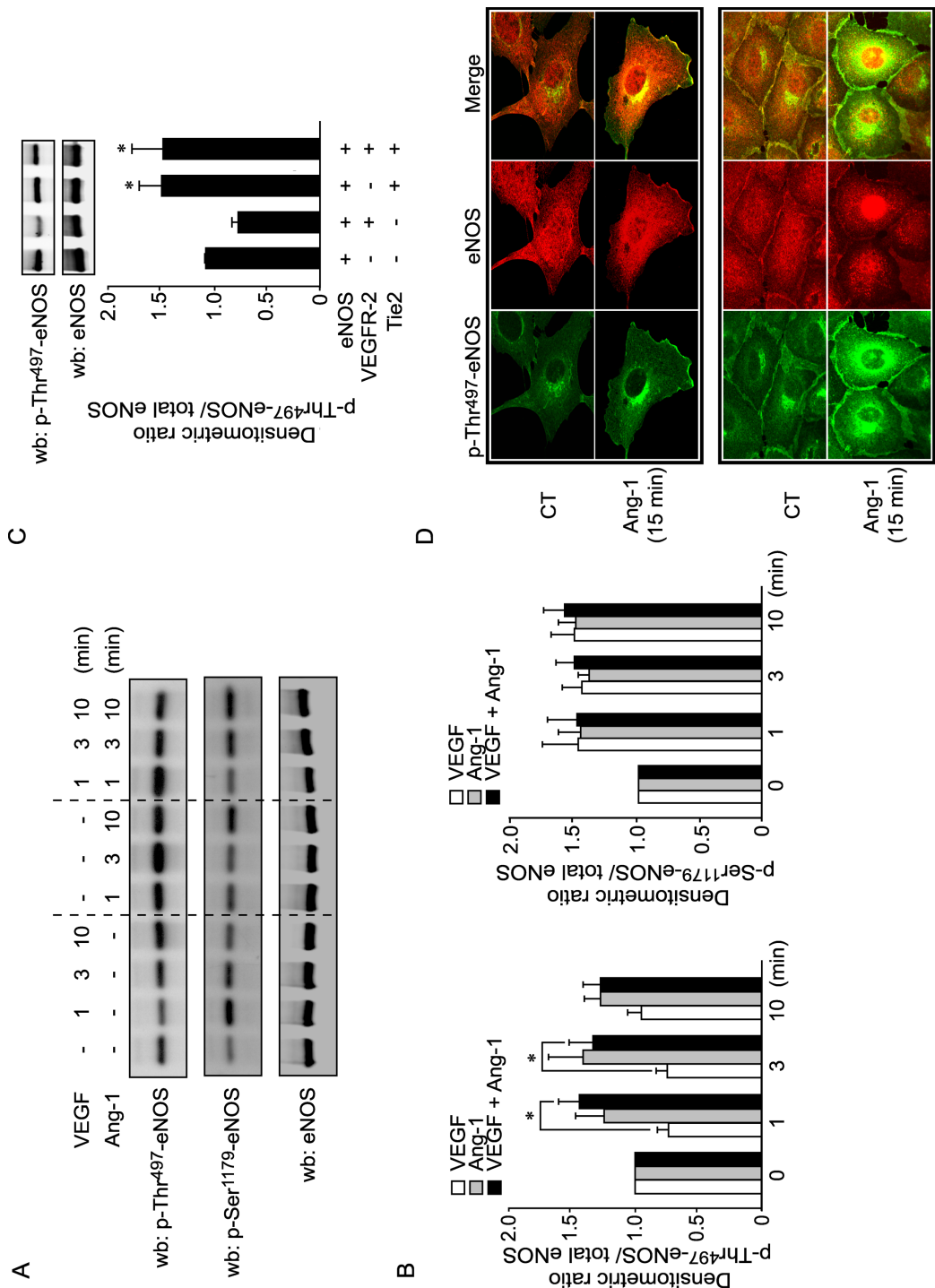


Figure 3

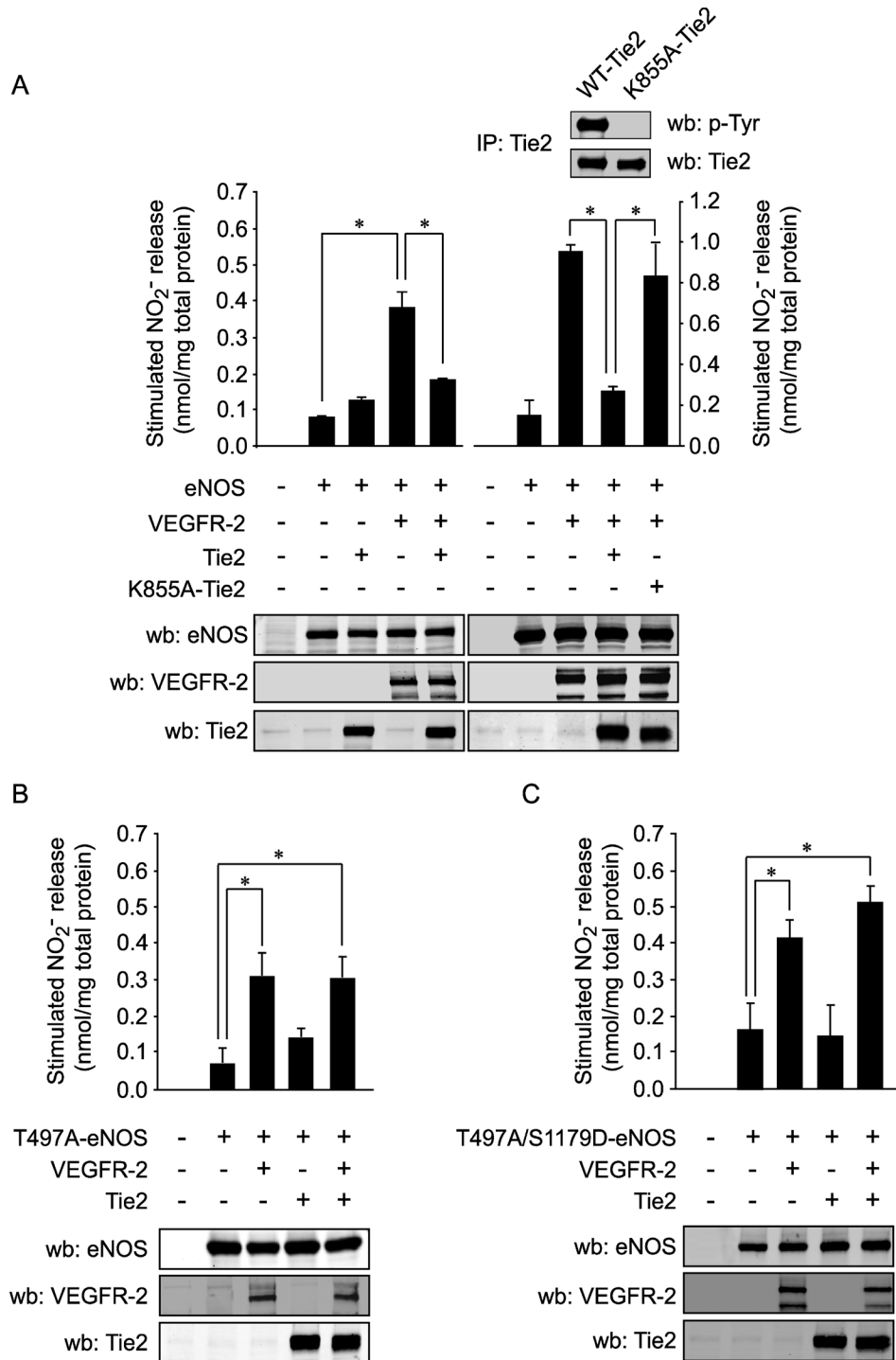


Figure 4

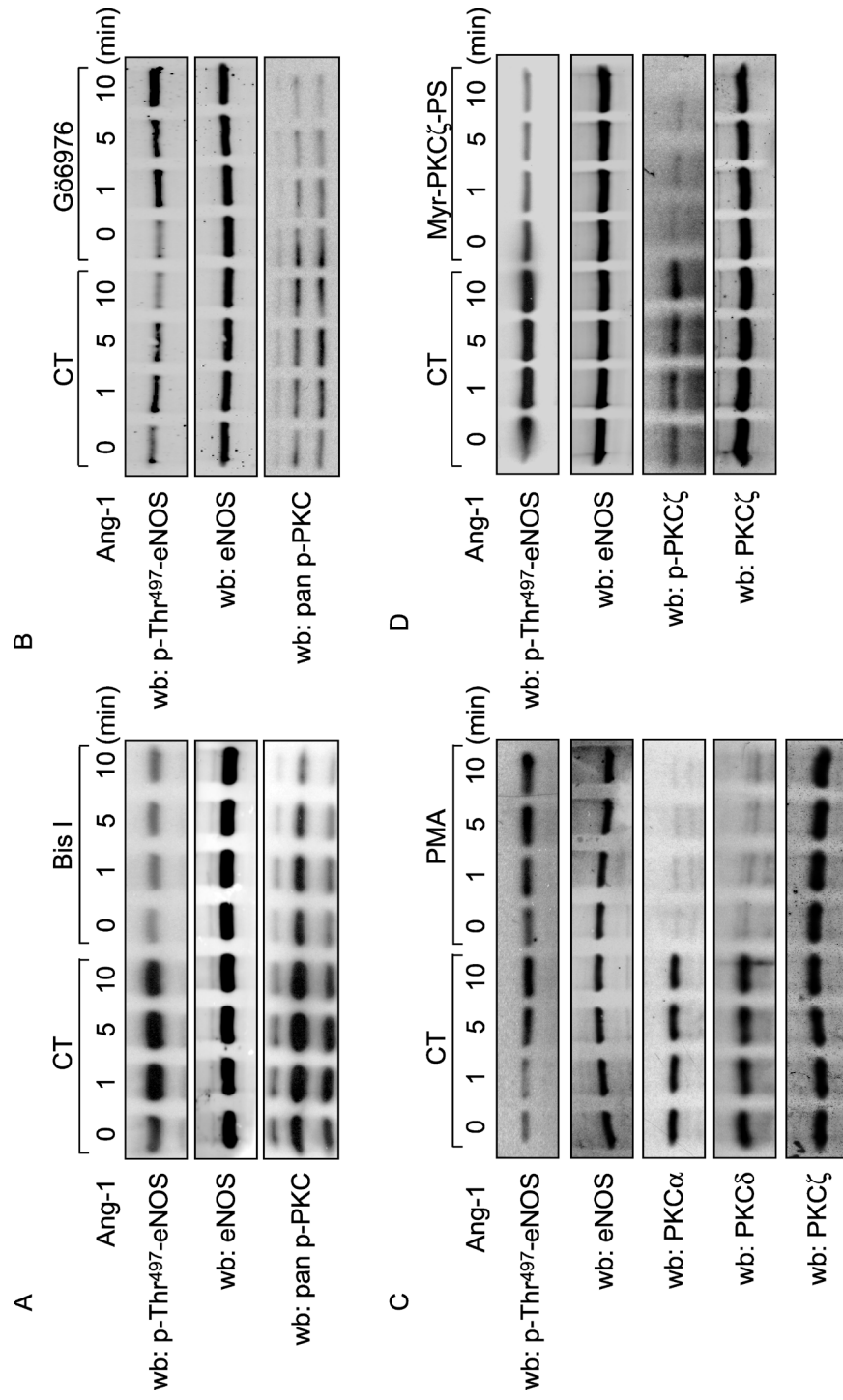


Figure 5

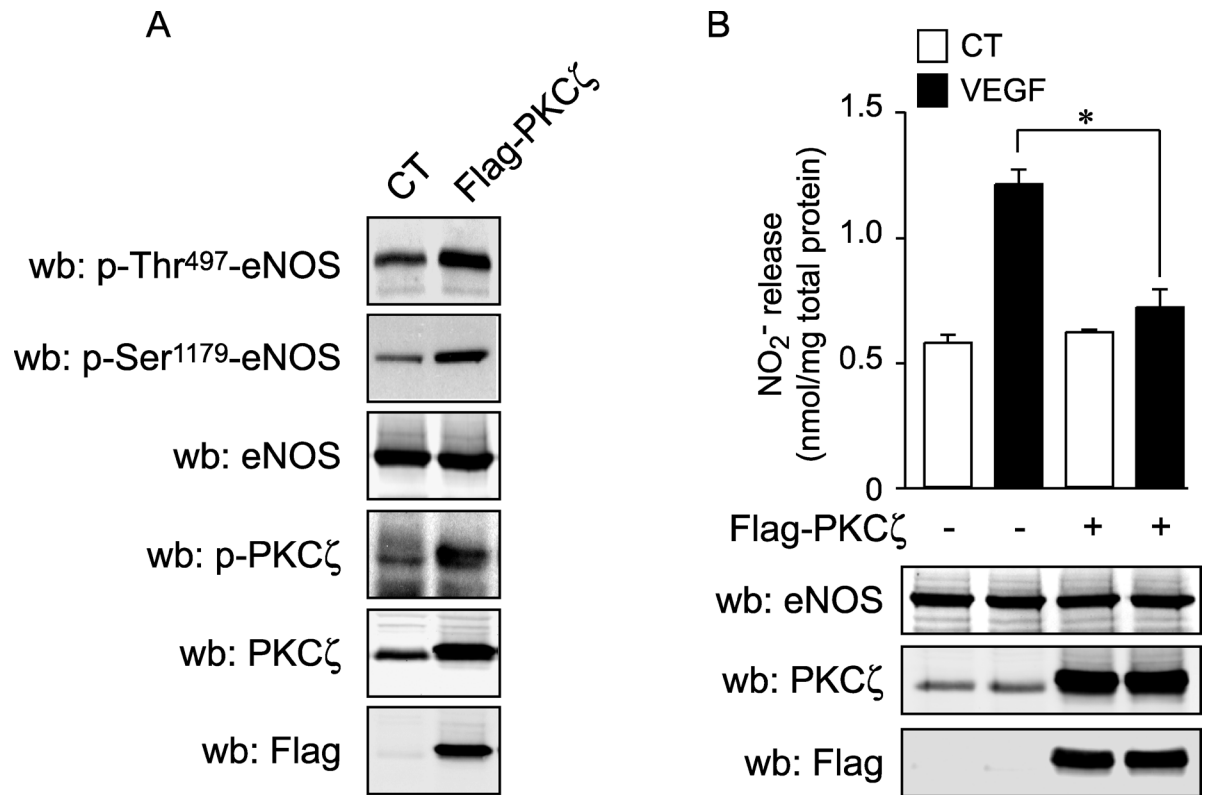


Figure 6

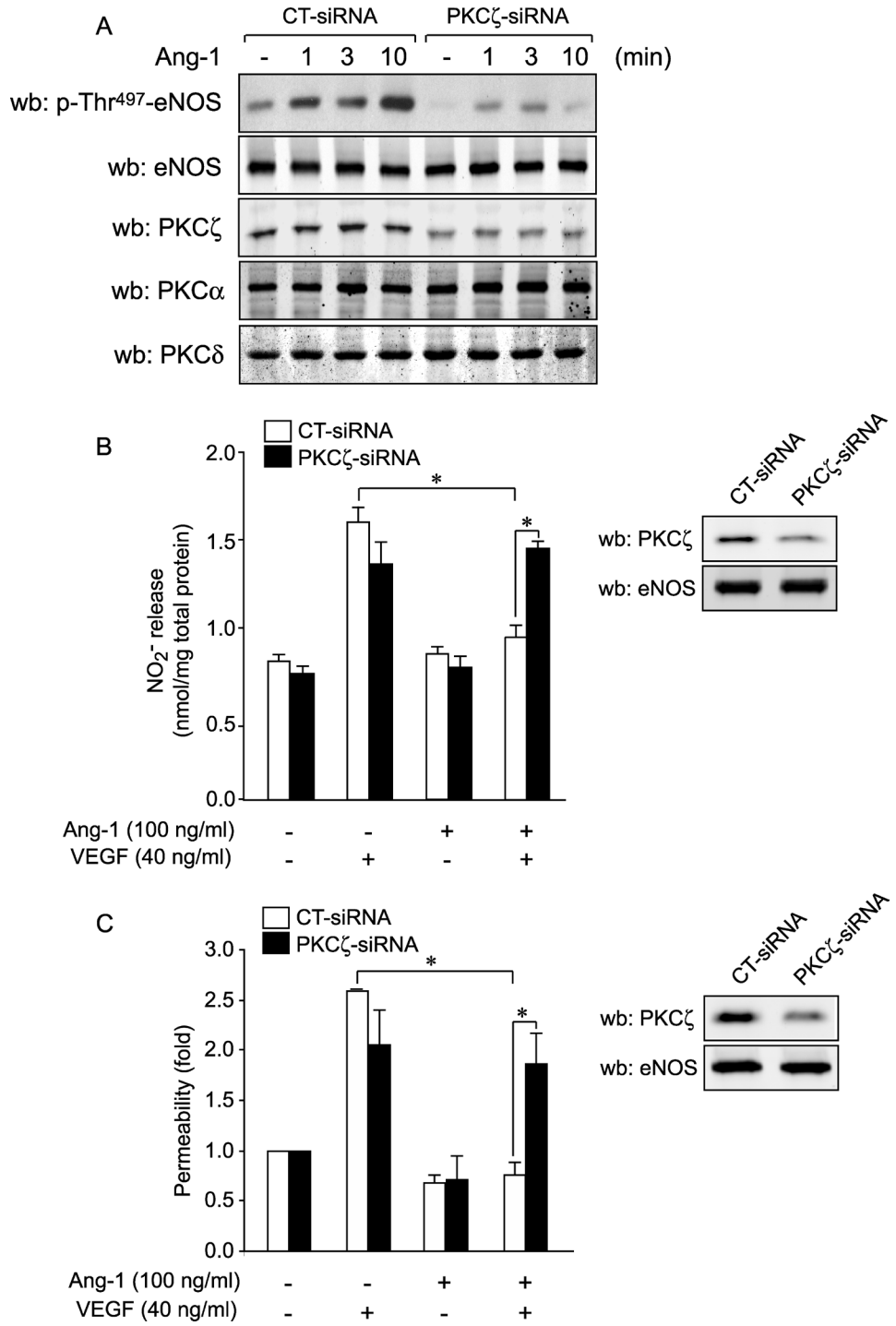


Figure 7

SUPPLEMENTARY FIGURE LEGENDS

Figure S1. Ang-1 stimulation counteracts VEGF-induced transendothelial permeability and NO production. (A) Transendothelial permeability was determined by measuring the passage of FITC-dextran through a monolayer of BLMVEC. Passage of FITC-dextran was measured following exposure of BLMVEC to VEGF, Ang-1, or VEGF and Ang-1 in combination (at the indicated concentrations). The data represent permeability to FITC-dextran expressed as the mean fold increases \pm SEM with respect to untreated cells. (B) NO released in the culture media of BLMVEC subjected to 30 min stimulation with Ang-1 (100 ng/ml), VEGF (40 ng/ml) or both. Samples of culture media were taken for nitrite quantification as described under "Methods".

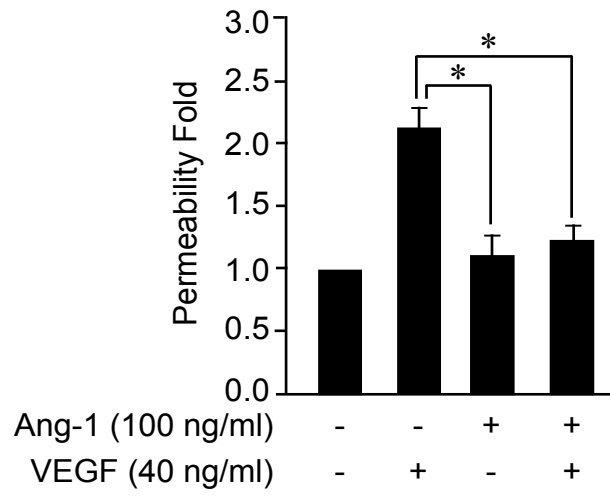
Figure S2. Tie2 activation by Ang-1 does not alter activation of VEGFR-2 by VEGF. BAEC were stimulated with VEGF (40 ng/ml), Ang-1(100 ng/ml) or both simultaneously for the indicated time. VEGFR-2 and Tie2 tyrosine phosphorylation levels were monitored in VEGFR-2 and Tie2 immunoprecipitates (IP). Equal immunoprecipitation levels from BAEC lysates were confirmed by western blotting (wb). These experiments were repeated at least 3 times with identical results.

Figure S3. Overexpression of kinase-dead PKC ζ inhibits Ang1-induced eNOS phosphorylation at Thr497. BAEC were transfected with an empty vector or with an expression vector coding for kinase-dead PKC ζ (KD-PKC ζ). 48h post-transfection cells were starved for 6 hours before stimulation with Ang-1 (100ng/ml) for the

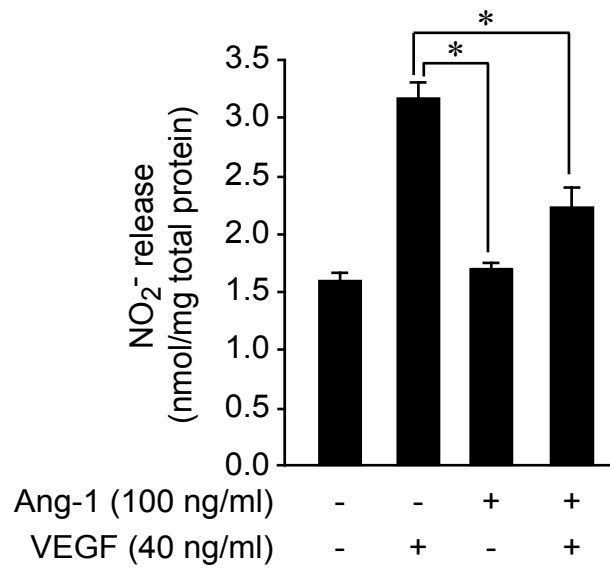
indicated times. Total cells lysates were analyzed for p-Thr⁴⁹⁷-eNOS. Total eNOS and total PKC ζ levels were monitored to confirm equal protein loading and overexpression, respectively.

Figure S4. PKC ζ knockdown in BLMVEC reverses the inhibition by Ang-1 of eNOS, NO release and of endothelial permeability. (A) BLMVEC were transfected with siRNA against PKC ζ or control siRNA. 48h following transfections, cells were starved for 6 hours before Ang-1 stimulation (100ng/ml) for the indicated times. Membranes were probed with antibodies against p-Thr⁴⁹⁷-eNOS and eNOS. PKC ζ knockdown was confirmed by western blotting (wb). (B) BLMVEC were transfected with PKC ζ -siRNA (35uM; filled bars) or control siRNA (35uM; open bars). 48h post-transfection cells were starved for 6 hours before stimulation with VEGF (40ng/ml), Ang-1 (100ng/ml), or both for 30 min. Samples of culture media were taken for the quantification of NO released as described under "Methods". PKC ζ knockdown was confirmed by western blotting and eNOS protein levels were monitored to confirm equal protein loading (inset). (C) Permeability to FITC-dextran was determined in confluent BLMVEC monolayers transfected with PKC ζ -siRNA (35uM; filled bars) or control siRNA (35uM; open bars) before stimulation with VEGF (40ng/ml), Ang-1 (100ng/ml), or both for 30 min. Data represent permeability to FITC-dextran expressed as the mean fold increase \pm SEM with respect to untreated cells. PKC ζ knockdown was confirmed by western blotting and eNOS protein levels were monitored to confirm equal protein loading (inset). * P<0.05

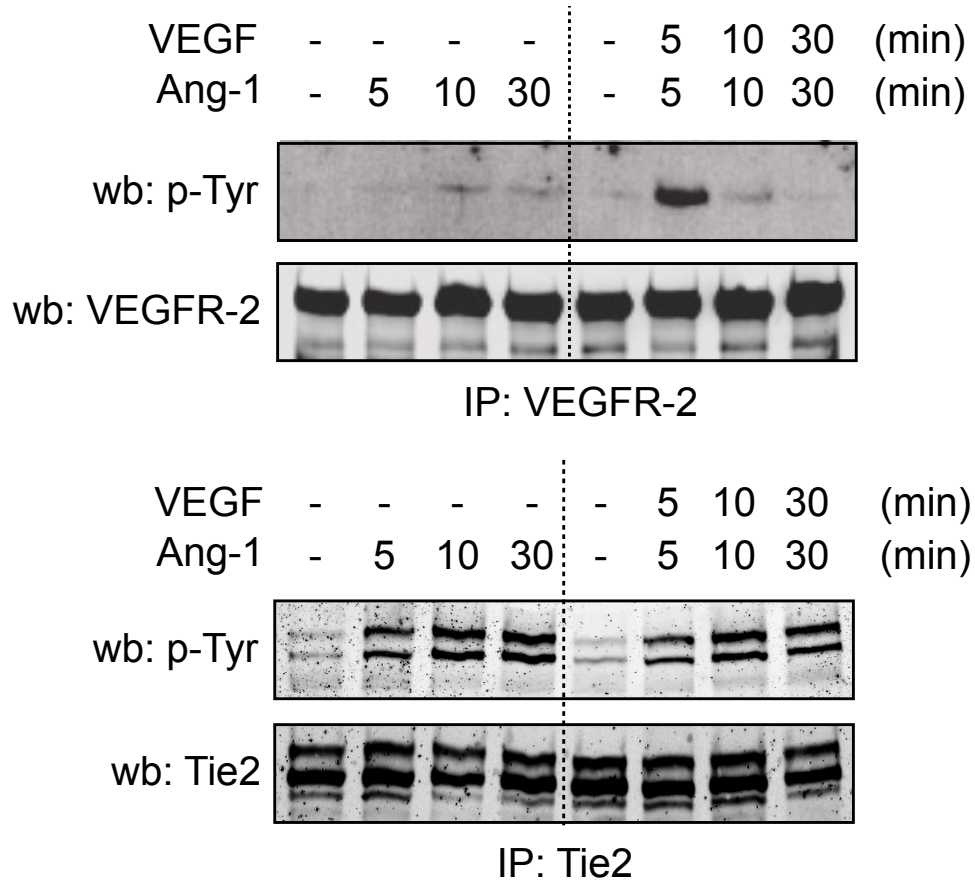
A



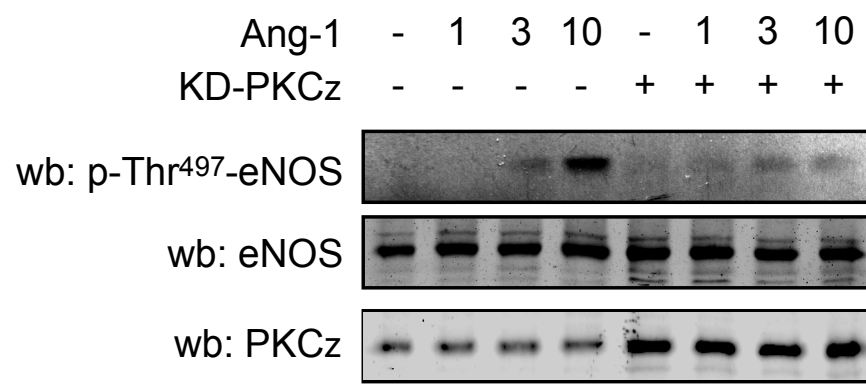
B



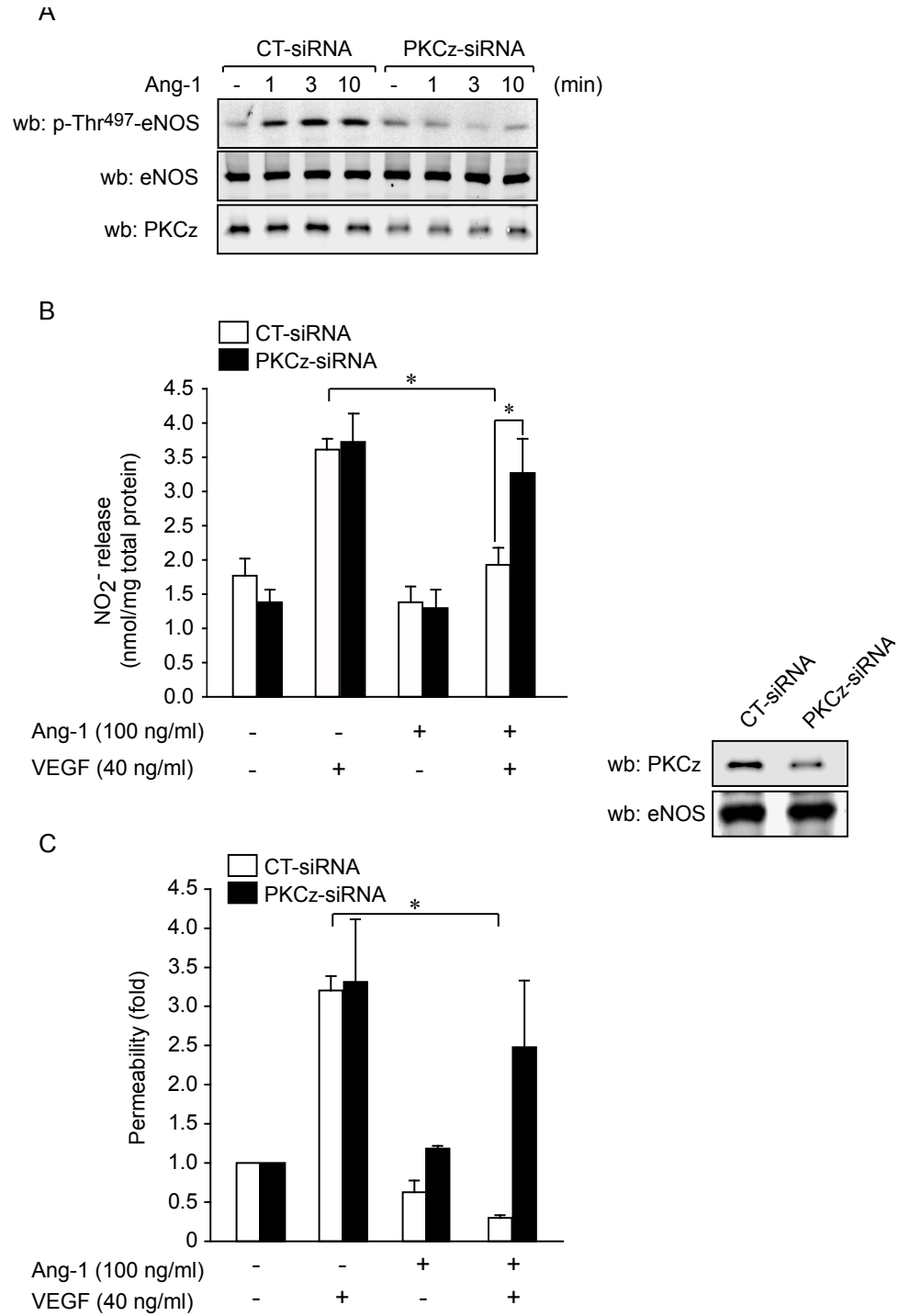
Supplementary Figure 1



Supplementary Figure 2



Supplementary Figure 3



Supplementary Figure 4

CHAPITRE 3

Article 2: Formation of a PKC ζ / β -catenin complex in endothelial cells promotes angiopoietin-1-induced collective directional migration and angiogenic sprouting.

ACCORD DES COAUTEURS

4. Identification de l'étudiant et du programme

Malika Oubaha

Programme de Biologie Moléculaire

PhD Biologie Moléculaire

5. Description de l'article

Titre: Formation of a PKC ζ / β -catenin complex in endothelial cells promotes angiopoietin-1-induced collective directional migration and angiogenic sprouting.

Ordre des auteurs: Malika Oubaha, Michelle I. Lin, Yoran Margaron, Dominic Filion, Emily N. Price, Leonard I. Zon, Jean-François Côté and Jean-Philippe Gratton.

Blood. 2012 Oct 18;120(16):3371-81

État actuel de l'article: Publié

6. Déclaration de tous les coauteurs

A titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis en accord pour que Malika Oubaha inclue cet article dans sa thèse de doctorat qui a pour titre: Étude des mécanismes cellulaires activés par l'Angiopoïétine-1 et le VEGF régulant la perméabilité et la migration endothéliales.

Michelle I. Lin

Coauteur

Signature

Date

Yoran Margaron

Coauteur

Signature

Date

Dominic Filion

Coauteur

Signature

Date

Emily N. Price

Coauteur

Signature

Date

Leonard I Zon

Coauteur

Signature

Date

Jean-François Côté

Coauteur

Signature

Date

Jean-Philippe Gratton

Coauteur

Signature

Date

CONTRIBUTION DES AUTEURS

Les travaux de cette étude ont été partagés comme suit:

J'ai réalisé toutes les expériences à l'exception:

Des expériences du Fret sur la localisation polarisée de Rac actif au front des CE en migration ont été faites par Yoran Margaron dans le laboratoire du Docteur Jean-François Côté à l'IRCM (Figure 5 A-C).

Des expériences de vasculogénèse chez le poisson zèbre faites par Michelle Lin et Emily N. Price dans le laboratoire du Docteur Leonard I Zon à l'université Harvard (Figure 6 A-D).

Dominic Filion a aidé par l'élaboration du programme d'analyse (Matlab) et des quantifications de la migration enregistrée par microscopie en temps réel.

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

**Formation of a PKC ζ / β -catenin complex in endothelial cells promotes
angiopoietin-1-induced collective directional migration and angiogenic sprouting**

Malika Oubaha¹, Michelle I. Lin², Yoran Margaron³, Dominic Filion¹, Emily N. Price²,
Leonard I. Zon², Jean-François Côté³ and Jean-Philippe Gratton¹

¹Laboratory of Endothelial Cell Biology and ³Laboratory of Cytoskeletal Organization and Cell Migration, Institut de recherches cliniques de Montréal (IRCM), Université de Montréal, Montreal, Quebec, H2W1R7, Canada

²Stem Cell Program and Division of Hematology/Oncology, Children's Hospital Boston and Dana-Farber Cancer Institute, Harvard Medical School, Boston, MA 02115, USA

Correspondence should be addressed to:

Dr. Jean-Philippe Gratton

Institut de recherches cliniques de Montréal (IRCM)

110, des Pins Ave West

Montreal QC H2W1R7

Canada

Running title: **PKC ζ / β -catenin - complex controls migration**

Summary

Angiogenic sprouting requires that cell-cell contacts be maintained during migration of endothelial cells. Angiopoietin-1 (Ang-1) and VEGF act oppositely on endothelial cell junctions. We found that Ang-1 promotes collective and directional migration and, in contrast to VEGF, induces the formation of a complex formed of atypical PKC ζ and β -catenin at cell-cell junctions and at the leading edge of migrating endothelial cells. This complex brings Par3, Par6 and adherens junction proteins at the front of migrating cells to locally activate Rac1 in response to Ang-1. The colocalization of PKC ζ and β -catenin at leading edge along with PKC ζ -dependent stabilization of cell-cell contacts promotes directed and collective endothelial cell migration. Consistent with these results, downregulation of PKC ζ in endothelial cells alters Ang-1-induced sprouting *in vitro* and knockdown in developing zebrafish results in intersegmental vessel (ISV) defects caused by a perturbed directionality of tip cells and by loss of cell contacts between tip and stalk cells. These results reveal that PKC ζ and β -catenin function in a complex at adherens junctions and at the leading edge of migrating endothelial cells to modulate collective and directional migration during angiogenesis.

Introduction

Migration of endothelial cells during angiogenesis requires extensive remodeling of intercellular junctions.^{415,416} In vascular sprouting, endothelial cells differentiate into tip and stalk cells and this is mainly regulated by the Notch-Delta pathway, which dictates and maintains cell identity throughout vasculogenesis and angiogenesis.^{51,417} The highly motile tip cells extend filopodia and branch out in a directional manner from existing vessels in response to guidance cues. Stalk cells remain behind and maintain cell-cell contacts to preserve vessel integrity and form lumens for blood perfusion.¹⁰⁹ Collective directional migration necessitates that cell-cell contacts are maintained and that leader cells at the migration front adopt a polarized morphology.⁴¹⁸ Thus, endothelial sprouts must respond to guidance cues and to signaling at cell-cell contacts to dictate the migration process that ultimately leads to vessel formation.

Many angiogenic factors, such as angiopoietins and vascular endothelial growth factor (VEGF), contribute to the establishment and maintenance of a mature vasculature.^{416,419} The remodeling of endothelial cell-cell junctions plays a key role in vessel wall assembly and maturation. Failure of the barrier function of the endothelium results in increased vessel permeability and in altered vessel maturity such as in tumoral blood vessels.^{30,31} Angiopoietin-1 (Ang-1) and VEGF share many pro-angiogenic properties such as the induction of proliferation, survival and migration of endothelial cells. However, it is well known that they induce opposite effects on adherens junctions and on endothelial cell permeability.^{192,245,399} VEGF promotes the dissociation of adherens junctions while Ang-1 induces the stabilization of junctional

complexes.^{203,225,245} Interestingly, signaling at cell-cell junctions can serve as polarity cues to organize cell movement and general organization of cell shape.⁴²⁰

In migrating mammalian cells, Par/atypical protein kinase C (aPKC) polarity complexes are recruited to the leading edge and have been implicated in the initial polarization events necessary for directed cell migration of astrocytes and epithelial cells.^{324,421} This is thought to be mostly mediated by integrin engagement with the extracellular matrix and necessary to regulate polarized integrin-dependent Rac and Cdc42 activity.^{333,422} More recently, Par polarity complexes have been shown to modulate cell-cell contacts and promote collective cell migration.^{423,424} However, the molecular players regulating collective and directed endothelial cell migration during angiogenic sprouting have remained elusive.

Herein we show that, in order to promote collective directional migration, Ang-1 induces the formation of a protein complex comprised of atypical PKC ζ and β -catenin at cell-cell junctions and at the leading edge of migrating endothelial cells. This colocalization at the leading edge allows for the establishment of a multi-protein complex involving Par3, Par6 and adherens junction proteins, which are necessary for localized Rac1 activation. Consequently, PKC ζ and β -catenin located at adherens junctions and at leading edge are necessary for collective migration and endothelial cell sprouting stimulated by Ang-1. Furthermore, during intersegmental vessel (ISV) sprouting in zebrafish, downregulation of PKC ζ results in loss of contact between tip cells, emerging from the dorsal aorta, and following stalk cells and in marks of aberrant polarity cues, such as increased filopodia and random cell extensions. Taken together,

these results provides evidence that PKC ζ and β -catenin promote the cooperation between adherens junction proteins and the Par polarity complex at the leading edge and cell junctions of migrating cells to regulate collective directional cell migration.

Methods

Cell culture and transfections

Bovine aortic endothelial cells (BAEC), obtained from VEC Technologies, were cultured in Dulbecco modified Eagle medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (HyClone), 2.0 mM L-glutamine, 100 U/mL penicillin, and 100 µg/mL streptomycin. COS-7 cells were cultured in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum (Invitrogen), 2.0 mM L-glutamine, 100 U/mL penicillin, and 100 µg/mL streptomycin. BAEC were transfected with expression plasmids (Flag-WT-PKC ζ , Flag-DN-PKC ζ , Flag-CA-PKC ζ , Raichu-Rac) or siRNAs (PKC ζ -siRNA, β -catenin-siRNA or non-silencing control siRNA) using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) according to manufacturer's instructions. 48 h post-transfections, cells were starved in serum-free media 6 h prior to cell stimulation with Ang1 or VEGF.

Wound healing Assay and time-lapse video microscopy

BAEC at about 90% confluence were starved overnight in 6 or 12-well plates. The resulting confluent cell monolayers were scratched with a sterile 1 ml or 200 µl pipette tip before stimulation with Ang-1 or VEGF to induce cell migration. In some instances, cells were first transfected with correspondent cDNA constructs or with siRNA. Cells were left 48 h to recover and to reach confluency. Fluorescent vital Hoechst dye was added to cells for 10 min. After removing the Hoechst dye, cells were washed three times with serum free media and stimulated with Ang-1 or VEGF. Cell movements were recorded using a Leica microscope DM IRE2 equipped with an automated and heated stage using a Hamamatsu Orca-ER Model C-4742 digital camera controlled by

Volocity software (Perkin Elmer) and programmed to capture a frame every 10 minutes of the migration period (6 h). Temperature was maintained at 37°C and atmosphere within the chamber was kept at 5% CO₂/95% air throughout the experiment. Cell movements recorded by time-lapse video microscopy were quantified using the Matlab software (The Math Works, Inc.) as previously (for details, see supplemental Methods).^{418,425}

Immunofluorescence Confocal microscopy

BAEC were cultured on 0.1% gelatin-coated coverslips and transfected as indicated above. Cells were serum-starved overnight and stimulated for 30 minutes with Ang-1 or VEGF. Cells were washed briefly with cold PBS and fixed for 20 minutes in PBS containing 3.5% paraformaldehyde. Cells were rinsed with PBS and permeabilized with 0.3% Triton in PBS for 5 minutes. Fixed cells were blocked with 1% BSA and then incubated for 1 hour with primary antibodies in 0.1% BSA in PBS. Bound primary antibodies were visualized after 1 hour of incubation using Alexa Fluor 488-labeled goat anti-rabbit, Alexa Fluor 568-labeled goat anti-mouse, Alexa Fluor 568-labeled rabbit anti-mouse, Alexa Fluor 488-labeled donkey anti-goat, Alexa Fluor 568-labeled donkey anti-mouse or Alexa Fluor 680-labeled donkey anti-rabbit. Coverslips were mounted using Fluoromount (Sigma) and observed using a Zeiss LSM 710 confocal laser-scanning microscope. Samples were viewed with a 63x/1.4 NA oil objective. Images were assembled using Adobe Photoshop CS4.

Tiam1 Activation Assay

The Active Rac-GEF Assay Kit (Tiam1) from Cell Biolabs was used to monitor Tiam1 activation. Briefly, BAEC were transfected with CT, PKC ζ or β -catenin-siRNA and active Tiam1 was pulled-down from BAEC lysates (3 mg) using G15A-Rac1 agarose beads. The precipitated active Rac-GEF is detected by immunoblotting using an anti-Tiam1 antibody.

Microinjection of zebrafish embryos

Tg(fli1a:EGFP)^{y1} transgenic zebrafish were maintained under standard condition. The previously described PKC ζ translation-inhibiting morpholino (PKC ζ -MO1, 5'GATCCGTTACTGACAGGCATTATA3') was injected into 1-2 cell stage zebrafish embryos at 8 ng/embryo.⁴²⁶ Alternatively, we designed a splice-blocking morpholino targeting exon 2 of *prkcz* (PKC ζ -MO2, 5'GTCCCTGCACACAAAACAACCGGAT3') that was injected at 4 ng/embryo. All morpholinos were purchased from Gene Tools LLC. Both uninjected control and morpholino-injected (PKC ζ -MO) embryos were maintained at 28°C in standard E3 water until 15 hours post fertilization (hpf). Dechorionated embryos were anesthetized in 0.02% Tricaine (Sigma) and embedded in low melting-point Agarose covered Petri dish with a No. 1.5 cover glass. The Petri dish was covered with E3 water supplemented with 0.02% Tricaine and mounted on a computer controlled stage of a Nikon Ti-E inverted microscope (Nikon Instruments, Melville, NY) (for details, see supplemental Methods).

Spheroid-based *in vitro* angiogenesis assay

24 h after transfection of siRNA, spheroids of 750 BAE cells were generated as described previously.⁴²⁷ Images of the spheroids were taken after 24 h of sprouting using a Retiga EXi Fast camera (QImaging) mounted on an Axiovert S100 TV microscope (Zeiss) with a 10X (NA 0.25) objective. The extent of capillary sprouting was quantified by measuring average sprout length and number of sprouts growing out of each spheroid using the Image J imaging software. At least 10 spheroids per conditions were analyzed and 3 independent experiments were performed.

Statistical Analysis

Values are reported as mean \pm SEM. Statistical differences were evaluated using ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison post-hoc test using the Graph Pad Prism. *P* value less than 0.05 was considered as statistically significant.

Results

Ang-1 induces the collective and directional migration of endothelial cells

Since collective and directional cell migration implies that cell-cell contacts are maintained throughout the migratory process and that Ang-1 and VEGF act in an opposite manner on endothelial cell junctions, we examined the migratory response of endothelial cells exposed to VEGF or Ang-1. Cultured bovine aortic endothelial cells (BAEC) were subjected to *in vitro* wound healing assays in presence of VEGF or Ang-1. As previously shown, both VEGF and Ang-1 induce the migration of endothelial cells within the wounded area (Figure 1A).^{428,429} However, analysis of migrating endothelial cells by time-lapse imaging revealed that at the end of 6 h of migration, BAEC exposed to VEGF had migrated within the wounded area significantly more as single cells (Figure 1B-C) whereas under Ang-1 stimulation, cells at the edge of the wound maintained contact with neighboring cells positioned at the back (Figure 1B-C). Cell tracking of migrating endothelial cells shows that Ang-1-stimulated cells use mostly straight paths (Figure 1D), which are in majority perpendicular to the orientation of the scratch (Figure 1E). In contrast, migration tracks from cells stimulated with VEGF during wound closure are less linear and more tortuous compared to cells stimulated with Ang-1 (Figure 1D). Analysis of the tracks revealed that the average total distances covered by individual cells stimulated with Ang-1 or VEGF were similar (Figure 1F). However, the net distance covered by cells stimulated with Ang-1 from their point of origin was significantly longer than for cells stimulated with VEGF (Figure 1F). Consequently, the migration induced by Ang-1 was more

persistent than migration stimulated by VEGF (Figure 1G). This increase in the persistence of cell migration is reflected in the linearity of tracks and the directionality of the moving cells (Figure 1D-E). Thus, in contrast to VEGF, Ang-1 induces a collective, more persistent and directional migration of endothelial cells.

Association of PKC ζ with β -catenin in endothelial cells

We previously reported atypical PKC ζ as a key player in Ang-1-mediated stabilization of cell-cell contacts and inhibition of endothelial permeability induced by VEGF.²⁴⁵ To identify molecular players linking PKC ζ signaling events downstream of the Ang-1 receptor Tie2, we used immunoprecipitation coupled to mass spectrometry and identified β -catenin as a PKC ζ interacting protein in lysates from Ang-1-stimulated endothelial cells (supplemental Table 1). We show that, simultaneous to the phosphorylation of PKC ζ , Ang-1 stimulation induced the association of β -catenin with PKC ζ (Figure 2A). In contrast, stimulation of BAEC with VEGF did not induce PKC ζ phosphorylation or its association with β -catenin. Also, we demonstrate that Flag-tagged PKC ζ can associate *in vitro* to recombinant GST- β -catenin using pull-down assays from cell lysates of transfected BAEC stimulated with Ang-1 (supplemental Figure 1A). It is well recognized that Ang-1 stimulation of endothelial cells strengthens cell-cell adhesions.^{430,431} On confluent endothelial cell monolayers, Ang-1 induces the relocalization of PKC ζ to cell-cell contacts where it colocalizes with the adherens junction proteins: β -catenin and VE-cadherin (Figure 2B). Quantification of fluorescence intensity of β -catenin and VE-cadherin labeling revealed a tightening of adherens junctions in response to Ang-1. Under Ang-1 stimulated conditions, the

fluorescence intensity signal is more prominent and restricted compared to control conditions (Figure 2C). In addition, upon Ang-1 stimulation, fluorescence intensity of the PK ζ labeling increased at cell-cell junctions and overlapped with β -catenin and VE-cadherin (Figure 2C). Similarly, phosphorylated PKC ζ colocalized with β -catenin following Ang-1 stimulation and the fluorescence intensity profile of p-PKC ζ labeling overlapped with β -catenin at cell-cell junctions (Figure 2D-E).

To determine whether PKC ζ activity modulates its interaction with β -catenin, anti-Flag immunoprecipitations from lysates of endothelial cells that were transfected with Flag-tagged wild-type (WT) or dominant negative (DN) PKC ζ (K281R) were performed. Ang-1 stimulation induced phosphorylation of WT-PKC ζ and its association with β -catenin, which was not observable when Flag-DN-PKC ζ was used (Figure 2F). Furthermore, to confirm that the activity status of PKC ζ determines its association with β -catenin, COS-7 cells were transfected with Myc-tagged β -catenin, Flag-WT-PKC ζ , DN-PKC ζ or the constitutive active (CA) PKC ζ constructs in presence or absence of the Ang-1 receptor, Tie2 (Figure 2G). Anti-Flag immunoprecipitates showed that expression of Tie2, which becomes activated independently of Ang-1 stimulation when transiently overexpressed,^{245,432} induced the association between Myc- β -catenin and Flag-WT-PKC ζ . In contrast, Tie2 expression did not induce the association of DN-PKC ζ to β -catenin. The constitutively active Flag-CA-PKC ζ construct was found to associate with β -catenin even in the absence of Tie2 (Figure 2G). Identical results were obtained from the reciprocal immunoprecipitations of Myc- β -catenin (supplemental Figure 1B-C). To determine if cell-cell contacts are required for the formation of the

PKC ζ / β -catenin complex, we examined if Ang-1 could promote the association of PKC ζ with β -catenin in sparse or confluent endothelial cell cultures. Immunoprecipitation of PKC ζ revealed that in sparse cells Ang-1 stimulation did not induce the association of PKC ζ to β -catenin (Figure 2H). Interestingly, Ang-1 stimulation induced the phosphorylation of PKC ζ even in sparse endothelial cells indicating that cell-cell contacts are not required for PKC ζ activation. Furthermore, we used the calcium-chelating agent EGTA to disrupt homotypic VE-cadherin binding in confluent cells⁴³³ and confirmed that association of PKC ζ with β -catenin in Ang-1-stimulated cells does not occur if engagement of cadherins at cell-cell junctions is disrupted. EGTA treatment also increased basal phosphorylation levels of PKC ζ , perhaps due to the inhibition of calcium-sensitive phosphatases.

PKC ζ and β -catenin are required for collective and persistent cell migration

PKC ζ and the polarity complex have been implicated in the initial polarization events required for directed cell migration.^{420,434} Thus, we sought to determine if association of PKC ζ with β -catenin plays a role in migration of endothelial cells. We used RNA interference to transiently silence PKC ζ or β -catenin in BAEC and investigated the consequence on cell motility during wound closure assays. Time-lapse images of cells exposed to either Ang-1 or VEGF during 6 h of migration were recorded and the migration tracks of individual cells were analyzed. Strikingly, we observed that downregulation of PKC ζ markedly affected the ability of Ang-1 to induce collective cell migration by causing a detachment of the leading cells from the migration front and migrate as single cells (Figure 3A-D). Notably, this mode of single cell migration

resulting from the downregulation of PKC ζ phenocopies cell migration induced by VEGF in control conditions (Figure 3A). Downregulation of PKC ζ did not affect the total distance covered by migrating cells stimulated with VEGF or Ang-1 (supplemental Figure 2A). However, downregulation of PKC ζ in cells exposed to Ang-1 significantly reduced the net distance covered by cells (supplemental Figure 2B). Consequently, downregulation of PKC ζ led to a significant decrease in the persistency and in the directionality of migration, presented in rose plots (Figure 3B-C). Ang-1-induced cell migration was perturbed with a more random and multi-directional displacement of the cells rather than mostly perpendicular to the wound as in CT-siRNA transfected cells stimulated with Ang-1 (Figure 3C). Importantly, silencing of β -catenin in endothelial cells also resulted in increased single cell migration, decreased persistency and directionality in response to Ang-1-stimulated wound closure (Figure 3E-F and supplemental Figure 2C-F).

Our results indicate that Ang-1 stimulation of confluent endothelial cells induces the recruitment of PKC ζ to cell-cell contacts where it colocalizes and associates with β -catenin (Figure 2B). PKC ζ has also been shown to be distributed at the leading edge of migrating epithelial cells and astrocytes and to regulate directional migration.^{357,435} Thus, we examined by confocal microscopy the cellular localization of PKC ζ and β -catenin during directional endothelial cell migration. In Ang-1-stimulated cells that are located at the migration front during wound closure, PKC ζ and β -catenin were colocalized at the leading edge of cells (Figure 3G). In contrast, in VEGF-stimulated cells, β -catenin and PKC ζ were not localized at the leading edge (Figure 3G).

Furthermore, a pool of activated PKC ζ , as judged by phosphorylation on Thr⁴¹⁰, is localized at the leading edge of Ang-1-stimulated cell (supplemental Figure 2G). Silencing of PKC ζ using siRNA or inhibition of PKC ζ activity with a cell permeable pseudo-substrate peptide prevented the redistribution of β -catenin and PKC ζ at the leading edge of cells in response to Ang-1 (Figure 3H). Moreover, β -catenin staining revealed that inhibition of PKC ζ in Ang-1-stimulated cells alters cell-cell junctions (Figure 3H). Additionally, silencing of β -catenin prevented the redistribution of PKC ζ at the leading edge of migrating cells in response to Ang-1 (Figure 3H). These results indicate that PKC ζ expression and activity are required for maintained cell-cell contacts and formation of a PKC ζ / β -catenin complex at the leading edge during Ang-1-induced collective and directional migration. To confirm the requirement of intercellular contacts for the polarized localization of PKC ζ and β -catenin, we examined if Ang-1 could promote the translocation of PKC ζ and β -catenin at the front of sparsely plated endothelial cells. Caveolin-1 immunofluorescence staining was used to localize the rear of sparse cells²²⁵ and it revealed that in absence of cell contacts Ang-1 stimulation did not induce the localization of PKC ζ and β -catenin at the front of cells (supplemental Figure 3). This is in contrast to confluent endothelial cells located at the front during gap closure (Figure 3G and supplemental Figure 3). This result is in agreement with the incapacity of Ang-1 to induce the co-immunoprecipitation of PKC ζ and β -catenin in sparsely cultured cells (Figure 2H).

Polarity and adherens junction proteins localize at the leading edge of migrating endothelial cells

Our results suggest an intriguing link between the PKC ζ polarity complex and proteins involved in the formation of adherens junctions during collective and directional endothelial migration. To explore this in more detail, we monitored the cellular localization of components of the adherens junction and polarity complexes in migrating endothelial cells. Surprisingly, in addition to β -catenin and PKC ζ , the adherens junction proteins VE-cadherin (Figure 4A) and α -catenin (supplemental Figure 4D) were relocated at the leading edge of Ang-1 stimulated cells. Quantification of the extent of colocalization of the labeling at the leading edge or at cell junctions revealed that Ang-1 induced a significant increase in the overlap between β -catenin or VE-cadherin and PKC ζ staining at the leading edge and at cell-cell junctions (Figure 4B). However, the overlap coefficient of VE-cadherin and β -catenin colocalization was not significantly altered when quantified at cell-cell junctions (Figure 4B). Interestingly, Ang-1 induced the colocalization of Par3 with PKC ζ and β -catenin at the front of migrating endothelial cells when stimulated with Ang-1 (Figure 4C-D). Another component of the polarity complex, Par6, was also found at the front of migrating cells (Figure 4C and supplemental Figure 4D). However, Ang-1 stimulation did not significantly increase the colocalization of Par6 with PKC ζ at the leading edge of cells (Figure 4D). Furthermore, the colocalization of Par3 or Par6 with PKC ζ at cell-cell junctions was not significantly enhanced by Ang-1 treatment. Next, we purified PKC ζ by immunoprecipitation from BAEC lysates and determined which components of the adherens junction and polarity complexes are associated to PKC ζ in response to

Ang-1 stimulation. Our results indicate that in addition to β -catenin, VE-cadherin, α -catenin and Par3 are actively recruited to PKC ζ following Ang-1 stimulation (Figure 4E). Similarly, immunoprecipitation of β -catenin (supplemental Figure 4A) or VE-cadherin (supplemental Figure 4B) also revealed that PKC ζ was recruited to the adherens junction protein complex following exposure of cells to Ang-1. Interestingly, Par6 appears to be basally associated to PKC ζ in non-stimulated conditions^{322,357} and this association remains in presence of Ang-1 (Figure 4E). This was confirmed in Par6 immunoprecipitates where PKC ζ levels remained relatively unchanged in response to Ang-1 (supplemental Figure 4C). However, increased β -catenin association to the Par6 immunocomplex was observed suggesting that Par6 and PKC ζ are recruited simultaneously to adherens junction proteins following Ang-1 stimulation (supplemental Figure 4C). Similar experiments, shown in Figure 4F, indicate that in BAEC where β -catenin expression was downregulated by siRNA, the increased co-immunoprecipitation of VE-cadherin, β -catenin and Par3 with PKC ζ induced by Ang-1 was abrogated. These results suggest that, in migrating endothelial cells, the polarity complex including PKC ζ could associate with adherens junction proteins via β -catenin to participate in the establishment of a leading edge.

We also investigated the possibility that activated Tie2 could serve as a scaffold to promote localized PKC ζ activation. However, we could not detect by immunoprecipitation an association between PKC ζ and Tie2 in lysates from endothelial cells stimulated with Ang-1 (supplemental Figure 5A). Interestingly, we show that, following stimulation with Ang-1, Tie2 was distributed as clusters at cell-

cell contacts in confluent cultures of endothelial cells but it did not colocalize with β -catenin (supplemental Figure 5B). This is similar to the previously reported absence of colocalization between Tie2 and VE-cadherin at intercellular contacts²²⁵. In BAEC located at migration front, Tie2 formed clusters upon stimulation with Ang-1 at the leading edge of cells where it intermingled but did not colocalize with PKC ζ (supplemental Figure 5C). Hence, upon activation, Tie2 forms clusters at cell-cell contacts and at the leading edge to promote collective and directional migration but it does not appear to interact with the PKC ζ / β -catenin complex.

PKC ζ and β -catenin are required for polarized Rac1 activation by Ang-1

The Rho-GTPases are orchestrators of cell migration and of polarity signaling.^{322,436,437} Notably, Rac GTPases are important regulators of leading edge establishment and directed cell motility. To determine whether PKC ζ and β -catenin are involved in the spatiotemporal activation of Rac1 during Ang-1-stimulated endothelial cell migration, we used a FRET approach with the Raichu-Rac1 biosensor (YFP-Rac-CFP) to monitor Rac activation in migrating cells⁴³⁸ (Figure 5A and supplemental Figure 6). BAEC were transfected with Raichu-Rac1 and with the siRNA directed against PKC ζ or control siRNA. Time-lapse acquisitions of FRET signal from live transfected cells at the edge of the wound revealed that, upon exposure to Ang-1, Rac1 activity increased at the leading edge of the cells after 5 min of stimulation and was sustained for 30 min (Figure 5A). Upon silencing of PKC ζ in BAEC, Ang-1 stimulation did not increase the FRET signal at the leading edge (Figure 5A). To confirm this result, a global quantification of Rac activation was measured in fixed cells using a FRET after

acceptor photobleaching based assay where cells were transfected with CT-siRNA, PKC ζ -siRNA or β -catenin-siRNA. In contrast to CT-siRNA transfected cells, where Ang-1 stimulation induces Rac activation at the leading edge, PKC ζ -siRNA and β -catenin siRNA transfected cells displayed no increase in Rac activity (Figure 5B). This indicates that PKC ζ and β -catenin are required for the localized activation of Rac in response to Ang-1. Quantification of FRET efficiency confirmed that Ang-1 stimulation increases Rac1 activity at the front of migrating endothelial cells and that depletion of either PKC ζ or β -catenin abolished this effect induced by Ang-1 (Figure 5C).

The Rac-GEF Tiam1 was reported to play a role in directional cell migration via its association to Par3 in polarity complexes at the leading edge.⁴³⁹ Thus, we investigated if stimulation of endothelial cells with Ang-1 induces Tiam1 activation. We performed, using G15A-Rac1 as bait, pull-down assays for active Rac-GEFs from lysates of BAEC transfected with CT-siRNA, PKC ζ -siRNA or β -catenin-siRNA. Ang-1 stimulation increased Tiam1 activity as revealed by its association to G15A-Rac1. Downregulation of PKC ζ or β -catenin markedly reduced Tiam1 activation following stimulation of BAEC with Ang-1 (Figure 5D). Overall, these results suggest that in response to Ang-1, PKC ζ and β -catenin are required for Tiam1 activation and for localized Rac1 activity at the leading edge to promote directional migration of endothelial cells.

Knockdown of *PKCζ* in zebrafish embryos causes vascular sprouting defects

To gain insights into the role of *PKCζ* during vascular development *in vivo*, we designed ATG-targeting and splice-blocking morpholino antisense oligomers against the *prkcz* gene (*PKCζ*-MO1 and *PKCζ*-MO2, respectively) that were injected into *Tg(fli1a:EGFP)* zebrafish embryos. Importantly, no dysmorphogenesis of the embryo were observed for the *PKCζ*-MOs at the doses used (Figure 6A). At 30 hours post-fertilization (hpf), both *PKCζ* morphants displayed a significant increase in intersegmental vessels (ISV) defects per embryos (Figure 6B-C). Notably, the splice blocking *PKCζ*-MO2 was more toxic and was injected at a lower dose, which resulted in less ISV defects than for *PKCζ*-MO1 (Figure 6C). The position and the number of ISV sprouting from the dorsal aorta (DA) toward the dorsal longitudinal anastomosing vessel (DLAV) are not affected in *PKCζ* morphants. However, most of the ISV sprout defects occurred in the initial stages of sprout elongation; most prior to reaching the horizontal myoseptum (Figure 6B). We imaged segmental artery sprouting in control embryos and in *PKCζ* morphants and observed that tip cells, following the initial sprouting from the dorsal aorta, separate from the secondary connector stalk cells and appear to have lost polarity cues by extending filopodia in a more random fashion, such that most of them do not eventually form the DLAV (Figure 6B-D and supplemental [Video 1](#) and [Video 2](#) (<http://bloodjournal.hematologylibrary.org/content/120/16/3371/suppl/DC1>)). Thus, knockdown of *PKCζ* causes disorganized endothelial sprouting due to tip cell detachment from the stalk cell and a loss of the polarization of tip cells resulting in altered angiogenic sprouting during zebrafish development.

PKC ζ and β -catenin are required for *in vitro* angiogenic sprouting induced by Ang-1

To confirm the importance of PKC ζ and β -catenin for Ang-1-stimulated endothelial cell sprouting, we established *in vitro* 3-dimensional spheroidal BAEC cultures and monitored sprouting of endothelial cells. We investigated whether downregulation of PKC ζ or of β -catenin influenced Ang-1-stimulated endothelial cell sprouting from spheroids. Ang-1 and VEGF induced endothelial cell sprouting from spheroids and, compared to VEGF, Ang-1-induced sprouts appeared wider with less bifurcations (Figure 6E). Cells transfected with PKC ζ -siRNA and β -catenin-siRNA formed significantly shorter sprouts in response to Ang-1 than in CT-siRNA transfected cells (Figure 6F). Interestingly, the number of sprouts per spheroid in response to Ang-1 was increased in spheroids formed with PKC ζ downregulated cells (Figure 6G). Moreover, tips of capillary sprouts formed by PKC ζ or β -catenin downregulated cells displayed multiple bifurcations and more formations of short secondary sprouts compared to CT-siRNA transfected cells stimulated with Ang-1 (Figure 6E). In addition, approximately 75% of spheroids formed with PKC ζ or β -catenin-siRNA and stimulated with Ang-1 displayed cells that had detached from the spheroids during sprouting compare to 35% CT-siRNA transfected cells (Figure 6E).

Discussion

Collective and directed cell migration is central for numerous physiological processes, such as morphogenesis, wound repair and cancer metastasis.³⁶⁷ Blood vessel elongation and branching necessitates a coordinated interplay between cell fate determinants to specify tip or stalk cells and migration modes that dictates cell polarization and cohesion.¹⁰⁹ In the present study, we show that Ang-1, in contrast to VEGF, induces collective and persistent migration of endothelial cells. Our data support the paradigm that directional and persistent cell migration involves lateral polarity cues from cell-cell junctions that influence the migratory process.^{420,435} We discovered that Ang-1 induces the association and colocalization of atypical PKC ζ and β -catenin at adherens junctions and at the leading edge of migrating endothelial cells. We show that PKC ζ and β -catenin are required in endothelial cells for the formation of a complex comprised of polarity and adherens junction proteins at the migration front. Localization of the Par polarity complex at the leading edge has been shown to be important for directed cell migration and spatial activation of Rho GTPases.^{333,357} Furthermore, cadherin-mediated cell-cell attachment maintains collective migration behavior in many cell types.⁴⁴⁰⁻⁴⁴² Indeed, downregulation of β -catenin and disruption of endothelial cell junctions prevent Ang-1 from promoting collective migration. We now demonstrate that PKC ζ activity not only stabilizes adherens junctions but does also contribute to collective and directional cell migration. We also provide evidence that polarity and adherens junction proteins cooperate at the cell front of leader cells during directional migration. Interestingly, our data suggest that the localization of this

complex at the leading edge is required for polarized Rac1 activation during Ang-1-promoted endothelial cell migration. During vascular morphogenesis, Rho GTPases regulate diverse cellular functions such as endothelial cell invasion and lumen formation.⁴⁴³ Our results suggest that Rac1 is an effector of PKC ζ signaling downstream of Ang-1/Tie2. However, our results also indicate that migration of endothelial cells as single cells does not require polarized Rac1 activity since Ang-1 stimulation induces single cell migration in PKC ζ or β -catenin downregulated cells (Figure 3). This suggests that activation of Rho GTPases other than Rac1 may be involved in single cell endothelial migration. Also, the colocalization of adherens junctions proteins with Par3 at the leading edge of Ang-1-stimulated cells indicated that a Rac-GEF, such as Tiam1, may also be recruited to activate Rac1 and promote directional cell migration.⁴³⁹ Indeed, we observed that Tiam1 is activated upon Ang-1 stimulation and that downregulation of PKC ζ or of β -catenin prevented its activation by Ang-1 (Figure 5D).

Our results indicate that the formation of a PKC ζ / β -catenin complex has a dual role in the induction of collective and directional cell migration. First, the localization of β -catenin and PKC ζ at adherens junction contributes to the tightening of cell-cell adhesions that maintains cell contacts during migration. Second, colocalization at cell front following Ang-1 stimulation promotes the establishment of a leading edge containing adherens junction and polarity proteins that allows the polarized distribution of Rac activity possibly through the action of Tiam1. It is well known that activation of Tie2 by Ang-1 in endothelial cells leads to stabilization of cell junctions and inhibition

of endothelial cell permeability.^{192,225,245} We show that inhibition of PKC ζ activity or downregulation of β -catenin results in loss of cell contacts at the rear of migrating endothelial cells and that cell-cell contacts are necessary for Ang-1-induced association of PKC ζ with β -catenin (Figure 2). Interestingly, it has been previously shown that following activation, Tie2 forms clusters at cell-cell contacts in confluent cells where it regulates endothelial cell permeability and has also been shown to localize at the trailing edge of migrating cells^{225,444}. We now show that during collective migration, Tie2 clusters form at the leading edge of leader cells but do not colocalize with adherens junction proteins or PKC ζ , similar to what has been observed at cell junctions²²⁵. This suggests that distinct signaling events must emerge from Tie2 to promote the formation of β -catenin/PKC ζ complexes at cell junctions and for the localization of polarity and adherens junction proteins at the leading edge. Nonetheless, our results reveal a central role for PKC ζ in the coordination of the molecular events for directed cell migration and uncover it as a determinant for linking the polarity complexes to adherens junctions.

Importantly, our results show that knockdown of PKC ζ in developing zebrafish embryos results in deficient sprouting of ISV and that PKC ζ and β -catenin are determinants of Ang-1-stimulated endothelial cell sprouting *in vitro*. Similarly to Ang-1-stimulated endothelial cells at the migration front, tip cells emerging from the dorsal aorta lose contact with the following stalk cells when PKC ζ is downregulated. In addition, in PKC ζ morphants, tip cells from ISV displayed marks of aberrant polarity cues such as increased filopodia, random extensions and tip cell enlargement,

suggesting that PKC ζ is a regulator of planar polarity signaling in tip cells and coordinates the remodeling of cell-cell contacts during vascular sprouting. Notably, the previously reported ISV defects in VE-cadherin morphants are mostly associated with defects in lumen formation and in vascular stability rather than severe sprouting defects of tip cells as we observed following knockdown of PKC ζ ^{445,446} This suggests that downregulation of PKC ζ results in tip cell defects that are not solely associated with disruption of cell adhesions. However, it remains to be determined if endothelial tip cells in PKC ζ morphants have also lost certain cell fate determinants of the Notch/Delta/VEGF signaling axis that could contribute to the generation of defective ISV sprouts. ^{447,448} Also, in zebrafish vascular development, Tie2 has been mostly ascribed to the maintenance of vascular stability rather than to the induction of vascularization. ⁴⁴⁹ Thus it is not clear if PKC ζ acts downstream of Tie2 or of specific VEGF receptor subtypes to coordinate sprouting of ISV. Nonetheless, our *in vitro* angiogenic assays demonstrate that Ang-1 promotes endothelial sprouting and that this process is coordinated by PKC ζ and β -catenin. Downregulation of PKC ζ not only results in reduced sprout length but also in increased number of sprouts in response to Ang-1 highlighting the importance of PKC ζ in the establishment of polarity cues during endothelial sprouting downstream of Tie2 activation.

Overall, this study provides evidence that, through the association of activated PKC ζ and β -catenin, the Par polarity complex cooperates with proteins involved in adherens junctions located at the leading edge to regulate endothelial cell migration. In epithelial and endothelial cells, the Par/PKC ζ complex localizes at cell-cell junctions where it

participates in the establishment of apical-basal polarity and epithelial integrity.^{436,450} Our findings show that in endothelial cells, PKC ζ can localize upon activation to adherens junctions where it associates with β -catenin. Interestingly, Ang-1 promotes cellular polarization through the colocalization of the Par complex and adherens junction proteins at the leading edge of cells that are situated at the migration front. This suggests that VE-cadherins at the leading edge can function as a scaffold for the polarity complex independently of homomeric engagement. The nature of the forces that allow for maintained VE-cadherins at the leading edge in absence of homomeric trans interactions remains to be defined but certainly involves signals emerging from engaged adherens junctions at cell-cell contacts to promote their localization at the leading edge. The formation of this complex at the front of migrating cells along with maintained intercellular contacts is necessary for collective and directional migration of endothelial cells. Our results provide evidence for a role of adherens junctions in the establishment of endothelial cell polarity during angiogenic sprouting where guided, directional and collective cell migration are essential for vascular development.

Acknowledgements

We are grateful to Dr. Denis Faubert for LC-MS/MS analysis and we thank Chantal Delisle for expert technical support. This work was supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) to J-P.G. (MOP-86464 and MOP-111031); Canadian Cancer Society Research Institute (CCSRI) to J-F.C. (CCSRI-019104); American Heart Association Postdoctoral Fellowship to M.I.L.; Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ) Postdoctoral Fellowship to Y.M. and from the NIH to L.I.Z. (#5PO1HL32262-29 and #5R01HL048801-18). J-F.C. holds a FRSQ

Junior 2 career award. J-P.G. holds a Tier 2 Canada Research Chair in Endothelial Cell Signaling and Angiogenesis.

Authorship

Contribution: M.O. designed and performed the experiments, analyzed the data, prepared the figures and wrote the manuscript; M.I.L. and Y.M. performed the experiments, analyzed the data, and prepared the figures; D.F. and E.N.P. performed and analyzed the experiments; L.I.Z. and J.-F.C. provided critical reagents and participated in designing the experiments and writing the manuscript; and J.-P.G. designed and supervised the experiments, analyzed the data, prepared the figures, and wrote the manuscript.

Conflict of Interest Disclosure

L.I.Z. is a founder and stockholder of Fate, Inc. and a scientific advisor for Stemgent.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Ang-1 induces collective directional endothelial cell migration. (A) Fold increase in migration of BAEC stimulated with Ang-1 (red) and VEGF (blue) compared to non-stimulated cells (CT) (black). Wound closure was measured 6 h after wounding. Results are from 5 independent experiments and data are represented as mean \pm SEM. *P<0.05 compared to non-stimulated cells. (B) Percentage of cells single cells after 6 h of migration. Cells were counted in 3 random fields in 3 different experiments for all treatments and data are represented as mean \pm SEM. *P<0.05 compared to non-stimulated cells. (C) Representative images taken from the wound edge at the initiation of imaging (0 h) and 6 h after wounding of BAEC monolayers. The migration front was traced to delimit the displacement of cells and cells that detached from the edge were outlined. Higher magnification view of the boxed region is shown. Scale bar, 100 μ m. (D) Representative vector diagrams (250 μ m) of cell trajectories, each line represents the migration path of a single cell plotted from a common origin. (E) Directionality of migration was determined for CT, Ang-1 or VEGF stimulated BAEC and displayed in rose plot diagrams that represent the frequency and directedness of cells. 0 indicates a migration perpendicular to orientation of the wound. (F) Quantification of the total and net distance of migration. Data are represented as mean \pm SEM. *P<0.05 compared to non-stimulated cells. †P<0.05 compared to Ang-1 stimulation. (G) Persistence of migration was determined from the track of each cell recorded by time-lapse microscopy. For each condition, cells were selected in 3 different fields and tracked for 6 h. Each column represents the average of

at least 108 measurements from 3 independent experiments and data are represented as mean \pm SEM. *P<0.05 compared to non-stimulated cells. †P<0.05 compared to Ang-1 stimulation.

Figure 2. Ang-1 induces the association of PKC ζ with β -catenin in endothelial cells. (A) Immunoprecipitation (IP) of PKC ζ from BAEC lysates stimulated with Ang-1 or VEGF and immunoblotted (IB) using anti β -catenin and anti-PKC ζ antibodies. The precipitating antibodies were IgG and anti-PKC ζ . Whole cell lysates were probed for phosphorylated (p-PKC ζ) and total PKC ζ levels (bottom). (B) Representative confocal micrographs of immunofluorescence staining of BAEC stimulated or not with Ang-1 (30 min) using antibodies against endogenous PKC ζ (red), β -catenin (blue) and VE-cadherin (green). The overlap (merge) of the three fluorophores is shown as white. White arrowheads point to staining at cell-cell junctions. Scale bar, 20 μ m. (C) Representative fluorescence intensity profiles of β -catenin (blue), VE-cadherin (green) and PKC ζ (red) measured along the white line in B drawn across the cell-cell contact in control and Ang-1 stimulated conditions. Dashed lines delimit the β -catenin staining peak intensity. (D) Representative confocal micrographs of immunofluorescence staining of phosphorylated PKC ζ (p-PKC ζ) (green) and β -catenin (red) in confluent BAEC stimulated with Ang-1 compared to control non-stimulated cells. White arrowheads point to staining at cell-cell junctions. Scale bar, 20 μ m. (E) Representative fluorescence intensity profiles of β -catenin (red) and p-PKC ζ (green) measured along the line in D drawn across the cell-cell contact in control and Ang-1 stimulated

conditions. Dashed lines delimit the β -catenin staining peak intensity. (F) Immunoprecipitation of Flag-tagged wild-type (WT) or dominant-negative (DN) PKC ζ from lysates of transfected BAEC stimulated or not with Ang-1. The co-immunoprecipitated β -catenin was detected by western blot analysis using anti- β -catenin antibody (top). P-PKC ζ was detected in the anti-Flag immunoprecipitates from WT-Flag-PKC ζ but not in DN-Flag-PKC ζ transfected cells in Ang-1 stimulated cells (middle). Anti-Flag and anti- β -catenin immunoblots showing equal expression and immunoprecipitation levels are shown (bottom). BAEC lysates (10% input) were immunoblotted with anti- β -catenin antibody. Representative immunoblots from 3 experiments. (G) Immunoprecipitation of Flag-tagged WT, DN or constitutively active (CA) PKC ζ from transfected COS-7 cell lysates. Cells were co-transfected with Myc-tagged β -catenin constructs in absence or in presence of the Tie2 expression vector. Anti-Flag immunoprecipitates were immunoblotted with anti-Myc and anti-Flag antibodies to detect β -catenin and PKC ζ levels (top and bottom panels, respectively). Whole-cell lysates were immunoblotted with anti-Myc and anti-Tie2 antibodies for input (10%). Representative immunoblots of 5 experiments. (H) Immunoprecipitation of PKC ζ from sparse or confluent BAEC stimulated with Ang-1 or VEGF (left) or after pre-treatment with EGTA (30 min) to disrupt adherent junctions in confluent cells (right). PKC ζ immunoprecipitates were probed for β -catenin and p-PKC ζ . Total PKC ζ was immunoblotted to show equal immunoprecipitation levels. Representative immunoblots from 3 independent experiments.

Figure 3. PKC ζ and β -catenin are required for Ang-1 induced persistent cell migration and for leading edge formation. (A) Quantification of the percentage of single cells after 6 h of migration in PKC ζ downregulated cells in response to Ang-1 or VEGF stimulation (6 h). Data are represented as mean \pm SEM. *P<0.05 compared to non-stimulated cells. †P<0.05 compared to CT-siRNA transfected cells. (B) Quantification of the persistence of cell migration in PKC ζ downregulated cells in response to Ang-1 or VEGF stimulation (6 h). Data are represented as mean \pm SEM. *P<0.05 compared to non-stimulated cells. †P<0.05 compared to Ang-1-stimulated CT-siRNA transfected cells. (C) Representative vector diagrams (250 μ m) of cell trajectories (top) and directionality of migration displayed in rose plot diagrams (bottom) of CT-siRNA and PKC ζ -siRNA transfected cell in response to Ang-1 or VEGF stimulation (6 h). (D) Representative images taken from the wound edge at the initiation of imaging (0 h) and 6 h after wounding of BAEC monolayers. The migration front was traced to delimit the displacement of cells and cells that detached from the edge were outlined. (E) Quantification of the percentage of single cells after 6 h of migration and (F) persistence of cell migration in β -catenin downregulated cells in response to Ang-1 stimulation. Data are represented as mean \pm SEM. *P<0.05 compared to non-stimulated cells. †P<0.05 compared to Ang-1-stimulated CT-siRNA transfected cells. (G) Representative confocal micrographs of immunofluorescence staining of PKC ζ (red) and β -catenin (green) in BAEC located at the leading edge of a wound during migration in presence of Ang-1 or VEGF (30 min). Note that in contrast to control and VEGF stimulated cells, Ang-1 induces the colocalization of PKC ζ and β -catenin (merged in yellow) at the leading front of cells. Scale bar, 20 μ m. (H)

Immunofluorescence staining showing that transfection of BAEC with PKC ζ -siRNA, β -catenin-siRNA or treatment with the pseudosubstrate inhibitors (Myr-PS-PKC ζ) prevents the colocalization of PKC ζ (red) or β -catenin (green) at the leading edge of migrating cells after Ang-1 stimulation (30 min). Arrowheads point to β -catenin staining at cell-cell junctions. The leading edge of cells transfected with PKC ζ -siRNA or β -catenin-siRNA is outlined to delimit the migration front. Scale bar, 20 μ m.

Figure 4. Ang-1 induces the colocalization of polarity and adherens junction proteins at the leading edge of migrating endothelial cells. (A) Representative immunofluorescence micrographs showing colocalization (merge; right panel) of β -catenin, VE-cadherin and PKC ζ at the leading edge of migrating BAEC subjected to Ang-1 stimulation (30 min). Scale bar, 20 μ m. Higher magnification views of the boxed region are shown. (B) Quantification of the overlap coefficient of colocalization for PKC ζ / β -catenin, PKC ζ /VE-cadherin or β -catenin/VE-cadherin in control (white) and Ang-1 stimulated cells (black) at the leading edge (LE) and at cell junctions (CJ). (C) Representative immunofluorescence microscopy images of BAEC stained using anti-PKC ζ , showing increased colocalization for PKC ζ , Par3 and Par6 in Ang-1-stimulated cells (30 min). Higher magnification view of the boxed region is shown. Scale bar, 20 μ m. (D) Quantification of the overlap coefficient of colocalization for PKC ζ /Par6, PKC ζ and Par3 in control (white) and Ang-1 stimulated cells (black) at the leading edge (LE) and at cell junctions (CJ). Each column represents the average of at least 36 measurements and data are represented as mean \pm SEM. *P<0.05 compared to non-stimulated cells. (E) Immunoprecipitation of endogenous PKC ζ from BAEC

stimulated or not with Ang-1. PKC ζ immunoprecipitates and total cell lysates were subjected to western blot analysis with anti- β -catenin, anti-VE-cadherin, anti- α -catenin, anti-Par6, anti-Par3 and anti-PKC ζ antibodies. Ratios of the densitometric analyses of immunoblots are presented. (F) Immunoprecipitation of PKC ζ from BAEC, as in (E), transfected with CT or β -catenin-siRNA.

Figure 5. PKC ζ and β -catenin are required for polarized Rac1 activation at the migrating front of endothelial cells. (A) Rac1 activity ratio monitored by FRET/CFP time lapse imaging using Raichu-Rac (YFP-Rac-CFP) at the indicated time points after Ang-1 stimulation of migrating BAEC transfected with CT-siRNA or PKC ζ -siRNA. Corresponding YFP fluorescence images are shown in Supplemental Figure 4. Neighboring cells are outlined to show the position of Raichu-Rac transfected cells at the front of migration. Scale bar, 20 μ m. (B) Representative images of corrected FRET after photobleaching for Rac1 activation of a wounded BAEC monolayer expressing the Raichu-Rac probe and transfected with CT-siRNA or PKC ζ -siRNA and stimulated or not with Ang-1 (30 min). The same cells are shown in fluorescent images of YFP as control for total Rac localization. Neighboring cells are outlined to show the position of Raichu-Rac transfected cells at the front of migration. Scale bar, 20 μ m. (C) Histogram representing the quantification of Rac activity in fixed BAEC by mean FRET efficiency of the region of interest (leading edge) from all acquisitions of fixed cells from 5 experiments and data are represented as mean \pm SEM. *P<0.05 compared to non-stimulated cells. (D) Active Rac-GEF assay showing active Tiam1 in BAEC lysates transfected with CT, PKC ζ or β -catenin-siRNAs. Whole-cell lysates were

immunoblotted with anti-PKC ζ and β -catenin to confirm downregulation. Total levels of Tiam1 were used as loading control.

Figure 6. PKC ζ is required for developmental angiogenesis in zebrafish and for endothelial cell sprouting. (A) Images from whole mount *Tg(fli1a:EGFP)* fixed embryos at 30 hpf. Uninjected embryo (CT; left panel) or injected with a morpholino targeting *prkcz* (PKC ζ -MO1; right panel) are presented. (B) Confocal images of the vasculature in the trunk of *Tg(fli1a:EGFP)* embryos. The uninjected control embryos (CT) showed complete intersegmental vessels (ISV) sprouting from the dorsal aorta (DA) to dorsal longitudinal anastomosing vessel (DLAV) at 30 hpf, whereas in PKC ζ -MO1 injected embryos, ISV sprouting were disturbed mostly at the horizontal myoseptum with increased filopodia extensions from tip cells. (C) Percentage of defective ISV in control and PKC ζ -MO1 or PKC ζ -MO2 injected embryos. Data are represented as mean \pm SEM. *P<0.05 compared to CT embryos. (D) Representative images from time-lapse *in vivo* imaging of *Tg(fli1a:EGFP)* embryos showing ISV sprouts from 18 to 28 hpf in CT (top) and PKC ζ -MO (bottom) injected embryos. The arrow indicates, in the PKC ζ -MO injected embryo, the detachment of tip cells from the DA. (E) Representative images from spheroid based angiogenesis assay generated from CT-, PKC ζ - or β -catenin-siRNA transfected cells and stimulated with Ang-1, VEGF or left untreated (CT). Pictures are taken 24 h after embedding in collagen gel. Higher magnification views of the boxed region are shown. The arrow indicates, in the PKC ζ or β -catenin-siRNAs, the detachment of tip cells from the sprouts. The arrowhead indicates bifurcation at end of the sprouts. One representative experiment of

three performed is shown. (F) Quantification of capillary-like sprouting from spheroids was measured in every condition as displayed. Data are shown as mean of sprout length (*P<0.05 versus non stimulated control condition, †P<0.05 compared to stimulated CT-siRNA. (G) Number of sprouts per spheroid. Results are displayed as mean values \pm SEM of sprout lengths observed in at least 10 spheroids per experiment in three independent spheroid assays. Scale bar, 100 μ m.

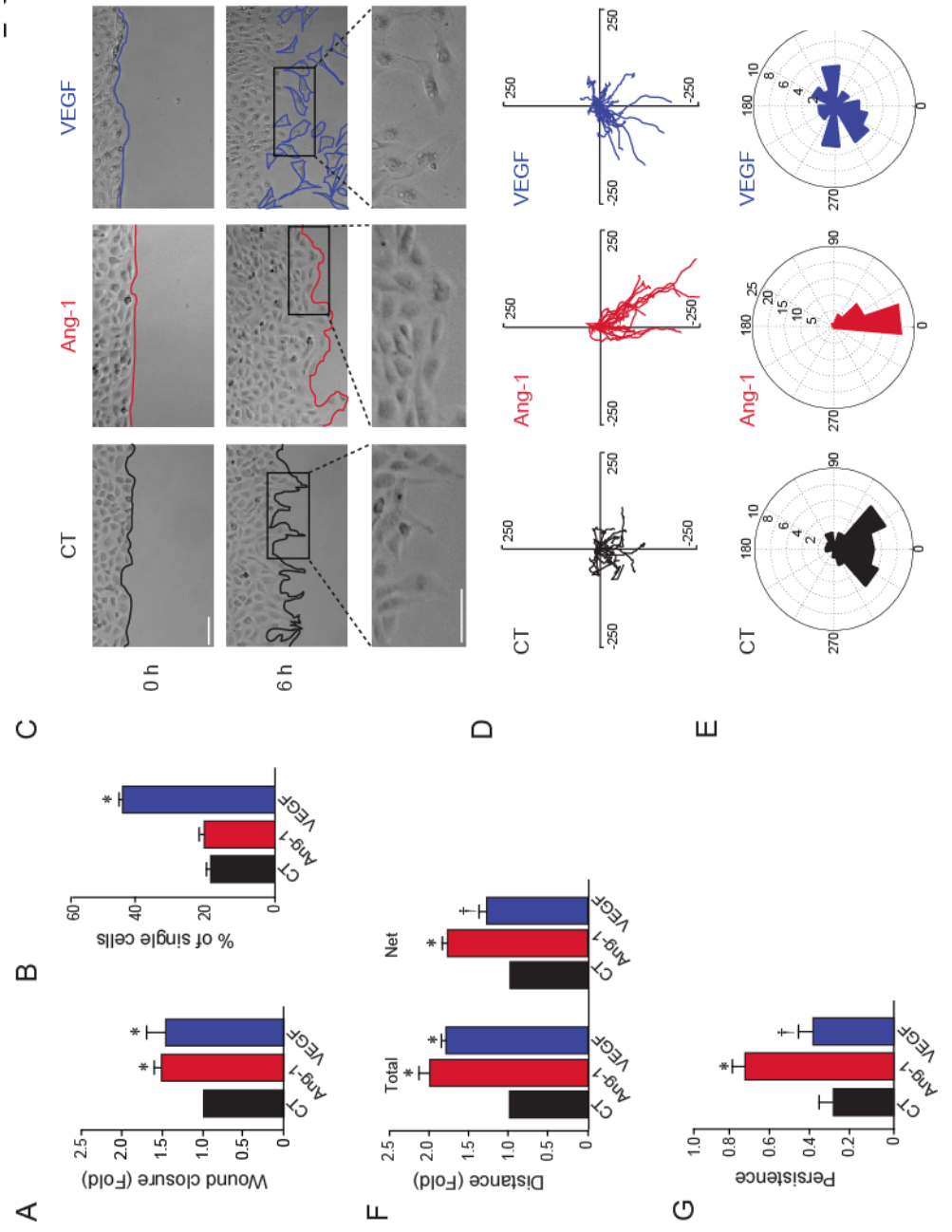


Figure 1

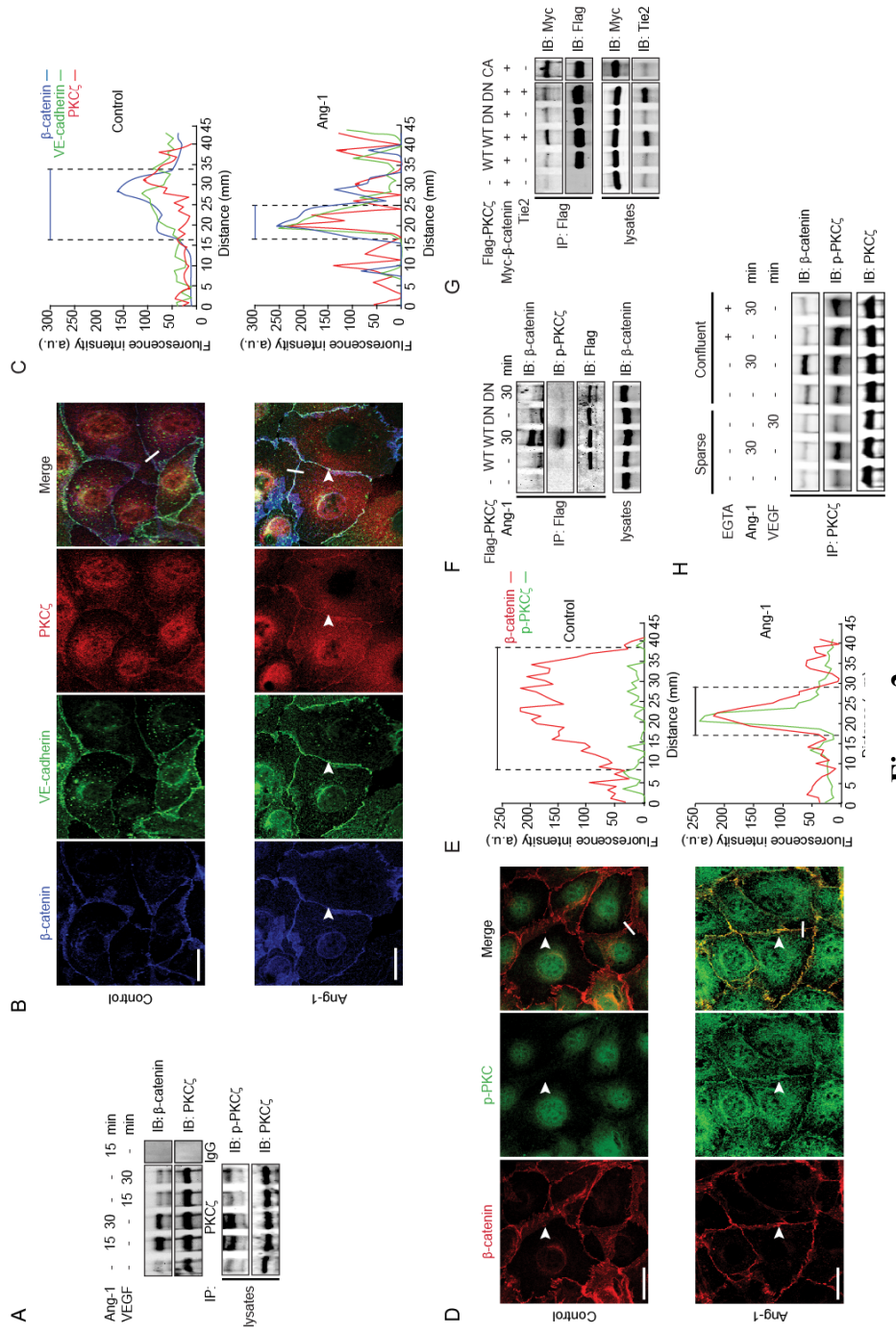


Figure 2

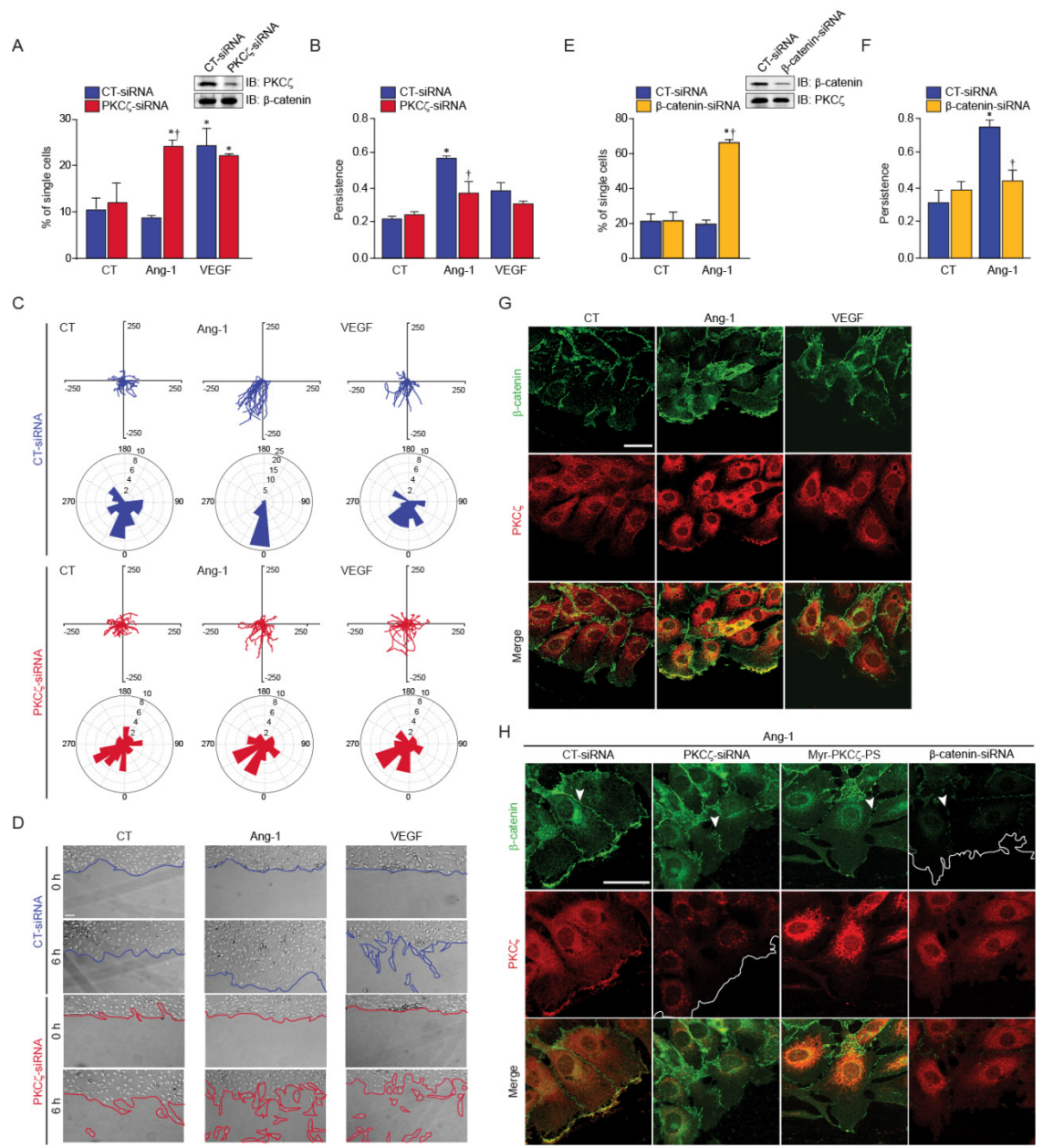


Figure 3

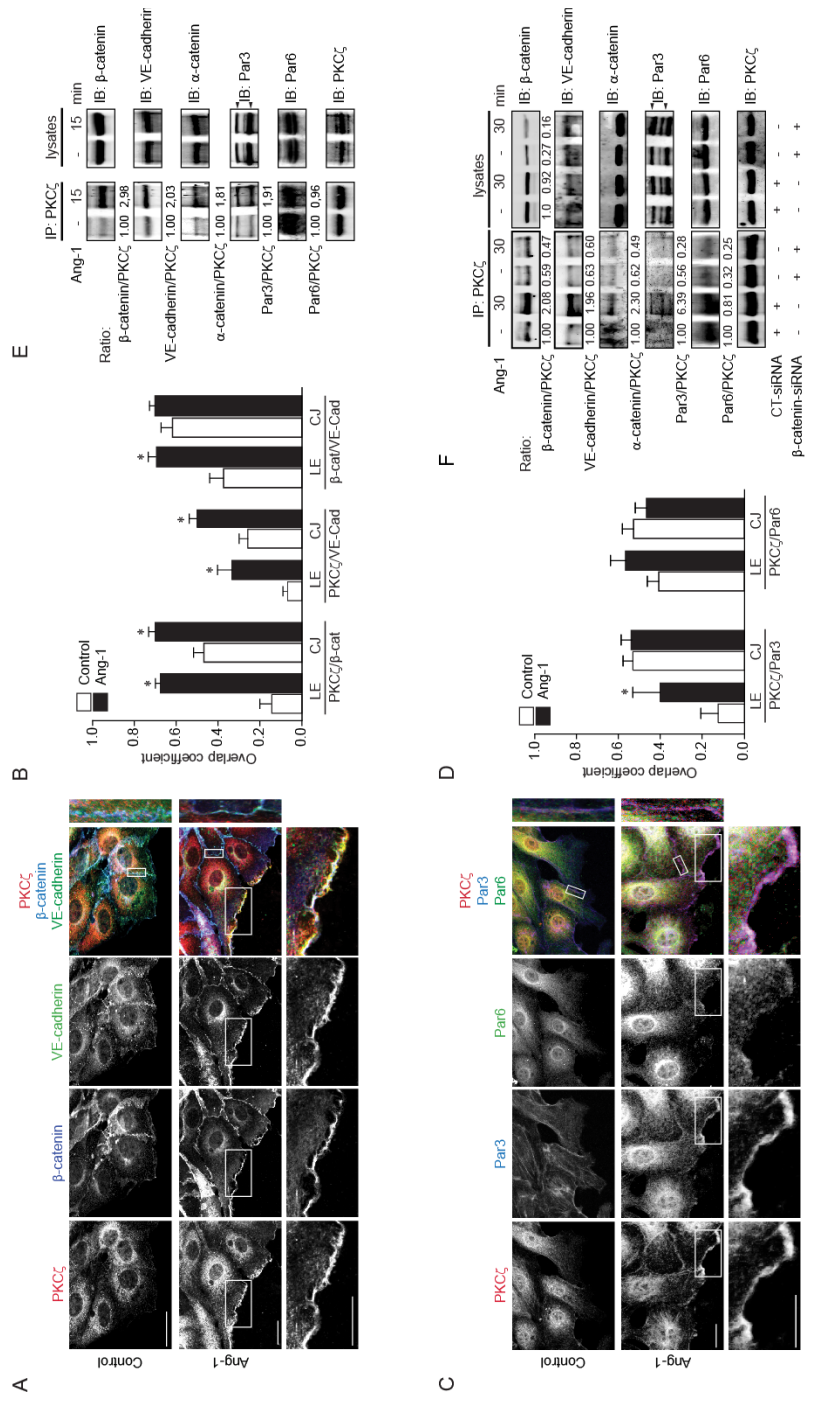


Figure 4

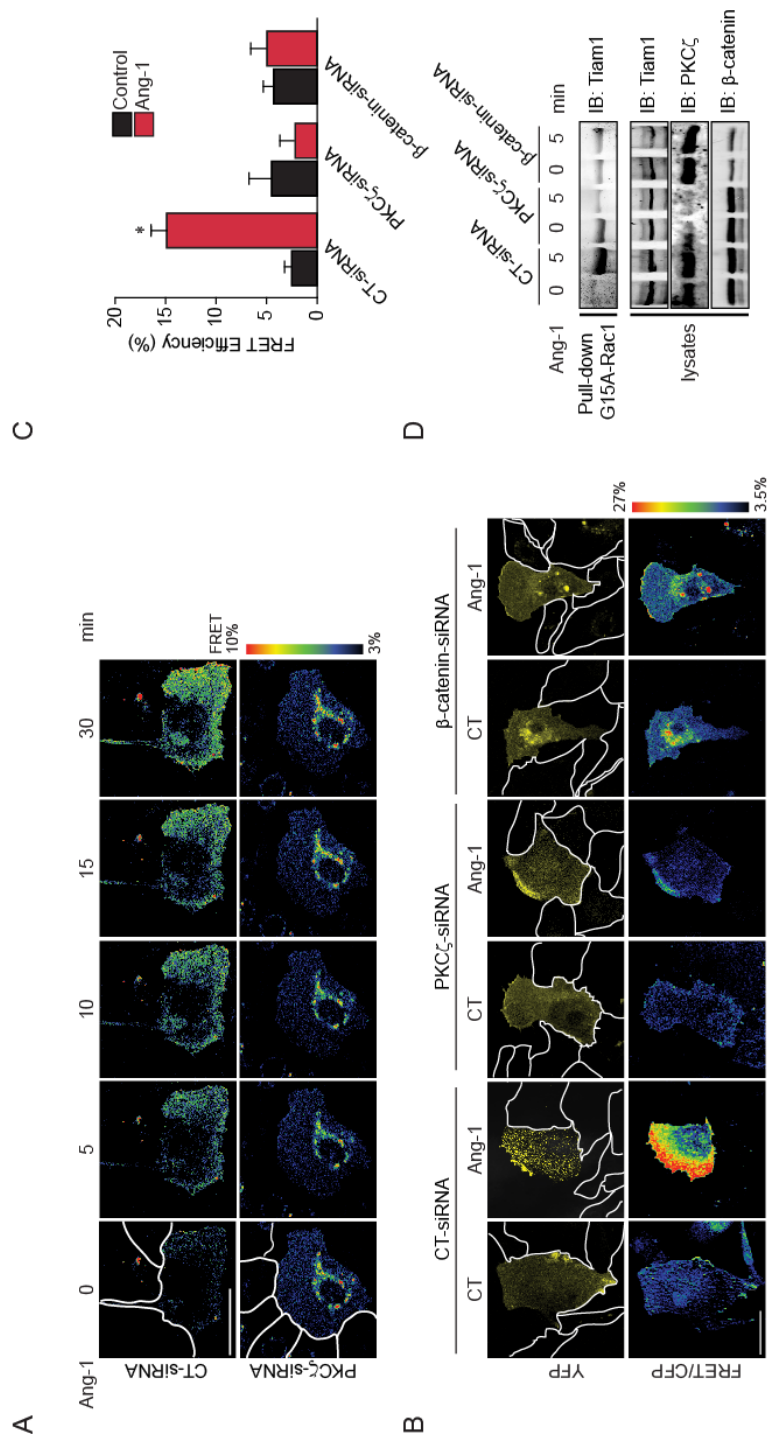


Figure 5

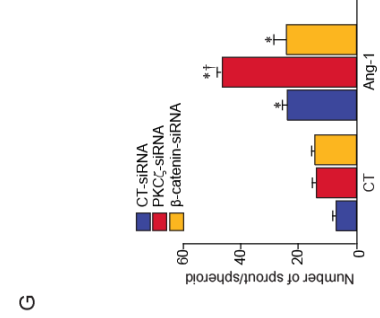
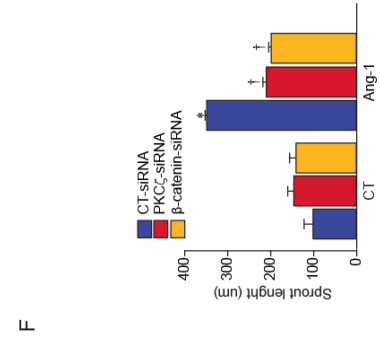
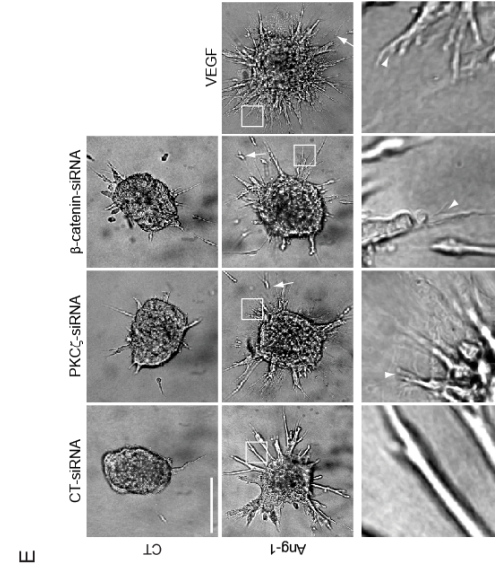
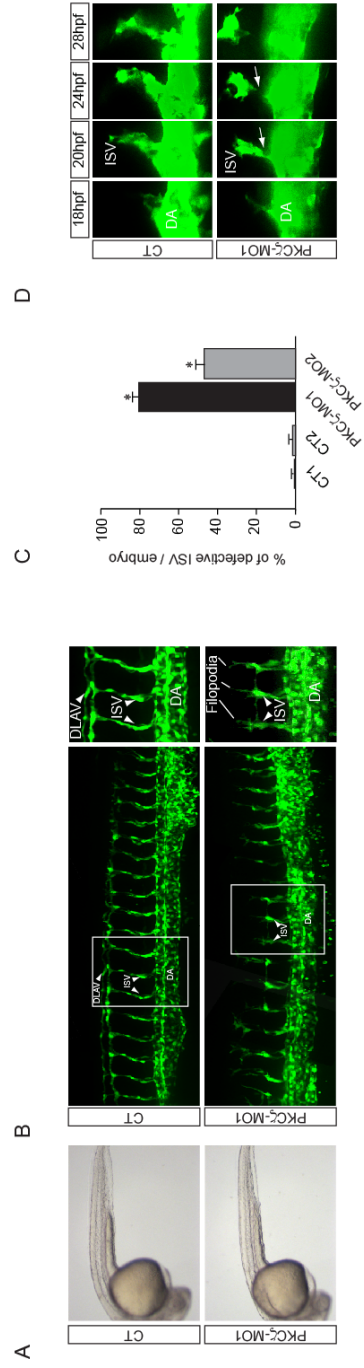


Figure 6

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplementary Methods

DNA constructs and RNA interference

Flag-PKC ζ was generously provided by Dr. Michel Cayouette (Institut de recherches cliniques de Montréal, Canada).⁴⁵¹ Kinase-dead (Flag-DN-PKC ζ) (K281R), constitutive active Flag-CA-PKC ζ (A119E) (in pCMV5) were generated using QuickChange site-directed mutagenesis (Stratagene) on Flag-WT-PKC ζ plasmid. All constructs were sequenced to confirm the presence of the mutations. Full-length human β -catenin was purchased from Open Biosystems (Huntsville, AL) and subcloned in pCMV3-Myc (Stratagene). β -catenin N-terminally fused to glutathione S-transferase (GST- β -catenin) was obtained by inserting in frame human β -catenin cDNA into pGEX4T1 plasmid. Plasmid coding for human Tie2 (in pcDNA3) used in this study was described elsewhere.²⁰⁰ Small interfering RNA (siRNA) targeted against PKC ζ (PKC ζ -siRNA) as well as a non-silencing control siRNA (CT-siRNA) were obtained from Santa Cruz Biotechnology. siRNA against β -catenin (β -catenin-siRNA) was designed and purchased from Dharmacon. The siRNA duplexes were as follows: β -catenin sense strand, 5'-AAGUAGCUGAUUAUUGAUGGACUU-3' as well as a non-silencing control sense strand, 5'-AUGAACGUGAAUUGCUCAAUU-3'. The working concentration of siRNA duplexes applied was 35 nM for si-RNA-PKC ζ and 1 nM for siRNA- β -catenin. YFP-Rac-CFP (Raichu-Rac) was a generous gift from Dr. Michiyuki Matsuda (Kyoto University, Japan).⁴³⁸

Reagents and Antibodies

Recombinant human Ang-1 obtained from R&D Systems and recombinant human VEGF-A (VEGF in this study) obtained from the Biological Resources Branch Preclinical Repository of the National Cancer Institute Cancer Research and Development Center were used at the concentration of 100 ng/ml and 40 ng/ml, respectively, for cell stimulation throughout this study. PKC ζ inhibitor, myristoylated PKC ζ -pseudosubstrate inhibitor was from Calbiochem and was used at 10 mM. EGTA was from American bioanalytical and was used at final concentration of 5 mM. Glutathione-Sepharose beads, Protein A-Sepharose and carboxymethylcellulose were from Sigma. *Hoechst blue dye (333342)* was from Invitrogen. Rat-tail type I collagen (3.3 mg/ml) was from BD Biosciences. The primary antibodies used were: mouse anti- β -catenin purchased from BD Transduction Laboratories, goat anti- β -catenin (C-18), rabbit anti- β -catenin (H-102), goat anti-VE-cadherin (C19), goat anti-PARD6A (T-20), rabbit anti-Par3, rabbit anti-Tie2, rabbit anti-Caveolin-1 and mouse anti-PKC ζ (H-1) antibodies were from Santa Cruz Biotechnology, mouse anti-Myc-Tag (9B11), rabbit anti-p-Thr⁴¹⁰-PKC ζ and mouse anti- α -catenin antibodies were from Cell Signaling Technology, mouse anti-FLAG (M2) antibody was from Sigma.

Immunoprecipitation and immunoblotting

For immunoprecipitations, cells were solubilized in lysis buffer containing 1% NP40, 50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 20 mM sodium

fluoride, 1 mM sodium pyrophosphate, 1 mM orthovanadate and protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics). Soluble proteins were incubated with primary antibodies (2 μ g) at 4°C overnight. Protein A-Sepharose (Sigma; 50 μ l of a 50 % slurry) was added and incubated for an additional hour. The immune complexes were precipitated by centrifugation, washed 3 times with lysis buffer, boiled in SDS sample buffer, resolved by SDS-PAGE, transferred onto a nitrocellulose membrane (Hybond-ECL, GE Healthcare) and visualized by immunoblot. Detection and quantification were performed with a LI-COR Odyssey near-infrared imaging system (LI-COR Biosciences) using the appropriate Alexa 680 or Alexa 800 labeled secondary antibodies (Invitrogen).

In vitro binding assay

Equal amounts of recombinant GST- β -catenin fusion protein or GST proteins bound to glutathione Sepharose 4B beads were incubated at 4°C for 2 hours with BAEC lysates (750 μ g) from cells previously transfected with Flag-PKC ζ . Following incubation, beads were washed extensively with lysis buffer and associated proteins were revealed by SDS-PAGE followed by western blot analysis.

Protein identification by LC-MS/MS

Immunoprecipitated proteins were separated by SDS-PAGE and revealed by silver staining. Bands of interest were cut out from the gel and digested with trypsin (0.1 μ g) for 1h at 58°C. Peptides were extracted from the gel at room temperature, and the supernatants were transferred into a 96-well plate and then completely dried in a

vacuum centrifuge. Before the analysis, peptides were dissolved under agitation for 15 min in 13 μ l of trifluoroacetic acid 0.1%, then sonicated for 5 min, and centrifuged at 2000 rpm for 1 min. Analysis of the peptide mixture was done by liquid chromatography–mass spectrometry (LC-MS/MS) using an Orbitrap Mass Spectrometer configured with an on-line CapLC system (Waters, Millipore, Milford, MA). Protein identification was obtained from the MS/MS spectra using Mascot analysis software (Matrix Science, Boston, MA).

Cell tracking and quantifications

Cell movements recorded by time-lapse video microscopy were quantified using the Matlab software (The Math Works, Inc.) as previously.^{418,425} Matlab acquires the position of selected cells once every 10 min for 6 h of cell migration. A threshold-based method is used to obtain binary images representing cells as objects and tracks are acquired as x and y coordinates of each image caption. Total path length was determined by summing migration step distances every frame throughout the video sequence. The net distance was quantitated as the direct distance between the last position and the initial position of a migrating cell. Distance was calculated in pixels and converted to μ m. Persistence represents the ratio between the net distance and the total distance.⁴¹⁸ 36 cells were selected in each experiment from each side of the scratch, along the leading edge (leader cells) and also 2 to 3 rows of cells behind the leading edge (Follower cells) about 30 to 40 μ m from the scratch. Data were pooled from three independent experiments; error bars indicate SEM based on 108 cells. Directionality of cell migration was analyzed by plotting the angle, with respect to the

initial position of the cell, in a rose plot diagram using Matlab, the area of each bin represents the number of cells moving in the same direction of migration. The rate of wound closure was calculated using the following formula: Wound closure rate (%) = $[(\text{Original wound area} - \text{Open area at 6 h}) / \text{Original wound area}] \times 100$. The proportion of single cells in the wound was assessed after 6 h of migration. A cell was considered as single if it was completely detached from the rest of the cell monolayer during migration.

Immunofluorescence image analysis

For quantification of colocalization experiments, specific regions of dual or triple labeled cells were selected first to set the thresholds. Then selected regions (6 regions at the leading front and 6 at the back in each experiment) of interest, either of the leading edge, or membrane at cell-cell contact were used for pixel quantification. Colocalization of proteins was quantified using Zeiss Zen 2010 software which calculates overlap coefficient as derived from Mander's article. The values for the overlap coefficient range from 0 to 1. An Overlap Coefficient with a value of 1 represents perfectly colocalized pixels while a value of 0 means that there are no overlapping pixels.

FRET analysis

Cells were transfected with the Raichu-Rac biosensor.⁴³⁸ To visualize Rac activation, FRET imaging was performed using a Zeiss LSM710 confocal microscope equipped with a temperature and CO₂-controlled chamber (Zeiss). For each condition, at least 50

cells were recorded in five independent experiments. Donor (CFP), acceptor (YFP), and FRET pictures were taken using identical settings, with lasers power was adjusted to the lowest possible (4%) setting to avoid bleaching and phototoxicity. CFP, PMT and FRET channels were acquired simultaneously and YFP images were acquired separately at the same plane of view. For CFP, excitation source was at 405-nm, emission Bandpass filter (BP) 470-500 nm; for YFP, excitation source at 514-nm, emission BP 530-600 nm.⁴³⁸ Only cells expressing moderate levels of CFP and YFP were studied; high and low expressing cells were avoided. The FRET image contains the FRET signal and also the bleed-through of donor and acceptor into the FRET channel. A FRET efficiency image is generated using the “FRET and Colocalization Analyser” plugin of Image-J software (NIH), which uses the following equation :
$$\text{FRET efficiency} = (\text{FRET channel intensity}) - a \times (\text{Donor intensity}) - b \times (\text{Acceptor intensity}),$$
 where a and b are the mean of bleed-through coefficients, determined in each run, for both donor and acceptor, respectively.⁴⁵² The ratio fluorescence intensity range of FRET efficiency was displayed using a color spectrum. Positive FRET in images typically appears in green/yellow to red range.

FRET after Acceptor photobleaching was used to quantify Rac activation. Cells, transfected with Raichu-Rac biosensor and CT-siRNA or siRNA-PKC ζ were wounded and stimulated with Ang-1 for 30 min prior to fixation with 4% paraformaldehyde. Within a field, a region of interest, corresponding to leading edges of extruding cells in wounds, the acceptor (YFP) was photobleached (100% 514 nm laser power, 250 iterations). The increase of donor (CFP) fluorescence intensity after acceptor photobleaching was measured as FRET. FRET efficiency was calculated using the

“FRET calc” plugin of Image-J software (NIH) as the change in background subtracted fluorescence intensity, as $100 \times (((\text{Donor post-bleach intensity}) - (\text{Donor pre-bleach intensity})) / (\text{Donor post-bleach intensity}))$. Error bars represent SEM for five independent experiments (n=40).

Live imaging of zebrafish embryos

In vivo time-lapse confocal images were collected with 488 solid-state laser illumination and Yokogawa CSU-X1 spinning disk confocal (Andor Technology, South Windsor, CT) in the Confocal and Light Microscopy Core Facility at the Dana Farber Cancer Institute. Z-stack images of sprouting intersegmental vessels were captured every 3 minutes using an Andor iXon 897 EMCCD camera. Movies were rendered from Z-stack time-lapse series where each frame is a maximum projection of the optical slices. All experiments were carried out at 28°C in the temperature controlled enclosed microscope stage. Acquisition parameters, shutters, filter positions and focus were controlled by Andor iQ software (Andor Technology, South Windsor, CT).

Supplementary Figure Legends

Supplemental Figure 1: PKC ζ associates with β -catenin. (A) GST- β -catenin pull-down assays were performed with BAEC lysates transfected with WT-Flag-PKC ζ . The presence of Flag-PKC ζ in GST- β -catenin precipitates was revealed by immunoblot using anti-Flag antibody. GST alone was used as negative control. GST immunoblots confirm equal input of GST- β -catenin and GST. (B, C) Immunoprecipitation of Myc-

tagged β -catenin from transfected COS-7 cell lysates. Cells were co-transfected with WT; Dominant negative (DN) or constitutively active (CA) PKC ζ constructs in absence or in presence of the Tie2 expression vector. Anti-Myc immunoprecipitates were immunoblotted with anti-Flag and anti-Myc antibodies to detect PKC ζ and β -catenin levels (top and bottom panels, respectively). Whole-cell lysates were immunoblotted with anti-Flag and anti-Tie2 antibodies for input (10%).

Supplemental Figure 2: Depletion of PKC ζ or β -catenin disrupts in endothelial cells directional and collective cell migration. BAEC were transfected with control siRNA (CT-siRNA, blue) or siRNA targeting PKC ζ or β -catenin (PKC ζ -siRNA, red β -catenin-siRNA; yellow) and were subjected to wound closure assays in presence of Ang-1 or VEGF. Cell movements within the wounded areas were monitored by time-lapse video microscopy. The quantifications presented are: Total distance of migration (A, C); Net distance migrated (B, D). (E) Top, representative vector diagrams of cell trajectories, each line represents the migration path of a single cell plotted from a common origin. Bottom, directionality of migration was determined for CT and Ang-1 stimulated BAEC and displayed in rose plot diagrams that represent the frequency and directedness of cells in (CT-siRNA, blue) or siRNA targeting β -catenin (β -catenin-siRNA, yellow). 0 indicates a migration perpendicular to the wound. *P<0.05 compared to non-stimulated cells. †P<0.05 compared to Ang-1-stimulated CT-siRNA transfected cells. (F) Representative images taken from the wound edge at the initiation of imaging (0 h) and 6 h after wounding of BAEC monolayers. The migration front was traced to delimit the displacement of cells and cells that detached from the edge

were outlined. (G) Activated PKC ζ localizes with β -catenin at the front of migrating BAEC. Representative confocal micrographs of immunofluorescence staining of (left panels) β -catenin (green) and PKC ζ (red) and (right panels) phospho-PKC ζ (p-PKC ζ green) and PKC ζ (red) in BAEC located at the leading edge of a wound closure migration in absence (Top) or in presence (bottom) of Ang-1. Higher magnification views of the boxed regions in Ang-1 stimulated cells are shown. Scale bar, 20 μ m.

Supplemental Figure 3: Cell-cell junctions are required for PKC ζ / β -catenin complex formation. Representative immunofluorescence micrographs from sparse or confluent BAEC stimulated with Ang-1, VEGF, or left untreated (CT) showing colocalization of β -catenin (green) and PKC ζ (red). Caveolin-1 immunostaining was used to label and differentiate the rear (full arrows) from the front of migrating cells (empty arrows).

Supplemental Figure 4: Polarity and adherens junction protein complexes are localized at the leading edge of migrating endothelial cells. Reciprocal immunoprecipitations of endogenous β -catenin (A) VE-cadherin (B) and Par6 (C) from BAEC lysates stimulated or not with Ang-1. Immunoprecipitates were subjected to western blot analysis with anti-PKC ζ anti- β -catenin, anti-VE-cadherin, and anti-Par6 antibodies. Immunoprecipitation with the control antibody (IgG) was used to confirm the specificity of these proteins interactions. (D) Representative immunofluorescence micrographs showing colocalization of β -catenin, α -catenin and Par6 at the leading

edge of migrating BAEC subjected to Ang-1 stimulation (bottom panel) compared to control (Top panel). Scale bar, 20 μ m.

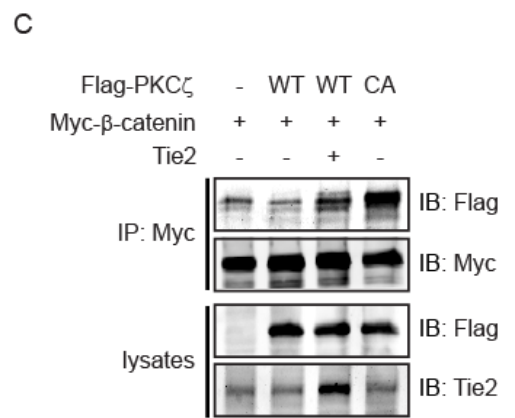
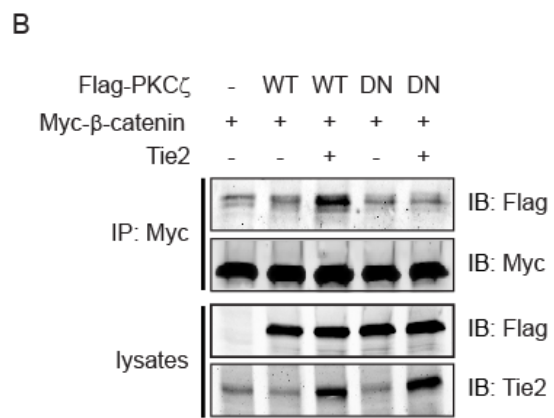
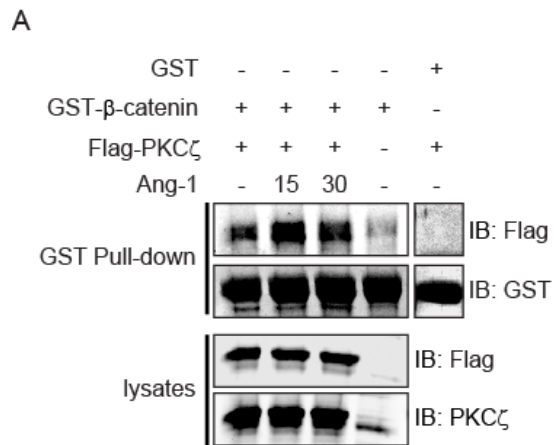
Supplemental Figure 5: Tie2 does not associate with the PKC ζ / β -catenin complex.

(A) Immunoprecipitation of endogenous PKC ζ and reciprocally Tie2 from BAEC lysates stimulated or not with Ang-1. Immunoprecipitates were subjected to immunoblot analysis with anti-PKC ζ , anti- β -catenin, anti-Tie2 antibodies. Immunoprecipitation with control antibody (IgG) was performed as a control. (B) Representative immunofluorescence micrographs showing the cellular localization of β -catenin and Tie2 in confluent BAEC and (C) of PKC ζ and Tie2 in migrating BAEC subjected to Ang-1 stimulation (bottom panel) or left untreated (Top panel). Higher magnification views of the boxed regions are shown. Scale bar, 20 μ m.

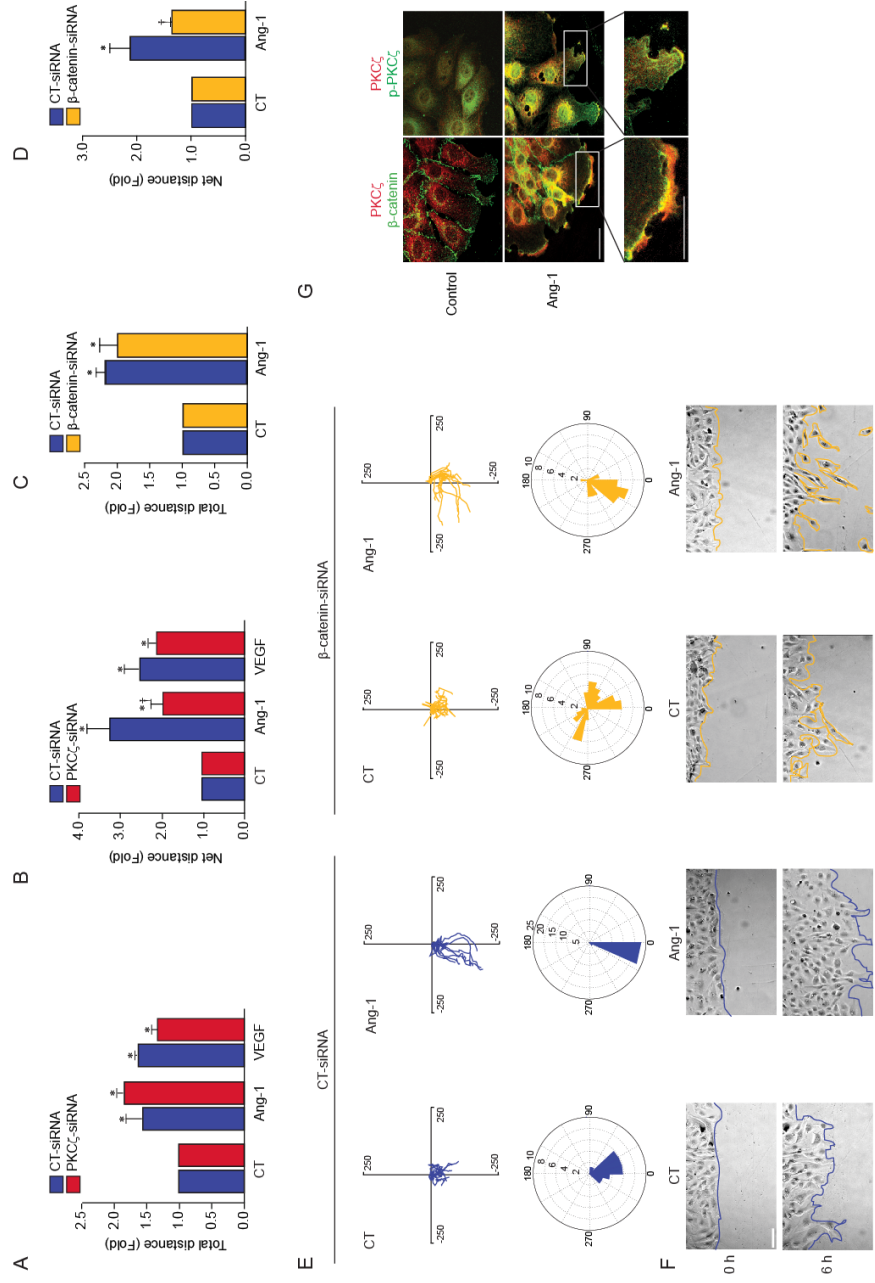
Supplemental Figure 6: Fluorescent images of YFP corresponding to FRET time-lapse imaging series presented in Figure 5A. BAEC expressing CFP-Rac-YFP construct and transfected with CT-siRNA or PKC ζ -siRNA were subjected to Ang-1 stimulation for the indicated time (in min) following wounding. The YFP fluorescence images show cell transfection efficacy of the Rac biosensor (yellow from YFP fluorescence). Non-transfected neighboring cells were outlined in white to show the position of YFP-Rac-CFP transfected cells at the front of migration. Scale bar, 20 μ m.

Supplemental Table I: β -catenin peptides identified by LC-MS/MS.

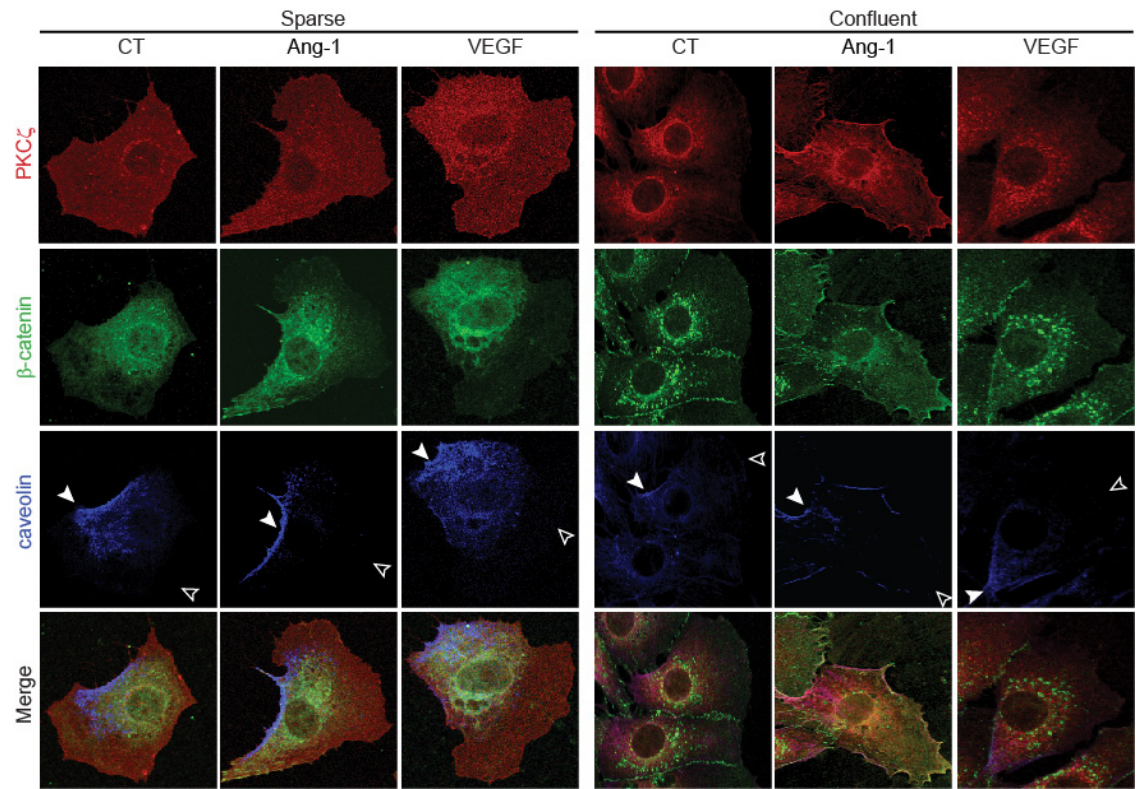
Protein	Protein Score	Observed (M/Z)	Mass accuracy (Da)	Peptide Score	Peptides
Catenin (Cadherin-associated protein)beta; CTNNB1 P35222	190	626.3506	0.0003	49	R.LSVELTSSLFR
		741.3912	0.0005	84	R.NEGVATYAAAVLFR
		1214.678	0.0107	59	R.GLNTIPLFVQLLYSPIENIQR



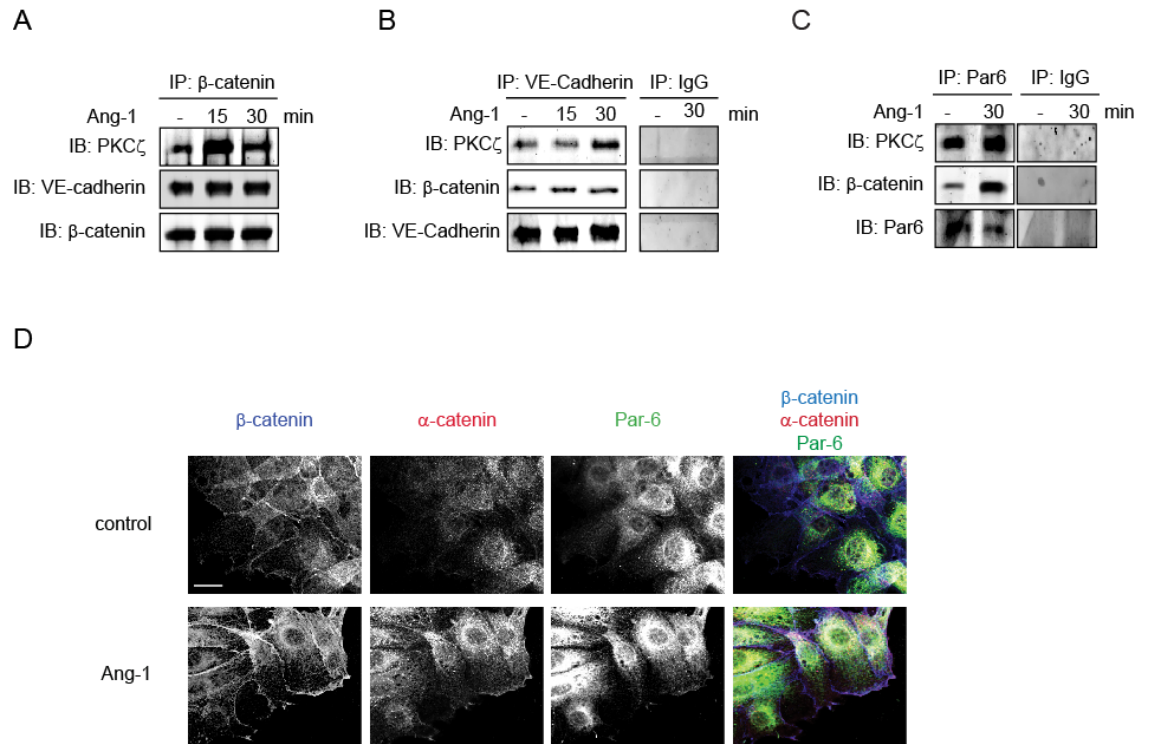
Supplementary Figure 1



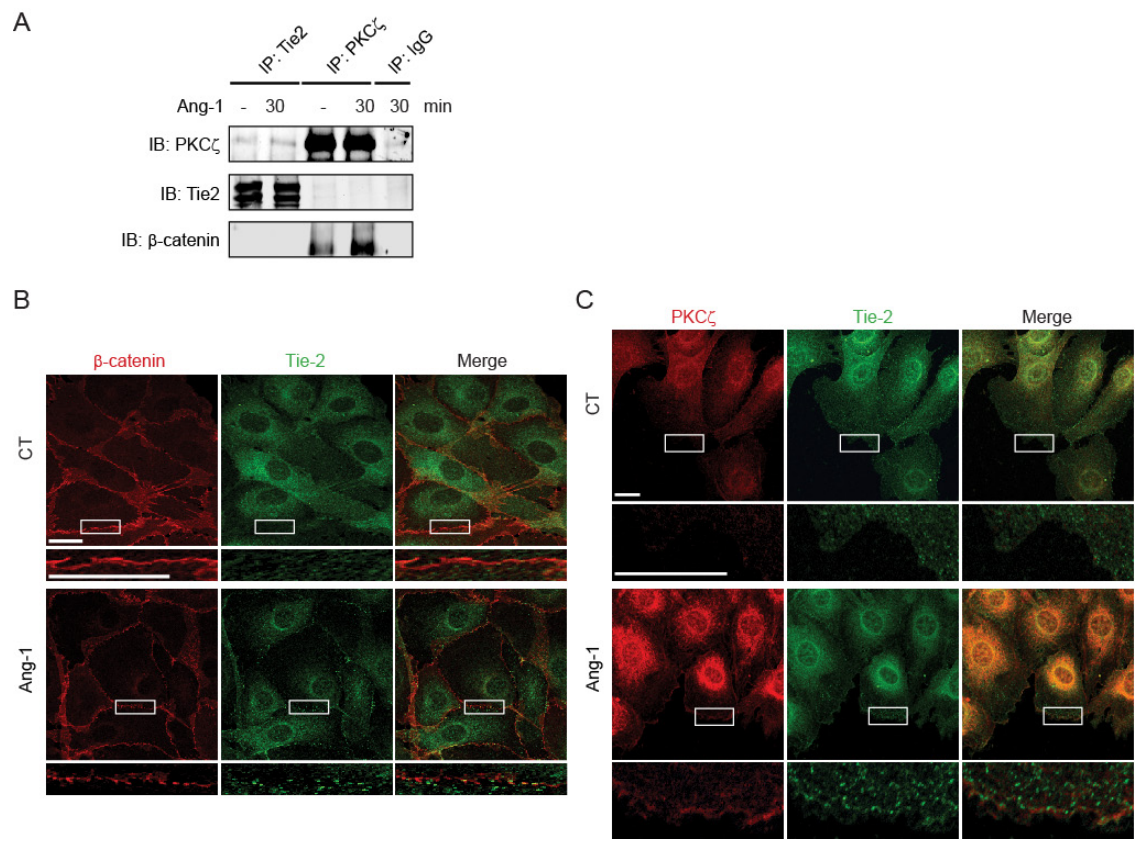
Supplementary Figure 2



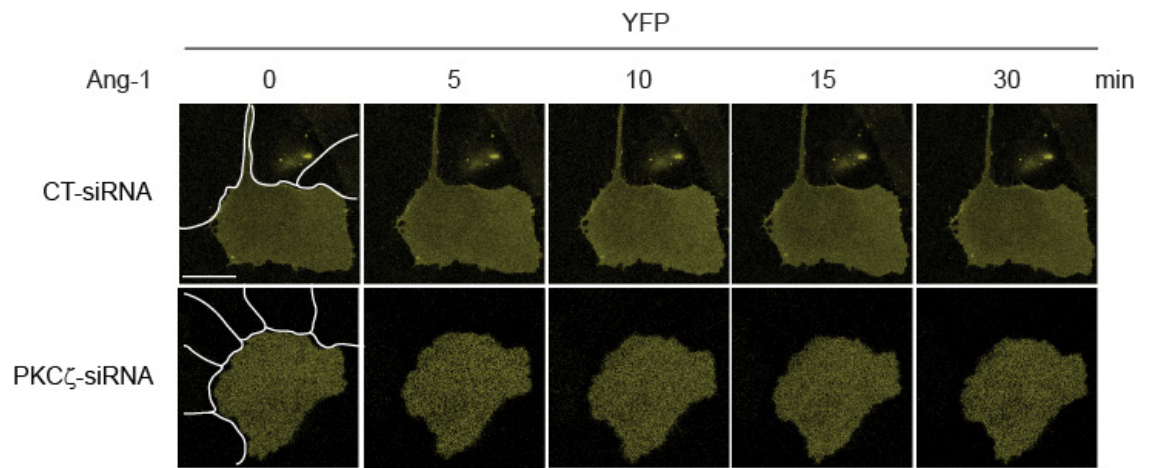
Supplementary Figure 3



Supplementary Figure 4



Supplementary Figure 5



Supplementary Figure 6

DISCUSSION

Il est bien établi que le VEGF et l'Ang-1 partagent de nombreuses propriétés fonctionnelles qui contribuent à l'induction de l'angiogenèse et de la vasculogenèse.^{89,200,240} Cependant, contrairement au VEGF, l'Ang-1 promeut la maturation, la stabilisation vasculaire et modifie les molécules d'adhésion et les jonctions intercellulaires endothéliales.^{192,399} Tout comme le VEGF, l'Ang-1 induit la prolifération, la migration et la survie des CE mais contrecarre les effets de perméabilité induits par le VEGF.^{237,393,453} Il est bien établi que le NO libéré par les CE après l'activation d'eNOS, contribue aux effets proangiogéniques et à la perméabilité induite par le VEGF. Les effets de l'Ang-1 sur l'activité d'eNOS restent controversés. Quelques études ont montré auparavant qu'eNOS est phosphorylé sur le site activateur, la Ser1179, suite à une stimulation à l'Ang-1. Nous avons indubitablement montré que la stimulation des CE par l'Ang-1 est incapable d'induire la production de NO confirmant ainsi ce qui a été déjà rapporté par d'autres groupes.⁴⁰³ Il est important de noter que les résultats qui attribuent les effets proangiogéniques de l'Ang-1 à la production de NO pourraient être expliqués par le fait que dans ces études, les Angiopoïéines recombinantes utilisées sont des chimères composées de la séquence de l'Ang-1 combinée à une séquence de l'Ang-2.^{404,405} L'effet antagoniste de l'Ang-2 sur l'Ang-1 pourrait expliquer certaines des divergences observées. Il serait aussi plausible que les effets proangiogéniques attribués à la production de NO en réponse à l'Ang-1 seraient le résultat d'une action directe sur l'expression du gène, eNOS, plutôt que d'une activation aiguë des voies de signalisation conduisant à l'activation d'eNOS et à la production de NO.

Nous avons montré que l'Ang-1 n'induit pas la production de NO dans les CE à cause d'une phosphorylation inhibitrice d'eNOS sur la Thr497 suite à la phosphorylation et à l'activation de la PKC ζ . Contrairement au VEGF, l'Ang-1 induit la phosphorylation de la Thr497, indépendamment du fait que l'Ang-1 induit également la phosphorylation d'eNOS sur la

Ser1179. Cela souligne l'importance de la régulation coordonnée de la phosphorylation/déphosphorylation sur ces deux résidus (Thr497 et Ser1179) pour une activation enzymatique optimale d'eNOS.⁴⁰⁸ On assiste peut-être avec l'Ang-1 à une dérégulation du flux d'électrons entre les différents domaines et les cofacteurs nécessaires pour catalyser la réaction enzymatique d'eNOS. Nous avons également fourni le mécanisme moléculaire avec lequel l'Ang-1 inhibe une des voies les plus importantes de l'activation d'eNOS et de la production de NO par le VEGF. Nos résultats ajoutent ainsi un nouveau mécanisme moléculaire à la régulation du processus d'inhibition de la perméabilité cellulaire par l'Ang-1 qui empêche la libération d'un modulateur essentiel de la perméabilité vasculaire *in vitro* et *in vivo*, le NO. Dans l'ensemble, cela démontre que plusieurs voies de signalisation en aval de l'Ang-1/Tie2 convergent pour induire la stabilisation de l'endothélium.^{192,202,246,399} Il reste à voir si certaines de ces voies de signalisation sont spécifiquement sollicitées *in vivo* dans certaines conditions physiologiques ou pathologiques.

L'Ang-1 et le VEGF déclenchent des cascades de signalisation qui diffèrent selon la localisation cellulaire de leur RTK respectifs. Ainsi la signalisation cellulaire en aval de l'Ang-1/Tie2 au niveau des contacts cellule-cellule diffère de celle qui émane des contacts cellule-matrice permettant deux types de fonctions cellulaires. Deux publications ont montré que dans les CE confluentes, des ponts d'Ang-1/Tie2 se forment aux contacts cellule-cellule.^{224,225} Il en résulte des interactions de Tie2 en trans et la phosphorylation d'eNOS et l'activation FOXO1 en aval.^{224,225} Les agrégats formés par Tie2 à l'interface cellule-cellule permettent une stabilisation endothéliale et une diminution marquée de la perméabilité endothéliale.^{200,204,454} En l'absence des contacts entre les cellules, l'Ang-1 induit la translocation de Tie2 en grappes à l'arrière de la cellule formant des structures similaires mais distinctes des contacts focaux. Même si le rôle de

ces agrégats de Tie2 n'a pas été étudié encore, leur localisation suggère leur participation à la migration cellulaire endothéliale.

Parallèlement, une série d'expériences récentes a montré que l'activation du VEGFR-2 par le VEGF lié à la matrice cause la phosphorylation prolongée de ce récepteur et favorise préférentiellement l'activation de p38, plutôt que l'activation d'AKT.^{455,456} L'association du VEGF avec la MEC induit la liaison du VEGFR-2 à l'intégrine β_1 .⁴⁵⁶ Par contre, l'activation du VEGFR-2 par le VEGF, sous sa forme soluble, ne s'associe pas aux protéines de la MEC et déclenche la formation d'un complexe qui comprend la NRP1 et l'intégrine β_3 .^{455,457} Ce dernier complexe est fonctionnellement et moléculairement distinct de celui qui est activé par le VEGF lié à la matrice et il en résulte deux formes distinctes d'expansion vasculaire: la croissance par germination (VEGF lié à la matrice) ou l'hyperplasie vasculaire (VEGF soluble).^{456,458}

L'Ang-1 est l'un des facteurs qui peut coordonner avec la signalisation déclenchée par le VEGF en favorisant ou en inhibant les réponses biologiques de celui-ci afin d'induire des vaisseaux fonctionnels. L'utilisation d'un modèle d'infarctus du myocarde chez la souris a permis de démontrer que la surexpression de l'Ang-1 et du VEGF atténue les effets de l'hyperméabilité induite par le VEGF.⁴⁵⁹ La surexpression de l'Ang-1 induit à elle seule une angiogenèse importante lors de l'occlusion de l'artère cérébrale chez la souris.⁴⁶⁰ Cependant, la coexpression de l'Ang-1 avec le VEGF n'induit pas plus d'angiogenèse comparativement à l'expression du VEGF seul ou de l'Ang-1 seule; cependant elle améliore l'intégrité vasculaire.

Les protéines de jonctions sont des molécules de signalisation importantes dans la physiologie et la pathologie vasculaire. En outre, la progression du cancer est souvent caractérisée par des vaisseaux sanguins désorganisés et perméables.^{30,31} Fait à noter, de nombreux médiateurs

angiogéniques et inflammatoires libérés dans le microenvironnement tumoral influencent le comportement des protéines de jonctions. Bien que différentes molécules aient été impliquées, les molécules composant la jonction d'adhérence cellulaire ont émergé comme des acteurs essentiels dans le maintien de l'intégrité de la barrière endothéliale et de l'homéostasie vasculaire, grâce à leurs propriétés d'adhésion et de signalisation cellulaire.

Nous avons montré que la PKC ζ atypique est activé e en aval de l'Ang-1/Tie2, et non pas du VEGF/VEGFR-2, afin d'assurer la stabilisation des jonctions cellulaires endothéliales. En revanche, en plus de l'inhibition de la production de NO, cet effet stabilisateur des jonctions par l'Ang-1 peut se faire indépendamment de l'inhibition de la production de NO.

Nous avons découvert que la β -caténine est un partenaire moléculaire de la PKC ζ dans les CE stimulées à l'Ang-1 ce qui nous a permis d'investiguer le rôle de cette association dans la polarité et la migration endothéliale. Il est établi depuis quelques années que les PKCs atypiques sont associées à la formation des jonctions serrées dans les cellules épithéliales polarisées et jouent un rôle important dans la migration polarisée des cellules épithéliales et les astrocytes.^{447,448} Au niveau de la cellule endothéliale, le sujet de la polarité cellulaire est très peu étudié et en est encore à ses débuts. Dans les CE activées, par un mécanisme paracrine, l'Ang-1 permet l'établissement d'une distribution moléculaire polarisée, spécifique et hautement régulée des complexes de Tie2.⁴⁶¹ La localisation de Tie2 dans les cellules isolées induit le blocage de la voie AKT alors que Dok-R sera phosphorylé. Dok-R activé interagit avec ras-GAP, Nck et Crk qui sont des molécules impliquées dans la migration cellulaire et la réorganisation du cytosquelette.^{227,462} Nous montrons, pour la première fois, que des structures en grappes de Tie2 se trouvent au niveau du front de la migration collective des cellules locomotives ainsi qu'au niveaux des contacts intercellulaires mais sans aucune colocalisation avec les protéines de

jonctions adhérentes²²⁵ Ceci suggère que différents événements de signalisation doivent émerger de ces structures de Tie2 afin de promouvoir la migration cellulaire.

Plusieurs études auparavant ont rapporté les rôles du VEGF et de l'Ang-1 dans la migration cellulaire.^{393,462} Néanmoins nous avons démontré la différence entre deux modes de migration induits par deux facteurs proangiogéniques puissants, l'Ang-1 et le VEGF. Contrairement au VEGF, l'Ang-1 induit la migration collective et persistante des CE. Nous avons découvert que l'Ang-1 induit l'association et la colocalisation de la PKC ζ atypique et de la β -caténine au niveau des jonctions d'adhérence et au front de migration des CE avec les protéines de polarité Par. D'une manière intéressante, en aval de l'Ang-1/Tie2, l'inhibition de l'activité de la PKC ζ ou la suppression de l'expression de la β -caténine entraînent une perte des contacts cellule-cellule et provoque un changement du mode de migration cellulaire de collectif et directionnel à un mode de migration individuel et aléatoire. Nous révélons aussi une localisation inhabituelle des protéines des jonctions d'adhérence, spécialement la VE-cadhérine nécessitant des interactions en trans d'homodimères, au front libre de la migration. Ceci suggère que les VE-cadhérines peuvent fonctionner comme un échafaudage pour le complexe de polarité indépendamment de leur engagement en homodimères. Cette forme précédemment inconnue de la VE-cadhérine aurait sans doute un rôle à jouer dans la polarité planaire et la migration directionnelle des CE. Nos données appuient le paradigme selon lequel la migration cellulaire directionnelle et persistante implique les déterminants de la polarité latérale situés au niveau des jonctions cellule-cellule et qui influencent le processus migratoire.^{420,437}

Au cours de la morphogenèse vasculaire, les GTPases Rho régulent diverses fonctions cellulaires telles que l'invasion des CE et la formation de la lumière vasculaire.⁴⁴⁵ Nos résultats suggèrent que Rac1 est un effecteur de la signalisation de la PKC ζ en aval de l'Ang-1/Tie2. Nous avons

montré aussi que Tiam1 est activé par l'Ang-1 et peut également être recruté au front de migration afin d'activer Rac1 et promouvoir ainsi la migration directionnelle des CE.⁴⁴⁰ Un tel mécanisme peut être déclenché suite à l'activation de PDK1 en amont de la PKC ζ qui avec Rac actif pourrait favoriser la fonction d'Arp2/3 en plus de Tiam1 au front de la migration collective par l'activation des complexes WAVE.⁴⁶³⁻⁴⁶⁵ Cependant, nos résultats indiquent aussi que cette activité de Rac1 polarisée en réponse à l'Ang-1 n'est pas nécessaire dans le cas d'une migration individuelle des CE où la PKC ζ (ou la β -caténine) a été supprimée. Ceci suggère qu'il existe une GTPases Rho autre que Rac1 impliquée dans la migration individuelle des CE.

Nos résultats montrent des défauts de croissance vasculaires très différents, chez les embryons du poisson zèbre déficients en PKC ζ , présentant de graves anomalies de germination des vaisseaux intersegmentaires (ISV). Récemment, d'autres groupes ont rapporté l'importance des molécules d'adhésion et de polarité cellulaire dans la croissance vasculaire. En effet, Dejana et Lampugnani ont montré que les souris déficientes en VE-cadhérine présentent aussi une polarité endothéliale aberrante et des défauts dans la formation de la lumière vasculaire.⁴²³ Un autre groupe³³⁹ a montré que l'intégrine β_1 se trouve en aval de la protéine de polarité Par3 dans une cascade de signalisation moléculaire nécessaire pour la polarité endothéliale et la formation de lumen. Lors du bourgeonnement angiogénique, les bourgeons en germination se convertissent en tubules endothéliaux et forment des connexions avec d'autres vaisseaux, ce qui nécessite la suppression locale de la motilité et la formation de nouvelles jonctions cellule-cellule.

Nos résultats de la migration en 2D *in vitro* des cellules n'exprimant pas PKC ζ montrent une perte de polarité et de persistance. Pareillement, lors de la germination vasculaire chez les embryons du poisson zèbre déficient en PKC ζ , les cellules de la pointe de l'aorte dorsale perdent

aussi bien le contact avec les cellules suivantes de la tige que la directionnalité et la persistance de la migration. Clairement, ces défauts de polarité suggèrent que la PKC ζ est un régulateur de la signalisation de polarité planaire dans les cellules de la pointe et coordonne le remodelage des contacts cellulaires au cours de la germination vasculaire. Ce phénotype observé chez les embryons déficients en PKC ζ est essentiellement caractéristique d'une perturbation de la polarité et de la spécification cellulaire. Cependant, il reste à déterminer si les CE au niveau de la pointe du bourgeon chez les embryons déficients en PKC ζ ont également perdu certains des déterminants du destin cellulaire de l'axe de signalisation Notch/Delta/VEGF qui pourraient contribuer à la génération d'un défaut au niveau des ISV.^{449,450} Il reste aussi à démontrer si la PKC ζ agit en aval de Tie2 ou d'autres sous-types spécifiques des récepteurs au VEGF pour coordonner la germination des ISV. Néanmoins, dans nos essais d'angiogenèse *in vitro*, on montre que l'Ang-1 favorise la germination endothéliale et que ce processus est coordonné par la PKC ζ et la β -caténine. Le résultat de la suppression de la PKC ζ est non seulement la réduction de la longueur des bourgeons, mais aussi une augmentation du nombre de ces bourgeons en réponse à la stimulation par l'Ang-1. Ces résultats soulignent l'importance de la PKC ζ et la β -caténine comme des facteurs déterminants dans l'établissement de la polarité au cours de la germination endothéliale en aval de l'activation de Tie2.

Au contact des cellules de la pointe, les CE de la tige prolifèrent et se différencient; elles sont, à ce stade, peu associées aux péricytes ou aux CML. À l'inverse, les CE de type «Phalanx» qui sont en étroite interaction avec les péricytes et les CML et restent ainsi dans un état quiescent. Fait intéressant, les CE de la tige et celles de type «Phalanx» expriment les récepteurs Tie-2 et pourraient également stocker l'Ang-2 dans les corps de Weibel-Palade. Il serait intéressant de voir l'expression et la distribution spatiotemporelle de notre complexe de jonctions d'adhérence

et des protéines et de polarité Par, essentiellement PKC ζ / β -caténine lors du bourgeonnement angiogénique.

Le maintien de la polarité ou de l'asymétrie avant-arrière est à la base de la persistance directionnelle. Une cellule en migration aléatoire se déplace le long de trajets avec plusieurs changements dans l'orientation.³⁷³ Il s'ensuit que la régulation de ce changement dans la directionnalité de la cellule détermine la fidélité de la migration cellulaire dirigée par des gradients chimiotactiques et d'autres indices spatiaux dynamiques et potentiellement concurrents. Nous avons démontré qu'en réponse à l'Ang-1, les CE continuent à migrer en absence de PKC ζ sans aucun défaut dans la vitesse de migration de la cellule semblable aux cellules où Rac a été supprimé.⁴⁶⁶ En outre, dans les CE transfectées par des siRNA dirigées contre la PKC ζ ou la β -caténine on assiste à une perte de la persistance et la directionnalité de la migration. Ces résultats suggèrent que la formation du complexe PKC ζ / β -caténine n'est pas nécessaire pour la migration des CE en soi, mais plutôt, pour une maintenance et pour une orientation du front de migration de la cellule endothéliale.⁴⁶⁷

En résumé, notre travail a permis de mettre en évidence la façon dont une unité de signalisation, contenant les protéines des jonctions d'adhérence et des protéines de polarité, favorise la migration collective et directionnelle des CE à la fois dans un contexte cellulaire, en réponse à l'Ang-1, et au cours de la germination vasculaire *in vivo*.

La caractérisation de l'association PKC ζ / β -caténine pourrait être d'intérêt afin de comprendre l'effet de cette interaction sur d'autres voies de signalisation telle que Wnt/ β -caténine. La présence de la β -caténine aux jonctions d'adhérence par le biais de son association avec la VE-cadhérine peut avoir des conséquences sur sa disponibilité pour les interactions avec d'autres

protéines cytoplasmiques ou nucléaires, qui pourraient affecter les activités transcriptionnelles de la β -caténine. Les voies de signalisation canonique et non canonique de Wnt/ β -caténine ont aussi été impliquées dans le développement vasculaire, l'angiogenèse et la régulation de la différenciation endothéliale.^{468,469} La voie Wnt active aussi la PKC ζ en induisant la phosphorylation soit de la β -caténine ou d'une autre protéine qui contrôle sa localisation nucléaire et facilite son interaction avec les facteurs nucléaires comme le TCF afin d'activer la transcription. On pourrait imaginer un modèle dans lequel la PKC ζ serait à l'intersection entre la voie Wnt/ β -caténine et la voie Ang-1/Tie2. Dans ce modèle, on peut supposer que l'association de la β -caténine avec la PKC ζ constitue une étape cruciale dans la régulation de la signalisation de la β -caténine. Bien qu'il soit bien connu que Wnt et les voies de signalisation de la PKC ζ sont tous les deux impliqués dans le processus de la cancérogenèse et la progression tumorale, la contribution synergique de ces processus ou le «cross-talk» entre eux ont récemment été étudiés.^{470,471} La PKC ζ est l'une des principales cibles de la voie de signalisation de Wnt. À cet égard, alors que l'interaction de la PKC ζ avec des éléments de signalisation canonique de Wnt comme GSK3 β avait été décrite précédemment, l'interaction entre la PKC ζ et la β -caténine n'avait pas été signalée auparavant.⁴⁷² Notre étude fournit la preuve qu'en aval de l'Ang-1/Tie2, la PKC ζ interagit sélectivement avec la β -caténine. Cette interaction pourrait moduler la voie canonique de Wnt. Il serait intéressant de savoir par quel mécanisme la PKC ζ assure la stabilité et/ou la localisation nucléaire, cytoplasmique ou membranaire de la β -caténine. Conformément à cela, nous avons obtenu des résultats qui indiquent que le traitement par des siRNA dirigées contre PKC ζ n'a aucun effet sur la stabilité ou l'expression de la β -caténine. Ceci suggère que la PKC ζ contrôle la localisation de la β -caténine plutôt que sa stabilité. La β -caténine associée à la PKC ζ pourrait fonctionner en parallèle à la déphosphorylation de la tyrosine au niveau de la β -

caténine et agir comme un catalyseur pour promouvoir la stabilisation des jonctions d'adhérence par l'Ang-1. La régulation de la phosphorylation de la β -caténine suite à son association à la PKC ζ et inversement pourrait donner une indication sur la façon dont cette association contrôle ou non l'activité et la disponibilité cytoplasmique ou membranaire de la β -caténine. Une meilleure compréhension du mécanisme moléculaire en amont et en aval de l'association PKC ζ / β -caténine dans différents contextes et types cellulaires permettrait de mieux cibler les interventions pharmacologiques contre le cancer et autres maladies associées à une altération de la signalisation de la β -caténine.⁴⁷³⁻⁴⁷⁵

Étant donné le double rôle du complexe PKC ζ / β -caténine, dans la migration directionnelle collective des cellules endothéliales dépendant étroitement de la localisation cellulaire, il serait pertinent de savoir si la formation de ce méga complexe se fait en aval de la phosphorylation d'eNOS ou bien si ce sont deux voies parallèles où la PKC ζ serait le point focal entre ces deux voies de signalisation. Une démonstration de la colocalisation d'eNOS avec le complexe PKC ζ / β -caténine, au niveau de la cellule endothéliale, permet de faire le lien mécanistique entre l'inhibition de la production de NO et de la perméabilité ainsi que la promotion de la migration directionnelle endothéliale collective. Néanmoins, dans la Figure 3D du premier manuscrit nous avons montré qu'eNOS phosphorylé au niveau de la Thr497 est bien localisé au niveau des contacts cellule-cellule dans des CE confluentes.²⁴⁵ Il reste à étudier la localisation d'eNOS au niveau des CE avec un phénotype migratoire collectif. Les modifications co-et post-traductionnelles aboutissent à la translocation de l'enzyme eNOS à la membrane plasmique des cavéoles. Étant donné la localisation d'eNOS actif au niveau des cavéoles et le rôle de la cavéoline-1, composante essentielle des cavéoles, dans la polarité cellulaire, il serait intéressant d'explorer le rôle d'eNOS dans la régulation de la polarité et la migration cellulaire.

En résumé, nos résultats révèlent un rôle central pour la PKC ζ dans la coordination des événements moléculaires impliqués dans l'inhibition de la perméabilité et dans la migration dirigée des CE et définissent un nouveau rôle pour cette kinase comme un facteur déterminant pour la liaison des complexes de polarité aux jonctions adhérentes en aval de l'Ang-1/Tie2.

Applications thérapeutiques éventuelles

Les effets biologiques du système Ang/Tie sont dépendants de leur contexte, ce qui remet en question le ciblage de cette voie comme meilleure stratégie thérapeutique. Notre travail sur la perméabilité et la migration régulée par l'Ang-1 permet de décortiquer et de comprendre l'image globale de ce que nous savons sur cet axe important dans la biologie cellulaire. Différentes options pour l'intervention thérapeutique doivent être considérées pour identifier le meilleur chemin à emprunter dans l'avenir. Le développement de médicaments ciblant le système Ang/Tie a été difficile étant donné les rôles complexes et souvent confondants de l'Ang-1 en biologie tumorale. Une meilleure compréhension de l'interrelation entre ces différents facteurs de croissance, spécialement les RTK, au cours du développement normal et au cours des pathologies vasculaires chez l'adulte pourrait conduire à leur application dans le traitement des maladies ischémiques et angiogéniques. Ainsi, quarante-six ans après, le concept émit par Judah Folkman est toujours une réalité sans équivoque «Une stratégie antiangiogénique pourrait devenir une nouvelle arme thérapeutique dans le traitement du cancer ».⁴⁷⁶

Étant donné les rôles importants, communs et opposés, de l'Ang-1 et du VEGF, l'utilisation de l'Ang-1 est d'un grand intérêt en combinaison avec le VEGF afin de promouvoir la croissance d'une vascularisation normale, stable et non perméable. Les applications thérapeutiques du

VEGF ont été testées dans un certain nombre de situations dans le but d'induire la croissance de nouveaux vaisseaux sanguins (angiogenèse thérapeutique).⁴⁷⁷ Toutefois, l'administration du VEGF cause certains effets secondaires principalement la formation de vaisseaux sanguins perméables.^{478,479} L'administration concomitante de l'Ang-1 et du VEGF aide à réduire l'hyperperméabilité induite par le VEGF sans supprimer la croissance vasculaire. Notre travail, ainsi que celui d'autres groupes, sur les actions du VEGF et de l'Ang-1 qui a permis d'identifier des voies de signalisation avec de nouveaux joueurs moléculaires aidera sans aucun doute à définir les différentes étapes de leur implication dans la croissance vasculaire.

CONCLUSION

Les études de la signalisation dans les CE vasculaires ne sont pas différentes des analyses faites dans d'autres types cellulaires, l'accent a été mis le plus souvent sur un facteur de croissance à la fois. Au cours des dernières années, cependant, une multitude d'études ont disséqué les interactions doubles et/ou tripartites. L'analyse de ces associations a mis en évidence une hiérarchie dans les réponses cellulaires au cours de l'angiogenèse. De plus, ces études ont révélé que les mêmes acteurs pourraient assumer des rôles distincts en fonction de l'état de la confluence des CE. En parallèle, au cours du bourgeonnement angiogénique on trouve une distribution moléculaire et une signalisation cellulaire qui diffèrent selon le type cellulaire (cellules de la pointe, cellules de la tige et celles de type Phalanx).^{22,183}

Cette thèse apporte sans aucun doute des avancées considérables dans la compréhension de la signalisation en aval d'Ang-1/Tie2 et du VEGF/VEGFR-2 et de la régulation des jonctions cellulaires, la perméabilité et la migration cellulaire endothéliale. De plus, les actions de l'Ang-1 et du VEGF qui ont été mises en évidence dans notre système expérimental *in vitro* ont des effets analogues quant à leurs rôles *in vivo*. Toutefois, il serait très intéressant de comprendre et de confirmer le (les) mécanisme(s) moléculaire(s) par lequel l'Ang-1 exerce ses effets d'antipermeabilité et de production de NO au cours du développement normal des vaisseaux sanguins et dans le cas de pathologie vasculaire. Dans la première partie de cette thèse nous avons montré que l'Ang-1 inhibe la libération de NO et la perméabilité transendothéliale induite par le VEGF en activant la PKC ζ qui phosphoryle eNOS sur la Thr497 et ainsi inhibe l'activité de l'enzyme. Dans la deuxième partie nous avons identifié un nouveau partenaire moléculaire de la PKC ζ en aval de l'Ang-1/Tie2. En effet, nos résultats indiquent que la formation du complexe PKC ζ / β -caténine dispose d'un double rôle dans l'induction de la migration cellulaire collective et directionnelle. Premièrement, l'association de la β -caténine et de la PKC ζ aux jonctions

d'adhérence contribue au resserrement et au maintien des contacts cellule-cellule lors de la migration. Deuxièmement, la formation du complexe à l'avant des cellules suite à une stimulation à l'Ang-1 va promouvoir la création d'un front de migration contenant des protéines des jonctions adhérentes et de polarité. Celles-ci vont permettre la distribution polarisée de Rac actif éventuellement par l'action de Tiam1. Dans l'ensemble, nos résultats confirment que l'activation des interactions cellule-cellule favorise la migration collective. Nous montrons aussi que la régulation différentielle du cytosquelette (Rac), en réponse à l'Ang-1, au niveau des jonctions d'adhérence comparée au front de migration des CE détermine la migration directionnelle persistante.

Finalement, nos résultats ouvrent un champ d'investigation dans le rôle de l'Ang-1 dans la polarité endothéliale et permet de relier deux complexes moléculaires (jonctions d'adhérence et de polarité Par) considérés, jusqu'à récemment, indépendants avec deux rôles fonctionnels distincts. Nos résultats fournissent aussi des preuves pour un rôle émergent des jonctions adhérentes dans la mise en place de la polarité endothéliale lors de la germination angiogénique où la migration guidée, directionnelle et collective.

Nos résultats et ceux d'autres groupes ouvriront une multitude de possibilités et de combinaisons d'agents anti-cancéreux. Par exemple, restaurer la fonction de PKC ζ dans des pathologies vasculaires pourrait être une cible très prometteuse pour la normalisation vasculaire dans les thérapies du cancer.

Les aspects de la dualité Ang-1/VEGF sont très complexes et nécessitent des études plus approfondies. Néanmoins, on a pu mettre en évidence le contraste de la signalisation Ang-1/VEGF dans des fonctions biologiques essentielles de la cellule endothéliale: la production de NO, la perméabilité, la migration et la polarité cellulaire où la PKC constitue un des points

focaux entre ces différentes voies. Il serait aussi pertinent de confirmer l'implication de ces mécanismes moléculaires et voies de signalisation au cours de la vasculogénèse et de l'angiogénèse physiologique et pathologique.

Bibliographie

1. Salvatore P, Pagliarulo C, Colicchio R, Napoli C. CXCR4-CXCL12-dependent inflammatory network and endothelial progenitors. *Curr Med Chem*. 2010;17(27):3019-3029.
2. Fiorito C, Rienzo M, Crimi E, et al. Antioxidants increase number of progenitor endothelial cells through multiple gene expression pathways. *Free Radic Res*. 2008;42(8):754-762.
3. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 1980;288(5789):373-376.
4. Tanaka KA, Key NS, Levy JH. Blood coagulation: hemostasis and thrombin regulation. *Anesth Analg*. 2009;108(5):1433-1446.
5. McEver RP, Moore KL, Cummings RD. Leukocyte trafficking mediated by selectin-carbohydrate interactions. *J Biol Chem*. 1995;270(19):11025-11028.
6. Languino LR, Plescia J, Duperray A, et al. Fibrinogen mediates leukocyte adhesion to vascular endothelium through an ICAM-1-dependent pathway. *Cell*. 1993;73(7):1423-1434.
7. Ait-Oufella H, Maury E, Lehoux S, Guidet B, Offenstadt G. The endothelium: physiological functions and role in microcirculatory failure during severe sepsis. *Intensive Care Med*. 2010;36(8):1286-1298.
8. Zhang X, Rozengurt E, Reed EF. HLA class I molecules partner with integrin beta4 to stimulate endothelial cell proliferation and migration. *Sci Signal*. 2010;3(149):ra85.
9. Montrucchio G, Alloatti G, Camussi G. Role of platelet-activating factor in cardiovascular pathophysiology. *Physiol Rev*. 2000;80(4):1669-1699.
10. Kyriakakis E, Cavallari M, Andert J, et al. Invariant natural killer T cells: linking inflammation and neovascularization in human atherosclerosis. *Eur J Immunol*. 2010;40(11):3268-3279.
11. Harhaj NS, Antonetti DA. Regulation of tight junctions and loss of barrier function in pathophysiology. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004;36(7):1206-1237.
12. Morita K, Sasaki H, Furuse M, Tsukita S. Endothelial claudin: claudin-5/TMVCF constitutes tight junction strands in endothelial cells. *J Cell Biol*. 1999;147(1):185-194.
13. Weber C, Fraemohs L, Dejana E. The role of junctional adhesion molecules in vascular inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2007;7(6):467-477.

14. Wittchen ES, Haskins J, Stevenson BR. 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*. 1999;274(49):35179-35185.
15. Dejana E, Lampugnani MG, Martinez-Estrada O, Bazzoni G. The molecular organization of endothelial junctions and their functional role in vascular morphogenesis and permeability. *Int J Dev Biol*. 2000;44(6):743-748.
16. Bukauskas FF, Verselis VK. Gap junction channel gating. *Biochim Biophys Acta*. 2004;1662(1-2):42-60.
17. Gomes P, Srinivas SP, Vereecke J, Himpens B. Gap junctional intercellular communication in bovine corneal endothelial cells. *Exp Eye Res*. 2006;83(5):1225-1237.
18. Wolfle SE, Schmidt VJ, Hoepfl B, et al. Connexin45 cannot replace the function of connexin40 in conducting endothelium-dependent dilations along arterioles. *Circ Res*. 2007;101(12):1292-1299.
19. Wong CW, Christen T, Roth I, et al. Connexin37 protects against atherosclerosis by regulating monocyte adhesion. *Nat Med*. 2006;12(8):950-954.
20. Xin D, Bloomfield SA. Dark- and light-induced changes in coupling between horizontal cells in mammalian retina. *J Comp Neurol*. 1999;405(1):75-87.
21. Gotsch U, Borges E, Bosse R, et al. VE-cadherin antibody accelerates neutrophil recruitment in vivo. *J Cell Sci*. 1997;110 (Pt 5):583-588.
22. Corada M, Mariotti M, Thurston G, et al. Vascular endothelial-cadherin is an important determinant of microvascular integrity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(17):9815-9820.
23. Yamada S, Pokutta S, Drees F, Weis WI, Nelson WJ. Deconstructing the cadherin-catenin-actin complex. *Cell*. 2005;123(5):889-901.
24. Abe K, Takeichi M. EPLIN mediates linkage of the cadherin catenin complex to F-actin and stabilizes the circumferential actin belt. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(1):13-19.
25. Xiao K, Allison DF, Buckley KM, et al. Cellular levels of p120 catenin function as a set point for cadherin expression levels in microvascular endothelial cells. *J Cell Biol*. 2003;163(3):535-545.
26. Gavard J, Gutkind JS. VEGF controls endothelial-cell permeability by promoting the beta-arrestin-dependent endocytosis of VE-cadherin. *Nat Cell Biol*. 2006;8(11):1223-1234.
27. Tepass U. The Apical Polarity Protein Network in Drosophila Epithelial Cells: Regulation of Polarity, Junctions, Morphogenesis, Cell Growth, and Survival. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2012.

28. Nagy JA, Benjamin L, Zeng H, Dvorak AM, Dvorak HF. Vascular permeability, vascular hyperpermeability and angiogenesis. *Angiogenesis*. 2008;11(2):109-119.
29. Nagy JA, Dvorak AM, Dvorak HF. Vascular hyperpermeability, angiogenesis, and stroma generation. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012;2(2):a006544.
30. Gratton JP, Lin MI, Yu J, et al. Selective inhibition of tumor microvascular permeability by cavtratin blocks tumor progression in mice. *Cancer Cell*. 2003;4(1):31-39.
31. Weis S, Cui J, Barnes L, Cheres D. Endothelial barrier disruption by VEGF-mediated Src activity potentiates tumor cell extravasation and metastasis. *J Cell Biol*. 2004;167(2):223-229.
32. Sun Y, Hu G, Zhang X, Minshall RD. Phosphorylation of caveolin-1 regulates oxidant-induced pulmonary vascular permeability via paracellular and transcellular pathways. *Circ Res*. 2009;105(7):676-685, 615 p following 685.
33. Song L, Ge S, Pachter JS. Caveolin-1 regulates expression of junction-associated proteins in brain microvascular endothelial cells. *Blood*. 2007;109(4):1515-1523.
34. Carmeliet P. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature*. 2005;438(7070):932-936.
35. Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature*. 1997;386(6626):671-674.
36. Ortega N, Sordello S, Plouet J. [Tumoral vascularization: physiopathology and therapeutic prospects]. *Bull Cancer*. 1997;84(4):391-395.
37. Liekens S, De Clercq E, Neyts J. Angiogenesis: regulators and clinical applications. *Biochem Pharmacol*. 2001;61(3):253-270.
38. Abdelrahim M, Konduri S, Basha R, Philip PA, Baker CH. Angiogenesis: an update and potential drug approaches (review). *Int J Oncol*. 2010;36(1):5-18.
39. Chung AS, Lee J, Ferrara N. Targeting the tumour vasculature: insights from physiological angiogenesis. *Nat Rev Cancer*. 2010;10(7):505-514.
40. Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev*. 1997;18(1):4-25.
41. Walsh DA. Pathophysiological mechanisms of angiogenesis. *Adv Clin Chem*. 2007;44:187-221.
42. Carmeliet P. VEGF gene therapy: stimulating angiogenesis or angioma-genesis? *Nat Med*. 2000;6(10):1102-1103.

43. Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*. 2000;407(6801):249-257.
44. Cross MJ, Claesson-Welsh L. FGF and VEGF function in angiogenesis: signalling pathways, biological responses and therapeutic inhibition. *Trends Pharmacol Sci*. 2001;22(4):201-207.
45. Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med*. 2003;9(6):653-660.
46. Schor AM, Ellis I, Schor SL. Chemotaxis and Chemokinesis in 3D Macromolecular Matrices : Relevance to Angiogenesis. *Methods Mol Med*. 2001;46:163-183.
47. Pepper MS. Lymphangiogenesis and tumor metastasis: more questions than answers. *Lymphology*. 2000;33(4):144-147.
48. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*. 1997;275(5302):964-967.
49. Hanahan D, Christofori G, Naik P, Arbeit J. Transgenic mouse models of tumour angiogenesis: the angiogenic switch, its molecular controls, and prospects for preclinical therapeutic models. *Eur J Cancer*. 1996;32A(14):2386-2393.
50. Bentley K, Gerhardt H, Bates PA. Agent-based simulation of notch-mediated tip cell selection in angiogenic sprout initialisation. *J Theor Biol*. 2008;250(1):25-36.
51. Gerhardt H, Golding M, Fruttiger M, et al. VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *J Cell Biol*. 2003;161(6):1163-1177.
52. Hlatky L, Tsionou C, Hahnfeldt P, Coleman CN. Mammary fibroblasts may influence breast tumor angiogenesis via hypoxia-induced vascular endothelial growth factor up-regulation and protein expression. *Cancer Res*. 1994;54(23):6083-6086.
53. Crowther M, Brown NJ, Bishop ET, Lewis CE. Microenvironmental influence on macrophage regulation of angiogenesis in wounds and malignant tumors. *J Leukoc Biol*. 2001;70(4):478-490.
54. O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y, et al. Angiostatin: a circulating endothelial cell inhibitor that suppresses angiogenesis and tumor growth. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1994;59:471-482.
55. O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y, et al. Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell*. 1994;79(2):315-328.
56. Klagsbrun M, Moses MA. Molecular angiogenesis. *Chem Biol*. 1999;6(8):R217-224.

57. Saharinen P, Bry M, Alitalo K. How do angiopoietins Tie in with vascular endothelial growth factors? *Curr Opin Hematol*. 2010;17(3):198-205.
58. Senger DR, Perruzzi CA, Feder J, Dvorak HF. A highly conserved vascular permeability factor secreted by a variety of human and rodent tumor cell lines. *Cancer Res*. 1986;46(11):5629-5632.
59. Criscuolo GR, Merrill MJ, Oldfield EH. Further characterization of malignant glioma-derived vascular permeability factor. *J Neurosurg*. 1988;69(2):254-262.
60. Criscuolo GR, Lelkes PI, Rotrosen D, Oldfield EH. Cytosolic calcium changes in endothelial cells induced by a protein product of human gliomas containing vascular permeability factor activity. *J Neurosurg*. 1989;71(6):884-891.
61. Keck PJ, Hauser SD, Krivi G, et al. Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF. *Science*. 1989;246(4935):1309-1312.
62. Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science*. 1989;246(4935):1306-1309.
63. Favard C, Moukadiri H, Dorey C, Praloran V, Plouet J. Purification and biological properties of vasculotropin, a new angiogenic cytokine. *Biol Cell*. 1991;73(1):1-6.
64. Ferrara N. Role of vascular endothelial growth factor in regulation of physiological angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2001;280(6):C1358-1366.
65. Ferrara N, Gerber HP. The role of vascular endothelial growth factor in angiogenesis. *Acta Haematol*. 2001;106(4):148-156.
66. Townson S, Lagercrantz J, Grimmond S, et al. Characterization of the murine VEGF-related factor gene. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996;220(3):922-928.
67. Aase K, Lymboussaki A, Kaipainen A, Olofsson B, Alitalo K, Eriksson U. Localization of VEGF-B in the mouse embryo suggests a paracrine role of the growth factor in the developing vasculature. *Dev Dyn*. 1999;215(1):12-25.
68. Byrne AM, Bouchier-Hayes DJ, Harmey JH. Angiogenic and cell survival functions of vascular endothelial growth factor (VEGF). *J Cell Mol Med*. 2005;9(4):777-794.
69. Mattila MM, Ruohola JK, Karpanen T, Jackson DG, Alitalo K, Harkonen PL. VEGF-C induced lymphangiogenesis is associated with lymph node metastasis in orthotopic MCF-7 tumors. *Int J Cancer*. 2002;98(6):946-951.
70. Takahashi H, Shibuya M. The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. *Clin Sci (Lond)*. 2005;109(3):227-241.

71. Ogawa S, Oku A, Sawano A, Yamaguchi S, Yazaki Y, Shibuya M. A novel type of vascular endothelial growth factor, VEGF-E (NZ-7 VEGF), preferentially utilizes KDR/Flk-1 receptor and carries a potent mitotic activity without heparin-binding domain. *J Biol Chem.* 1998;273(47):31273-31282.
72. Suto K, Yamazaki Y, Morita T, Mizuno H. Crystal structures of novel vascular endothelial growth factors (VEGF) from snake venoms: insight into selective VEGF binding to kinase insert domain-containing receptor but not to fms-like tyrosine kinase-1. *J Biol Chem.* 2005;280(3):2126-2131.
73. Lyttle DJ, Fraser KM, Fleming SB, Mercer AA, Robinson AJ. Homologs of vascular endothelial growth factor are encoded by the poxvirus orf virus. *J Virol.* 1994;68(1):84-92.
74. Mercer AA, Wise LM, Scagliarini A, et al. Vascular endothelial growth factors encoded by Orf virus show surprising sequence variation but have a conserved, functionally relevant structure. *J Gen Virol.* 2002;83(Pt 11):2845-2855.
75. Wise LM, Ueda N, Dryden NH, et al. Viral vascular endothelial growth factors vary extensively in amino acid sequence, receptor-binding specificities, and the ability to induce vascular permeability yet are uniformly active mitogens. *J Biol Chem.* 2003;278(39):38004-38014.
76. Ribatti D. The discovery of the placental growth factor and its role in angiogenesis: a historical review. *Angiogenesis.* 2008;11(3):215-221.
77. Errico M, Riccioni T, Iyer S, et al. Identification of placenta growth factor determinants for binding and activation of Flt-1 receptor. *J Biol Chem.* 2004;279(42):43929-43939.
78. Olofsson B, Korpelainen E, Pepper MS, et al. Vascular endothelial growth factor B (VEGF-B) binds to VEGF receptor-1 and regulates plasminogen activator activity in endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(20):11709-11714.
79. Milkiewicz M, Hudlicka O, Shiner R, Egginton S, Brown MD. Vascular endothelial growth factor mRNA and protein do not change in parallel during non-inflammatory skeletal muscle ischaemia in rat. *J Physiol.* 2006;577(Pt 2):671-678.
80. Harper SJ, Bates DO. VEGF-A splicing: the key to anti-angiogenic therapeutics? *Nat Rev Cancer.* 2008;8(11):880-887.
81. Stutfeld E, Ballmer-Hofer K. Structure and function of VEGF receptors. *IUBMB Life.* 2009;61(9):915-922.
82. Houck KA, Ferrara N, Winer J, Cachianes G, Li B, Leung DW. The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. *Mol Endocrinol.* 1991;5(12):1806-1814.

83. Tischer E, Mitchell R, Hartman T, et al. The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J Biol Chem.* 1991;266(18):11947-11954.
84. Shima DT, Kuroki M, Deutsch U, Ng YS, Adamis AP, D'Amore PA. The mouse gene for vascular endothelial growth factor. Genomic structure, definition of the transcriptional unit, and characterization of transcriptional and post-transcriptional regulatory sequences. *J Biol Chem.* 1996;271(7):3877-3883.
85. Cleaver O, Krieg PA. VEGF mediates angioblast migration during development of the dorsal aorta in *Xenopus*. *Development.* 1998;125(19):3905-3914.
86. Ruhrberg C, Gerhardt H, Golding M, et al. Spatially restricted patterning cues provided by heparin-binding VEGF-A control blood vessel branching morphogenesis. *Genes Dev.* 2002;16(20):2684-2698.
87. Papetti M, Herman IM. Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2002;282(5):C947-970.
88. Ferrara N, Henzel WJ. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1989;161(2):851-858.
89. Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H, et al. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature.* 1996;380(6573):439-442.
90. Gerber HP, Hillan KJ, Ryan AM, et al. VEGF is required for growth and survival in neonatal mice. *Development.* 1999;126(6):1149-1159.
91. Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature.* 2000;407(6801):242-248.
92. Breier G, Albrecht U, Sterrer S, Risau W. Expression of vascular endothelial growth factor during embryonic angiogenesis and endothelial cell differentiation. *Development.* 1992;114(2):521-532.
93. Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, et al. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature.* 1996;380(6573):435-439.
94. Grunewald FS, Prota AE, Giese A, Ballmer-Hofer K. Structure-function analysis of VEGF receptor activation and the role of coreceptors in angiogenic signaling. *Biochim Biophys Acta.* 2010;1804(3):567-580.
95. Ferrara N, Bunting S. Vascular endothelial growth factor, a specific regulator of angiogenesis. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 1996;5(1):35-44.

96. Olsson AK, Dimberg A, Kreuger J, Claesson-Welsh L. VEGF receptor signalling - in control of vascular function. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006;7(5):359-371.
97. Gluzman-Poltorak Z, Cohen T, Herzog Y, Neufeld G. Neuropilin-2 is a receptor for the vascular endothelial growth factor (VEGF) forms VEGF-145 and VEGF-165. *J Biol Chem.* 2000;275(38):29922.
98. Soker S, Takashima S, Miao HQ, Neufeld G, Klagsbrun M. Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell.* 1998;92(6):735-745.
99. Fong GH, Rossant J, Gertsenstein M, Breitman ML. Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature.* 1995;376(6535):66-70.
100. Fong GH, Zhang L, Bryce DM, Peng J. Increased hemangioblast commitment, not vascular disorganization, is the primary defect in flt-1 knock-out mice. *Development.* 1999;126(13):3015-3025.
101. Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, et al. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature.* 1995;376(6535):62-66.
102. Dumont DJ, Jussila L, Taipale J, et al. Cardiovascular failure in mouse embryos deficient in VEGF receptor-3. *Science.* 1998;282(5390):946-949.
103. Shinkai A, Ito M, Anazawa H, Yamaguchi S, Shitara K, Shibuya M. Mapping of the sites involved in ligand association and dissociation at the extracellular domain of the kinase insert domain-containing receptor for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem.* 1998;273(47):31283-31288.
104. Gille H, Kowalski J, Yu L, et al. A repressor sequence in the juxtamembrane domain of Flt-1 (VEGFR-1) constitutively inhibits vascular endothelial growth factor-dependent phosphatidylinositol 3'-kinase activation and endothelial cell migration. *EMBO J.* 2000;19(15):4064-4073.
105. Meyer RD, Mohammadi M, Rahimi N. A single amino acid substitution in the activation loop defines the decoy characteristic of VEGFR-1/FLT-1. *J Biol Chem.* 2006;281(2):867-875.
106. Ito N, Wernstedt C, Engstrom U, Claesson-Welsh L. Identification of vascular endothelial growth factor receptor-1 tyrosine phosphorylation sites and binding of SH2 domain-containing molecules. *J Biol Chem.* 1998;273(36):23410-23418.
107. Huang K, Andersson C, Roomans GM, Ito N, Claesson-Welsh L. Signaling properties of VEGF receptor-1 and -2 homo- and heterodimers. *Int J Biochem Cell Biol.* 2001;33(4):315-324.

108. Pajusola K, Aprelikova O, Armstrong E, Morris S, Alitalo K. Two human FLT4 receptor tyrosine kinase isoforms with distinct carboxy terminal tails are produced by alternative processing of primary transcripts. *Oncogene*. 1993;8(11):2931-2937.
109. Carmeliet P, De Smet F, Loges S, Mazzone M. Branching morphogenesis and antiangiogenesis candidates: tip cells lead the way. *Nat Rev Clin Oncol*. 2009;6(6):315-326.
110. Tammela T, Zarkada G, Wallgard E, et al. Blocking VEGFR-3 suppresses angiogenic sprouting and vascular network formation. *Nature*. 2008;454(7204):656-660.
111. Alam A, Herault JP, Barron P, et al. Heterodimerization with vascular endothelial growth factor receptor-2 (VEGFR-2) is necessary for VEGFR-3 activity. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;324(2):909-915.
112. Dixelius J, Makinen T, Wirzenius M, et al. Ligand-induced vascular endothelial growth factor receptor-3 (VEGFR-3) heterodimerization with VEGFR-2 in primary lymphatic endothelial cells regulates tyrosine phosphorylation sites. *J Biol Chem*. 2003;278(42):40973-40979.
113. Nilsson I, Bahram F, Li X, et al. VEGF receptor 2/-3 heterodimers detected in situ by proximity ligation on angiogenic sprouts. *EMBO J*. 2010;29(8):1377-1388.
114. Goldman J, Rutkowski JM, Shields JD, et al. Cooperative and redundant roles of VEGFR-2 and VEGFR-3 signaling in adult lymphangiogenesis. *FASEB J*. 2007;21(4):1003-1012.
115. McColl BK, Baldwin ME, Roufail S, et al. Plasmin activates the lymphangiogenic growth factors VEGF-C and VEGF-D. *J Exp Med*. 2003;198(6):863-868.
116. Flamme I, Breier G, Risau W. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptor 2 (flk-1) are expressed during vasculogenesis and vascular differentiation in the quail embryo. *Dev Biol*. 1995;169(2):699-712.
117. Ebos JM, Bocci G, Man S, et al. A naturally occurring soluble form of vascular endothelial growth factor receptor 2 detected in mouse and human plasma. *Mol Cancer Res*. 2004;2(6):315-326.
118. Albuquerque RJ, Hayashi T, Cho WG, et al. Alternatively spliced vascular endothelial growth factor receptor-2 is an essential endogenous inhibitor of lymphatic vessel growth. *Nat Med*. 2009;15(9):1023-1030.
119. Becker J, Pavlakovic H, Ludewig F, et al. Neuroblastoma progression correlates with downregulation of the lymphangiogenesis inhibitor sVEGFR-2. *Clin Cancer Res*. 2010;16(5):1431-1441.

120. Pavlakovic H, Becker J, Albuquerque R, Wilting J, Ambati J. Soluble VEGFR-2: an antilymphangiogenic variant of VEGF receptors. *Ann N Y Acad Sci.* 2010;1207 Suppl 1:E7-15.
121. Lorquet S, Berndt S, Blacher S, et al. Soluble forms of VEGF receptor-1 and -2 promote vascular maturation via mural cell recruitment. *FASEB J.* 2010;24(10):3782-3795.
122. Rahimi N, Dayanir V, Lashkari K. Receptor chimeras indicate that the vascular endothelial growth factor receptor-1 (VEGFR-1) modulates mitogenic activity of VEGFR-2 in endothelial cells. *J Biol Chem.* 2000;275(22):16986-16992.
123. Rechka A, Neagoe PE, Gratton JP, Sirois MG. Identification of VEGF receptor-2 tyrosine phosphorylation sites involved in VEGF-mediated endothelial platelet-activating factor synthesis. *Can J Physiol Pharmacol.* 2010;88(10):968-976.
124. Blanes MG, Oubaha M, Rautureau Y, Gratton JP. Phosphorylation of tyrosine 801 of vascular endothelial growth factor receptor-2 is necessary for Akt-dependent endothelial nitric-oxide synthase activation and nitric oxide release from endothelial cells. *J Biol Chem.* 2007;282(14):10660-10669.
125. Wei W, Jin H, Chen ZW, Zioncheck TF, Yim AP, He GW. Vascular endothelial growth factor-induced nitric oxide- and PGI₂-dependent relaxation in human internal mammary arteries: a comparative study with KDR and Flt-1 selective mutants. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2004;44(5):615-621.
126. Gerber HP, McMurtrey A, Kowalski J, et al. 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.* 1998;273(46):30336-30343.
127. Thakker GD, Hajjar DP, Muller WA, Rosengart TK. The role of phosphatidylinositol 3-kinase in vascular endothelial growth factor signaling. *J Biol Chem.* 1999;274(15):10002-10007.
128. Fresno Vara JA, Casado E, de Castro J, Cejas P, Belda-Iniesta C, Gonzalez-Baron M. PI3K/Akt signalling pathway and cancer. *Cancer Treat Rev.* 2004;30(2):193-204.
129. Song G, Ouyang G, Bao S. The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *J Cell Mol Med.* 2005;9(1):59-71.
130. Fulton D, Gratton JP, McCabe TJ, et al. Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature.* 1999;399(6736):597-601.
131. Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, et al. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell.* 1999;96(6):857-868.
132. Carmeliet P, Lampugnani MG, Moons L, et al. Targeted deficiency or cytosolic truncation of the VE-cadherin gene in mice impairs VEGF-mediated endothelial survival and angiogenesis. *Cell.* 1999;98(2):147-157.

133. Weis S, Shintani S, Weber A, et al. Src blockade stabilizes a Flk/cadherin complex, reducing edema and tissue injury following myocardial infarction. *J Clin Invest.* 2004;113(6):885-894.
134. Frisch SM, Ruoslahti E. Integrins and anoikis. *Curr Opin Cell Biol.* 1997;9(5):701-706.
135. Levkau B, Herren B, Koyama H, Ross R, Raines EW. Caspase-mediated cleavage of focal adhesion kinase pp125FAK and disassembly of focal adhesions in human endothelial cell apoptosis. *J Exp Med.* 1998;187(4):579-586.
136. Abedi H, Zachary I. Vascular endothelial growth factor stimulates tyrosine phosphorylation and recruitment to new focal adhesions of focal adhesion kinase and paxillin in endothelial cells. *J Biol Chem.* 1997;272(24):15442-15451.
137. Dvorak HF. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. *J Clin Oncol.* 2002;20(21):4368-4380.
138. Fukumura D, Gohongi T, Kadambi A, et al. Predominant role of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis and vascular permeability. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(5):2604-2609.
139. Giancotti FG, Ruoslahti E. Integrin signaling. *Science.* 1999;285(5430):1028-1032.
140. Lamalice L, Le Boeuf F, Huot J. Endothelial cell migration during angiogenesis. *Circ Res.* 2007;100(6):782-794.
141. Koch S, Tugues S, Li X, Gualandi L, Claesson-Welsh L. Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. *Biochem J.* 2011;437(2):169-183.
142. Neufeld G, Kessler O, Herzog Y. The interaction of Neuropilin-1 and Neuropilin-2 with tyrosine-kinase receptors for VEGF. *Adv Exp Med Biol.* 2002;515:81-90.
143. Somanath PR, Malinin NL, Byzova TV. Cooperation between integrin alphavbeta3 and VEGFR2 in angiogenesis. *Angiogenesis.* 2009;12(2):177-185.
144. Sawamiphak S, Seidel S, Essmann CL, et al. Ephrin-B2 regulates VEGFR2 function in developmental and tumour angiogenesis. *Nature.* 2010;465(7297):487-491.
145. Tessler S, Rockwell P, Hicklin D, et al. Heparin modulates the interaction of VEGF165 with soluble and cell associated flk-1 receptors. *J Biol Chem.* 1994;269(17):12456-12461.
146. Ballmer-Hofer K, Andersson AE, Ratcliffe LE, Berger P. Neuropilin-1 promotes VEGFR-2 trafficking through Rab11 vesicles thereby specifying signal output. *Blood.* 2011;118(3):816-826.

147. Neufeld G, Cohen T, Shraga N, Lange T, Kessler O, Herzog Y. The neuropilins: multifunctional semaphorin and VEGF receptors that modulate axon guidance and angiogenesis. *Trends Cardiovasc Med*. 2002;12(1):13-19.
148. Neufeld G, Kessler O. Pro-angiogenic cytokines and their role in tumor angiogenesis. *Cancer Metastasis Rev*. 2006;25(3):373-385.
149. Prahst C, Heroult M, Lanahan AA, et al. Neuropilin-1-VEGFR-2 complexing requires the PDZ-binding domain of neuropilin-1. *J Biol Chem*. 2008;283(37):25110-25114.
150. Shraga-Heled N, Kessler O, Prahst C, Kroll J, Augustin H, Neufeld G. Neuropilin-1 and neuropilin-2 enhance VEGF121 stimulated signal transduction by the VEGFR-2 receptor. *FASEB J*. 2007;21(3):915-926.
151. Yamada Y, Takakura N, Yasue H, Ogawa H, Fujisawa H, Suda T. Exogenous clustered neuropilin 1 enhances vasculogenesis and angiogenesis. *Blood*. 2001;97(6):1671-1678.
152. Kawasaki T, Kitsukawa T, Bekku Y, et al. A requirement for neuropilin-1 in embryonic vessel formation. *Development*. 1999;126(21):4895-4902.
153. Takashima S, Kitakaze M, Asakura M, et al. Targeting of both mouse neuropilin-1 and neuropilin-2 genes severely impairs developmental yolk sac and embryonic angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(6):3657-3662.
154. Stephenson JM, Banerjee S, Saxena NK, Cherian R, Banerjee SK. Neuropilin-1 is differentially expressed in myoepithelial cells and vascular smooth muscle cells in preneoplastic and neoplastic human breast: a possible marker for the progression of breast cancer. *Int J Cancer*. 2002;101(5):409-414.
155. Broholm H, Laursen H. Vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor neuropilin-1's distribution in astrocytic tumors. *APMIS*. 2004;112(4-5):257-263.
156. Fakhari M, Pullirsch D, Abraham D, et al. Selective upregulation of vascular endothelial growth factor receptors neuropilin-1 and -2 in human neuroblastoma. *Cancer*. 2002;94(1):258-263.
157. Straume O, Akslen LA. Increased expression of VEGF-receptors (FLT-1, KDR, NRP-1) and thrombospondin-1 is associated with glomeruloid microvascular proliferation, an aggressive angiogenic phenotype, in malignant melanoma. *Angiogenesis*. 2003;6(4):295-301.
158. Cebe-Suarez S, Grunewald FS, Jaussi R, et al. Orf virus VEGF-E NZ2 promotes paracellular NRP-1/VEGFR-2 coreceptor assembly via the peptide RPPR. *FASEB J*. 2008;22(8):3078-3086.

159. Gerhardt H, Ruhrberg C, Abramsson A, Fujisawa H, Shima D, Betsholtz C. Neuropilin-1 is required for endothelial tip cell guidance in the developing central nervous system. *Dev Dyn*. 2004;231(3):503-509.
160. Giancotti FG, Tarone G. Positional control of cell fate through joint integrin/receptor protein kinase signaling. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2003;19:173-206.
161. Hynes RO, Lively JC, McCarty JH, et al. The diverse roles of integrins and their ligands in angiogenesis. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 2002;67:143-153.
162. Yancopoulos GD, Klagsbrun M, Folkman J. Vasculogenesis, angiogenesis, and growth factors: ephrins enter the fray at the border. *Cell*. 1998;93(5):661-664.
163. Germain S, Monnot C, Muller L, Eichmann A. Hypoxia-driven angiogenesis: role of tip cells and extracellular matrix scaffolding. *Curr Opin Hematol*. 2010;17(3):245-251.
164. Contois L, Akalu A, Brooks PC. Integrins as "functional hubs" in the regulation of pathological angiogenesis. *Semin Cancer Biol*. 2009;19(5):318-328.
165. Lamalice L, Houle F, Huot J. Phosphorylation of Tyr1214 within VEGFR-2 triggers the recruitment of Nck and activation of Fyn leading to SAPK2/p38 activation and endothelial cell migration in response to VEGF. *J Biol Chem*. 2006;281(45):34009-34020.
166. Lamalice L, Houle F, Jourdan G, Huot J. Phosphorylation of tyrosine 1214 on VEGFR2 is required for VEGF-induced activation of Cdc42 upstream of SAPK2/p38. *Oncogene*. 2004;23(2):434-445.
167. Serini G, Valdembri D, Bussolino F. Integrins and angiogenesis: a sticky business. *Exp Cell Res*. 2006;312(5):651-658.
168. Soldi R, Mitola S, Strasly M, Defilippi P, Tarone G, Bussolino F. Role of alphavbeta3 integrin in the activation of vascular endothelial growth factor receptor-2. *EMBO J*. 1999;18(4):882-892.
169. Borges E, Jan Y, Ruoslahti E. Platelet-derived growth factor receptor beta and vascular endothelial growth factor receptor 2 bind to the beta 3 integrin through its extracellular domain. *J Biol Chem*. 2000;275(51):39867-39873.
170. Mahabeleshwar GH, Feng W, Reddy K, Plow EF, Byzova TV. Mechanisms of integrin-vascular endothelial growth factor receptor cross-activation in angiogenesis. *Circ Res*. 2007;101(6):570-580.
171. Laferriere J, Houle F, Huot J. Regulation of the metastatic process by E-selectin and stress-activated protein kinase-2/p38. *Ann N Y Acad Sci*. 2002;973:562-572.

172. Masson-Gadais B, Houle F, Laferrière J, Huot J. Integrin $\alpha\beta3$ requirement for VEGFR2-mediated activation of SAPK2/p38 and for Hsp90-dependent phosphorylation of focal adhesion kinase in endothelial cells activated by VEGF. *Cell Stress Chaperones*. 2003;8(1):37-52.
173. Sweet DT, Chen Z, Wiley DM, Bautch VL, Tzima E. The adaptor protein Shc integrates growth factor and ECM signaling during postnatal angiogenesis. *Blood*. 2012;119(8):1946-1955.
174. Hong YK, Lange-Asschenfeldt B, Velasco P, et al. VEGF-A promotes tissue repair-associated lymphatic vessel formation via VEGFR-2 and the $\alpha1\beta1$ and $\alpha2\beta1$ integrins. *FASEB J*. 2004;18(10):1111-1113.
175. Kawamura H, Li X, Harper SJ, Bates DO, Claesson-Welsh L. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-A165b is a weak in vitro agonist for VEGF receptor-2 due to lack of coreceptor binding and deficient regulation of kinase activity. *Cancer Res*. 2008;68(12):4683-4692.
176. Park M, Lee ST. The fourth immunoglobulin-like loop in the extracellular domain of FLT-1, a VEGF receptor, includes a major heparin-binding site. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999;264(3):730-734.
177. Vander Kooi CW, Jusino MA, Perman B, Neau DB, Bellamy HD, Leahy DJ. Structural basis for ligand and heparin binding to neuropilin B domains. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(15):6152-6157.
178. Jakobsson L, Kreuger J, Holmborn K, et al. Heparan sulfate in trans potentiates VEGFR-mediated angiogenesis. *Dev Cell*. 2006;10(5):625-634.
179. Gerhardt H, Betsholtz C. How do endothelial cells orientate? *EXS*. 2005(94):3-15.
180. Stalmans I, Ng YS, Rohan R, et al. Arteriolar and venular patterning in retinas of mice selectively expressing VEGF isoforms. *J Clin Invest*. 2002;109(3):327-336.
181. Dejana E, Bazzoni G, Lampugnani MG. Vascular endothelial (VE)-cadherin: only an intercellular glue? *Exp Cell Res*. 1999;252(1):13-19.
182. Dejana E, Giampietro C. Vascular endothelial-cadherin and vascular stability. *Curr Opin Hematol*. 2012;19(3):218-223.
183. Dejana E. Endothelial cell-cell junctions: happy together. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2004;5(4):261-270.
184. Bertolino P, Deckers M, Lebrin F, ten Dijke P. Transforming growth factor-beta signal transduction in angiogenesis and vascular disorders. *Chest*. 2005;128(6 Suppl):585S-590S.

185. Mandriota SJ, Menoud PA, Pepper MS. Transforming growth factor beta 1 down-regulates vascular endothelial growth factor receptor 2/flk-1 expression in vascular endothelial cells. *J Biol Chem*. 1996;271(19):11500-11505.
186. Massague J, Blain SW, Lo RS. TGFbeta signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. *Cell*. 2000;103(2):295-309.
187. Lampugnani MG, Orsenigo F, Gagliani MC, Tacchetti C, Dejana E. Vascular endothelial cadherin controls VEGFR-2 internalization and signaling from intracellular compartments. *J Cell Biol*. 2006;174(4):593-604.
188. Hofer E, Schweighofer B. Signal transduction induced in endothelial cells by growth factor receptors involved in angiogenesis. *Thromb Haemost*. 2007;97(3):355-363.
189. Madri JA, Pratt BM, Yannariello-Brown J. Matrix-driven cell size change modulates aortic endothelial cell proliferation and sheet migration. *Am J Pathol*. 1988;132(1):18-27.
190. Segura I, Serrano A, De Buitrago GG, et al. Inhibition of programmed cell death impairs in vitro vascular-like structure formation and reduces in vivo angiogenesis. *FASEB J*. 2002;16(8):833-841.
191. Zanetti A, Lampugnani MG, Balconi G, et al. Vascular endothelial growth factor induces SHC association with vascular endothelial cadherin: a potential feedback mechanism to control vascular endothelial growth factor receptor-2 signaling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002;22(4):617-622.
192. Gavard J, Patel V, Gutkind JS. Angiopoietin-1 prevents VEGF-induced endothelial permeability by sequestering Src through mDia. *Dev Cell*. 2008;14(1):25-36.
193. Yuan HT, Venkatesha S, Chan B, et al. Activation of the orphan endothelial receptor Tie1 modifies Tie2-mediated intracellular signaling and cell survival. *FASEB J*. 2007;21(12):3171-3183.
194. Partanen J, Dumont DJ. Functions of Tie1 and Tie2 receptor tyrosine kinases in vascular development. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1999;237:159-172.
195. Partanen J, Armstrong E, Makela TP, et al. A novel endothelial cell surface receptor tyrosine kinase with extracellular epidermal growth factor homology domains. *Mol Cell Biol*. 1992;12(4):1698-1707.
196. Ziegler SF, Bird TA, Schneringer JA, Schooley KA, Baum PR. Molecular cloning and characterization of a novel receptor protein tyrosine kinase from human placenta. *Oncogene*. 1993;8(3):663-670.

197. Barton WA, Tzvetkova-Robev D, Miranda EP, et al. Crystal structures of the Tie2 receptor ectodomain and the angiopoietin-2-Tie2 complex. *Nat Struct Mol Biol.* 2006;13(6):524-532.
198. Fiedler U, Krissl T, Koidl S, et al. Angiopoietin-1 and angiopoietin-2 share the same binding domains in the Tie-2 receptor involving the first Ig-like loop and the epidermal growth factor-like repeats. *J Biol Chem.* 2003;278(3):1721-1727.
199. Sato TN, Tozawa Y, Deutsch U, et al. Distinct roles of the receptor tyrosine kinases Tie-1 and Tie-2 in blood vessel formation. *Nature.* 1995;376(6535):70-74.
200. Suri C, Jones PF, Patan S, et al. Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell.* 1996;87(7):1171-1180.
201. Dallabrida SM, Ismail N, Oberle JR, Himes BE, Rupnick MA. Angiopoietin-1 promotes cardiac and skeletal myocyte survival through integrins. *Circ Res.* 2005;96(4):e8-24.
202. Mammoto T, Parikh SM, Mammoto A, et al. Angiopoietin-1 requires p190 RhoGAP to protect against vascular leakage in vivo. *J Biol Chem.* 2007;282(33):23910-23918.
203. Thurston G, Suri C, Smith K, et al. Leakage-resistant blood vessels in mice transgenically overexpressing angiopoietin-1. *Science.* 1999;286(5449):2511-2514.
204. Gale NW, Thurston G, Hackett SF, et al. Angiopoietin-2 is required for postnatal angiogenesis and lymphatic patterning, and only the latter role is rescued by Angiopoietin-1. *Dev Cell.* 2002;3(3):411-423.
205. Fiedler U, Augustin HG. Angiopoietins: a link between angiogenesis and inflammation. *Trends Immunol.* 2006;27(12):552-558.
206. Fiedler U, Reiss Y, Scharpfenecker M, et al. Angiopoietin-2 sensitizes endothelial cells to TNF-alpha and has a crucial role in the induction of inflammation. *Nat Med.* 2006;12(2):235-239.
207. Bogdanovic E, Nguyen VP, Dumont DJ. Activation of Tie2 by angiopoietin-1 and angiopoietin-2 results in their release and receptor internalization. *J Cell Sci.* 2006;119(Pt 17):3551-3560.
208. Yuan HT, Khankin EV, Karumanchi SA, Parikh SM. Angiopoietin 2 is a partial agonist/antagonist of Tie2 signaling in the endothelium. *Mol Cell Biol.* 2009;29(8):2011-2022.
209. Fiedler U, Scharpfenecker M, Koidl S, et al. The Tie-2 ligand angiopoietin-2 is stored in and rapidly released upon stimulation from endothelial cell Weibel-Palade bodies. *Blood.* 2004;103(11):4150-4156.

210. Lee HJ, Cho CH, Hwang SJ, et al. Biological characterization of angiopoietin-3 and angiopoietin-4. *FASEB J*. 2004;18(11):1200-1208.
211. Beaudet MJ, Rueda N, Kobinger GP, Villeneuve J, Vallieres L. Construction of a ganciclovir-sensitive lentiviral vector to assess the influence of angiopoietin-3 and soluble Tie2 on glioma growth. *J Neurooncol*. 2010;99(1):1-11.
212. Xu Y, Liu YJ, Yu Q. Angiopoietin-3 inhibits pulmonary metastasis by inhibiting tumor angiogenesis. *Cancer Res*. 2004;64(17):6119-6126.
213. Olsen MW, Ley CD, Junker N, Hansen AJ, Lund EL, Kristjansen PE. Angiopoietin-4 inhibits angiogenesis and reduces interstitial fluid pressure. *Neoplasia*. 2006;8(5):364-372.
214. Nakayama T, Hatachi G, Wen CY, et al. Expression and significance of Tie-1 and Tie-2 receptors, and angiopoietins-1, 2 and 4 in colorectal adenocarcinoma: Immunohistochemical analysis and correlation with clinicopathological factors. *World J Gastroenterol*. 2005;11(7):964-969.
215. Nakayama T, Yoshizaki A, Kawahara N, et al. Expression of Tie-1 and 2 receptors, and angiopoietin-1, 2 and 4 in gastric carcinoma; immunohistochemical analyses and correlation with clinicopathological factors. *Histopathology*. 2004;44(3):232-239.
216. Valenzuela DM, Griffiths JA, Rojas J, et al. Angiopoietins 3 and 4: diverging gene counterparts in mice and humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(5):1904-1909.
217. Zhang CC, Kaba M, Ge G, et al. Angiopoietin-like proteins stimulate ex vivo expansion of hematopoietic stem cells. *Nat Med*. 2006;12(2):240-245.
218. Hato T, Tabata M, Oike Y. The role of angiopoietin-like proteins in angiogenesis and metabolism. *Trends Cardiovasc Med*. 2008;18(1):6-14.
219. Katoh Y, Katoh M. Comparative integromics on Angiopoietin family members. *Int J Mol Med*. 2006;17(6):1145-1149.
220. Kersten S. Regulation of lipid metabolism via angiopoietin-like proteins. *Biochem Soc Trans*. 2005;33(Pt 5):1059-1062.
221. Li C. Genetics and regulation of angiopoietin-like proteins 3 and 4. *Curr Opin Lipidol*. 2006;17(2):152-156.
222. Galaup A, Gomez E, Souktani R, et al. Protection against myocardial infarction and no-reflow through preservation of vascular integrity by angiopoietin-like 4. *Circulation*. 2012;125(1):140-149.
223. Huang RL, Teo Z, Chong HC, et al. ANGPTL4 modulates vascular junction integrity by integrin signaling and disruption of intercellular VE-cadherin and claudin-5 clusters. *Blood*. 2011;118(14):3990-4002.

224. Fukuhara S, Sako K, Minami T, et al. Differential function of Tie2 at cell-cell contacts and cell-substratum contacts regulated by angiopoietin-1. *Nat Cell Biol.* 2008;10(5):513-526.
225. Saharinen P, Eklund L, Miettinen J, et al. Angiopoietins assemble distinct Tie2 signalling complexes in endothelial cell-cell and cell-matrix contacts. *Nat Cell Biol.* 2008;10(5):527-537.
226. Baffert F, Le T, Thurston G, McDonald DM. Angiopoietin-1 decreases plasma leakage by reducing number and size of endothelial gaps in venules. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006;290(1):H107-118.
227. Huang L, Turck CW, Rao P, Peters KG. GRB2 and SH-PTP2: potentially important endothelial signaling molecules downstream of the TEK/TIE2 receptor tyrosine kinase. *Oncogene.* 1995;11(10):2097-2103.
228. Peters KG, Kontos CD, Lin PC, et al. Functional significance of Tie2 signaling in the adult vasculature. *Recent Prog Horm Res.* 2004;59:51-71.
229. Tai LK, Zheng Q, Pan S, Jin ZG, Berk BC. Flow activates ERK1/2 and endothelial nitric oxide synthase via a pathway involving PECAM1, SHP2, and Tie2. *J Biol Chem.* 2005;280(33):29620-29624.
230. Winderlich M, Keller L, Cagna G, et al. VE-PTP controls blood vessel development by balancing Tie-2 activity. *J Cell Biol.* 2009;185(4):657-671.
231. Harfouche R, Hassessian HM, Guo Y, et al. Mechanisms which mediate the antiapoptotic effects of angiopoietin-1 on endothelial cells. *Microvasc Res.* 2002;64(1):135-147.
232. Papapetropoulos A, Fulton D, Mahboubi K, et al. Angiopoietin-1 inhibits endothelial cell apoptosis via the Akt/survivin pathway. *J Biol Chem.* 2000;275(13):9102-9105.
233. Witzensichler B, Westermann D, Kneuppel S, Schultheiss HP, Tschöpe C. Protective role of angiopoietin-1 in endotoxic shock. *Circulation.* 2005;111(1):97-105.
234. Kim I, Moon SO, Park SK, Chae SW, Koh GY. Angiopoietin-1 reduces VEGF-stimulated leukocyte adhesion to endothelial cells by reducing ICAM-1, VCAM-1, and E-selectin expression. *Circ Res.* 2001;89(6):477-479.
235. Iivanainen E, Nelimarkka L, Elenius V, et al. Angiopoietin-regulated recruitment of vascular smooth muscle cells by endothelial-derived heparin binding EGF-like growth factor. *FASEB J.* 2003;17(12):1609-1621.
236. Carlson TR, Feng Y, Maisonpierre PC, Mrksich M, Morla AO. Direct cell adhesion to the angiopoietins mediated by integrins. *J Biol Chem.* 2001;276(28):26516-26525.

237. Cascone I, Napione L, Maniero F, Serini G, Bussolino F. Stable interaction between alpha5beta1 integrin and Tie2 tyrosine kinase receptor regulates endothelial cell response to Ang-1. *J Cell Biol.* 2005;170(6):993-1004.
238. Brkovic A, Pelletier M, Girard D, Sirois MG. Angiopoietin chemotactic activities on neutrophils are regulated by PI-3K activation. *J Leukoc Biol.* 2007;81(4):1093-1101.
239. Jones N, Dumont DJ. Tek/Tie2 signaling: new and old partners³⁴. *Cancer Metastasis Rev.* 2000;19(1-2):13-17.
240. Jones N, Iljin K, Dumont DJ, Alitalo K. Tie receptors: new modulators of angiogenic and lymphangiogenic responses. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001;2(4):257-267.
241. Jones N, Master Z, Jones J, et al. Identification of Tek/Tie2 binding partners. Binding to a multifunctional docking site mediates cell survival and migration. *J Biol Chem.* 1999;274(43):30896-30905.
242. Jones N, Dumont DJ. The Tek/Tie2 receptor signals through a novel Dok-related docking protein, Dok-R. *Oncogene.* 1998;17(9):1097-1108.
243. Gamble JR, Drew J, Trezise L, et al. Angiopoietin-1 is an antipermeability and anti-inflammatory agent in vitro and targets cell junctions. *Circ Res.* 2000;87(7):603-607.
244. Pizurki L, Zhou Z, Glynos K, Roussos C, Papapetropoulos A. Angiopoietin-1 inhibits endothelial permeability, neutrophil adherence and IL-8 production. *Br J Pharmacol.* 2003;139(2):329-336.
245. Oubaha M, Gratton JP. Phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase by atypical PKC zeta contributes to angiopoietin-1-dependent inhibition of VEGF-induced endothelial permeability in vitro. *Blood.* 2009;114(15):3343-3351.
246. Jho D, Mehta D, Ahmmed G, et al. Angiopoietin-1 opposes VEGF-induced increase in endothelial permeability by inhibiting TRPC1-dependent Ca²⁺ influx. *Circ Res.* 2005;96(12):1282-1290.
247. Furchgott RF. An historical survey and prospects of research on EDRF. *Nihon Heikatsukin Gakkai Zasshi.* 1987;23(6):435-440.
248. Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987;84(24):9265-9269.
249. Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature.* 1987;327(6122):524-526.

250. Liu VW, Huang PL. Cardiovascular roles of nitric oxide: a review of insights from nitric oxide synthase gene disrupted mice. *Cardiovasc Res.* 2008;77(1):19-29.
251. Ignarro LJ, Cirino G, Casini A, Napoli C. Nitric oxide as a signaling molecule in the vascular system: an overview. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1999;34(6):879-886.
252. Napoli C, Ignarro LJ. Nitric oxide and atherosclerosis. *Nitric Oxide.* 2001;5(2):88-97.
253. Napoli C, Ignarro LJ. Polymorphisms in endothelial nitric oxide synthase and carotid artery atherosclerosis. *J Clin Pathol.* 2007;60(4):341-344.
254. Nava E, Noll G, Luscher TF. Nitric oxide in cardiovascular diseases. *Ann Med.* 1995;27(3):343-351.
255. Vallance P, Leiper J. Cardiovascular biology of the asymmetric dimethylarginine:dimethylarginine dimethylaminohydrolase pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24(6):1023-1030.
256. Matsubara T, Ziff M. Increased superoxide anion release from human endothelial cells in response to cytokines. *J Immunol.* 1986;137(10):3295-3298.
257. Rubbo H, Tarpey M, Freeman BA. Nitric oxide and reactive oxygen species in vascular injury. *Biochem Soc Symp.* 1995;61:33-45.
258. Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol.* 1996;271(5 Pt 1):C1424-1437.
259. Koppenol WH, Kissner R, Beckman JS. Syntheses of peroxynitrite: to go with the flow or on solid grounds? *Methods Enzymol.* 1996;269:296-302.
260. Kubes P, Suzuki M, Granger DN. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991;88(11):4651-4655.
261. Zeiher AM, Fisslthaler B, Schray-Utz B, Busse R. Nitric oxide modulates the expression of monocyte chemoattractant protein 1 in cultured human endothelial cells. *Circ Res.* 1995;76(6):980-986.
262. Koppenol WH, Moreno JJ, Pryor WA, Ischiropoulos H, Beckman JS. Peroxynitrite, a cloaked oxidant formed by nitric oxide and superoxide. *Chem Res Toxicol.* 1992;5(6):834-842.
263. Thibeault S, Rautureau Y, Oubaha M, et al. S-nitrosylation of beta-catenin by eNOS-derived NO promotes VEGF-induced endothelial cell permeability. *Mol Cell.* 2010;39(3):468-476.
264. Wang G, Moniri NH, Ozawa K, Stamler JS, Daaka Y. Nitric oxide regulates endocytosis by S-nitrosylation of dynamin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(5):1295-1300.

265. Rahman MA, Senga T, Ito S, Hyodo T, Hasegawa H, Hamaguchi M. S-nitrosylation at cysteine 498 of c-Src tyrosine kinase regulates nitric oxide-mediated cell invasion. *J Biol Chem*. 2010;285(6):3806-3814.
266. Huang PL, Huang Z, Mashimo H, et al. Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. *Nature*. 1995;377(6546):239-242.
267. Clempus RE, Griendling KK. Reactive oxygen species signaling in vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Res*. 2006;71(2):216-225.
268. Ferder L, Inserra F, Martinez-Maldonado M. Inflammation and the metabolic syndrome: role of angiotensin II and oxidative stress. *Curr Hypertens Rep*. 2006;8(3):191-198.
269. Inoguchi T, Nawata H. NAD(P)H oxidase activation: a potential target mechanism for diabetic vascular complications, progressive beta-cell dysfunction and metabolic syndrome. *Curr Drug Targets*. 2005;6(4):495-501.
270. Chan Y, Fish JE, D'Abreo C, et al. The cell-specific expression of endothelial nitric-oxide synthase: a role for DNA methylation. *J Biol Chem*. 2004;279(33):35087-35100.
271. Davis ME, Cai H, Drummond GR, Harrison DG. Shear stress regulates endothelial nitric oxide synthase expression through c-Src by divergent signaling pathways. *Circ Res*. 2001;89(11):1073-1080.
272. Woodman CR, Price EM, Laughlin MH. Shear stress induces eNOS mRNA expression and improves endothelium-dependent dilation in senescent soleus muscle feed arteries. *J Appl Physiol*. 2005;98(3):940-946.
273. Awolesi MA, Widmann MD, Sessa WC, Sumpio BE. Cyclic strain increases endothelial nitric oxide synthase activity. *Surgery*. 1994;116(2):439-444; discussion 444-435.
274. Yang AL, Tsai SJ, Jiang MJ, Jen CJ, Chen HI. Chronic exercise increases both inducible and endothelial nitric oxide synthase gene expression in endothelial cells of rat aorta. *J Biomed Sci*. 2002;9(2):149-155.
275. Le Cras TD, Xue C, Rengasamy A, Johns RA. Chronic hypoxia upregulates endothelial and inducible NO synthase gene and protein expression in rat lung. *Am J Physiol*. 1996;270(1 Pt 1):L164-170.
276. Beliakov J, Whitesell L. Hsp90: an emerging target for breast cancer therapy. *Anticancer Drugs*. 2004;15(7):651-662.
277. Brouet A, Sonveaux P, Dessy C, Moniotte S, Balligand JL, Feron O. Hsp90 and caveolin are key targets for the proangiogenic nitric oxide-mediated effects of statins. *Circ Res*. 2001;89(10):866-873.

278. de Candia P, Solit DB, Giri D, et al. Angiogenesis impairment in Id-deficient mice cooperates with an Hsp90 inhibitor to completely suppress HER2/neu-dependent breast tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(21):12337-12342.
279. Sun J, Liao JK. Induction of angiogenesis by heat shock protein 90 mediated by protein kinase Akt and endothelial nitric oxide synthase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24(12):2238-2244.
280. Konig P, Dedio J, Oess S, et al. NOSIP and its interacting protein, eNOS, in the rat trachea and lung. *J Histochem Cytochem*. 2005;53(2):155-164.
281. Schilling K, Opitz N, Wiesenthal A, et al. Translocation of endothelial nitric-oxide synthase involves a ternary complex with caveolin-1 and NOSTRIN. *Mol Biol Cell*. 2006;17(9):3870-3880.
282. Liu J, Garcia-Cardena G, Sessa WC. Biosynthesis and palmitoylation of endothelial nitric oxide synthase: mutagenesis of palmitoylation sites, cysteines-15 and/or -26, argues against depalmitoylation-induced translocation of the enzyme. *Biochemistry*. 1995;34(38):12333-12340.
283. Liu J, Garcia-Cardena G, Sessa WC. Palmitoylation of endothelial nitric oxide synthase is necessary for optimal stimulated release of nitric oxide: implications for caveolae localization. *Biochemistry*. 1996;35(41):13277-13281.
284. Shaul PW, Smart EJ, Robinson LJ, et al. Acylation targets endothelial nitric-oxide synthase to plasmalemmal caveolae. *J Biol Chem*. 1996;271(11):6518-6522.
285. Michell BJ, Chen Z, Tiganis T, et al. Coordinated control of endothelial nitric-oxide synthase phosphorylation by protein kinase C and the cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem*. 2001;276(21):17625-17628.
286. Boo YC, Kim HJ, Song H, Fulton D, Sessa W, Jo H. Coordinated regulation of endothelial nitric oxide synthase activity by phosphorylation and subcellular localization. *Free Radic Biol Med*. 2006;41(1):144-153.
287. Fulton D, Church JE, Ruan L, et al. Src kinase activates endothelial nitric-oxide synthase by phosphorylating Tyr-83. *J Biol Chem*. 2005;280(43):35943-35952.
288. Sessa WC. eNOS at a glance. *J Cell Sci*. 2004;117(Pt 12):2427-2429.
289. Matsubara M, Hayashi N, Jing T, Titani K. Regulation of endothelial nitric oxide synthase by protein kinase C. *J Biochem*. 2003;133(6):773-781.
290. Zhang XL, Wen L, Chen YJ, Zhu Y. Vascular endothelial growth factor up-regulates the expression of intracellular adhesion molecule-1 in retinal endothelial cells via reactive oxygen species, but not nitric oxide. *Chin Med J (Engl)*. 2009;122(3):338-343.

291. Gold MG, Barford D, Komander D. Lining the pockets of kinases and phosphatases. *Curr Opin Struct Biol.* 2006;16(6):693-701.
292. Nishizuka Y. Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. *FASEB J.* 1995;9(7):484-496.
293. Newton AC. Regulation of the ABC kinases by phosphorylation: protein kinase C as a paradigm. *Biochem J.* 2003;370(Pt 2):361-371.
294. Steinberg SF. Structural basis of protein kinase C isoform function. *Physiol Rev.* 2008;88(4):1341-1378.
295. Churchill EN, Qvit N, Mochly-Rosen D. Rationally designed peptide regulators of protein kinase C. *Trends Endocrinol Metab.* 2009;20(1):25-33.
296. Corbalan-Garcia S, Gomez-Fernandez JC. Protein kinase C regulatory domains: the art of decoding many different signals in membranes. *Biochim Biophys Acta.* 2006;1761(7):633-654.
297. Lynch JJ, Ferro TJ, Blumenstock FA, Brockenauer AM, Malik AB. Increased endothelial albumin permeability mediated by protein kinase C activation. *J Clin Invest.* 1990;85(6):1991-1998.
298. Wolf BA, Williamson JR, Easom RA, Chang K, Sherman WR, Turk J. Diacylglycerol accumulation and microvascular abnormalities induced by elevated glucose levels. *J Clin Invest.* 1991;87(1):31-38.
299. Inoguchi T, Ueda F, Umeda F, Yamashita T, Nawata H. Inhibition of intercellular communication via gap junction in cultured aortic endothelial cells by elevated glucose and phorbol ester. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995;208(2):492-497.
300. Cardillo C, Campia U, Kilcoyne CM, Bryant MB, Panza JA. Improved endothelium-dependent vasodilation after blockade of endothelin receptors in patients with essential hypertension. *Circulation.* 2002;105(4):452-456.
301. Cosentino F, Eto M, De Paolis P, et al. High glucose causes upregulation of cyclooxygenase-2 and alters prostanoid profile in human endothelial cells: role of protein kinase C and reactive oxygen species. *Circulation.* 2003;107(7):1017-1023.
302. Hink U, Li H, Mollnau H, et al. Mechanisms underlying endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Circ Res.* 2001;88(2):E14-22.
303. Xia P, Aiello LP, Ishii H, et al. Characterization of vascular endothelial growth factor's effect on the activation of protein kinase C, its isoforms, and endothelial cell growth. *J Clin Invest.* 1996;98(9):2018-2026.

304. Harhaj NS, Felinski EA, Wolpert EB, Sundstrom JM, Gardner TW, Antonetti DA. VEGF activation of protein kinase C stimulates occludin phosphorylation and contributes to endothelial permeability. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2006;47(11):5106-5115.
305. Park JY, Takahara N, Gabriele A, et al. Induction of endothelin-1 expression by glucose: an effect of protein kinase C activation. *Diabetes.* 2000;49(7):1239-1248.
306. Okon EB, Szado T, Laher I, McManus B, van Breemen C. Augmented contractile response of vascular smooth muscle in a diabetic mouse model. *J Vasc Res.* 2003;40(6):520-530.
307. Parekh DB, Ziegler W, Parker PJ. Multiple pathways control protein kinase C phosphorylation. *EMBO J.* 2000;19(4):496-503.
308. Stempka L, Girod A, Muller HJ, et al. Phosphorylation of protein kinase Cdelta (PKCdelta) at threonine 505 is not a prerequisite for enzymatic activity. Expression of rat PKCdelta and an alanine 505 mutant in bacteria in a functional form. *J Biol Chem.* 1997;272(10):6805-6811.
309. Le Good JA, Ziegler WH, Parekh DB, Alessi DR, Cohen P, Parker PJ. Protein kinase C isoforms controlled by phosphoinositide 3-kinase through the protein kinase PDK1. *Science.* 1998;281(5385):2042-2045.
310. Dutil EM, Toker A, Newton AC. Regulation of conventional protein kinase C isozymes by phosphoinositide-dependent kinase 1 (PDK-1). *Curr Biol.* 1998;8(25):1366-1375.
311. Parekh D, Ziegler W, Yonezawa K, Hara K, Parker PJ. Mammalian TOR controls one of two kinase pathways acting upon nPKCdelta and nPKCepsilon. *J Biol Chem.* 1999;274(49):34758-34764.
312. Newton AC. Protein kinase C: structural and spatial regulation by phosphorylation, cofactors, and macromolecular interactions. *Chem Rev.* 2001;101(8):2353-2364.
313. Jaken S, Parker PJ. Protein kinase C binding partners. *Bioessays.* 2000;22(3):245-254.
314. Poole AW, Pula G, Hers I, Crosby D, Jones ML. PKC-interacting proteins: from function to pharmacology. *Trends Pharmacol Sci.* 2004;25(10):528-535.
315. Freeley M, Kelleher D, Long A. Regulation of Protein Kinase C function by phosphorylation on conserved and non-conserved sites. *Cell Signal.* 2011;23(5):753-762.
316. Bandyopadhyay G, Standaert ML, Sajan MP, et al. Protein kinase C-lambda knockout in embryonic stem cells and adipocytes impairs insulin-stimulated glucose transport. *Mol Endocrinol.* 2004;18(2):373-383.
317. Leitges M, Sanz L, Martin P, et al. Targeted disruption of the zetaPKC gene results in the impairment of the NF-kappaB pathway. *Mol Cell.* 2001;8(4):771-780.

318. Martin P, Duran A, Minguet S, et al. Role of zeta PKC in B-cell signaling and function. *EMBO J.* 2002;21(15):4049-4057.
319. Berra E, Diaz-Meco MT, Lozano J, et al. Evidence for a role of MEK and MAPK during signal transduction by protein kinase C zeta. *EMBO J.* 1995;14(24):6157-6163.
320. Regala RP, Weems C, Jamieson L, Copland JA, Thompson EA, Fields AP. Atypical protein kinase Ciota plays a critical role in human lung cancer cell growth and tumorigenicity. *J Biol Chem.* 2005;280(35):31109-31115.
321. Regala RP, Weems C, Jamieson L, et al. Atypical protein kinase C iota is an oncogene in human non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* 2005;65(19):8905-8911.
322. Lin D, Edwards AS, Fawcett JP, Mbamalu G, Scott JD, Pawson T. A mammalian PAR-3-PAR-6 complex implicated in Cdc42/Rac1 and aPKC signalling and cell polarity. *Nat Cell Biol.* 2000;2(8):540-547.
323. Wodarz A. Establishing cell polarity in development. *Nat Cell Biol.* 2002;4(2):E39-44.
324. Suzuki A, Ohno S. The PAR-aPKC system: lessons in polarity. *J Cell Sci.* 2006;119(Pt 6):979-987.
325. Kemphues K. PARsing embryonic polarity. *Cell.* 2000;101(4):345-348.
326. Rosse C, Linch M, Kermorgant S, Cameron AJ, Boeckeler K, Parker PJ. PKC and the control of localized signal dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010;11(2):103-112.
327. Izumi Y, Hirose T, Tamai Y, et al. An atypical PKC directly associates and colocalizes at the epithelial tight junction with ASIP, a mammalian homologue of *Caenorhabditis elegans* polarity protein PAR-3. *J Cell Biol.* 1998;143(1):95-106.
328. Nagai-Tamai Y, Mizuno K, Hirose T, Suzuki A, Ohno S. Regulated protein-protein interaction between aPKC and PAR-3 plays an essential role in the polarization of epithelial cells. *Genes Cells.* 2002;7(11):1161-1171.
329. Joberty G, Petersen C, Gao L, Macara IG. The cell-polarity protein Par6 links Par3 and atypical protein kinase C to Cdc42. *Nat Cell Biol.* 2000;2(8):531-539.
330. Puls A, Schmidt S, Grawe F, Stabel S. Interaction of protein kinase C zeta with ZIP, a novel protein kinase C-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(12):6191-6196.
331. Sanchez P, De Carcer G, Sandoval IV, Moscat J, Diaz-Meco MT. Localization of atypical protein kinase C isoforms into lysosome-targeted endosomes through interaction with p62. *Mol Cell Biol.* 1998;18(5):3069-3080.

332. Etienne-Manneville S. Cdc42--the centre of polarity. *J Cell Sci.* 2004;117(Pt 8):1291-1300.
333. Etienne-Manneville S, Hall A. Integrin-mediated activation of Cdc42 controls cell polarity in migrating astrocytes through PKCzeta. *Cell.* 2001;106(4):489-498.
334. Etienne-Manneville S, Hall A. Rho GTPases in cell biology. *Nature.* 2002;420(6916):629-635.
335. Etienne-Manneville S, Hall A. Cell polarity: Par6, aPKC and cytoskeletal crosstalk. *Curr Opin Cell Biol.* 2003;15(1):67-72.
336. McCue S, Dajnowiec D, Xu F, Zhang M, Jackson MR, Langille BL. Shear stress regulates forward and reverse planar cell polarity of vascular endothelium in vivo and in vitro. *Circ Res.* 2006;98(7):939-946.
337. Zeng G, Taylor SM, McColm JR, et al. Orientation of endothelial cell division is regulated by VEGF signaling during blood vessel formation. *Blood.* 2007;109(4):1345-1352.
338. Strilic B, Kucera T, Eglinger J, et al. The molecular basis of vascular lumen formation in the developing mouse aorta. *Dev Cell.* 2009;17(4):505-515.
339. Zovein AC, Luque A, Turlo KA, et al. Beta1 integrin establishes endothelial cell polarity and arteriolar lumen formation via a Par3-dependent mechanism. *Dev Cell.* 2010;18(1):39-51.
340. Assemat E, Bazellieres E, Pallesi-Pocachard E, Le Bivic A, Massey-Harroche D. Polarity complex proteins. *Biochim Biophys Acta.* 2008;1778(3):614-630.
341. Rashbass P, Skaer H. Cell polarity: Nailing Crumbs to the scaffold. *Curr Biol.* 2000;10(6):R234-236.
342. Bazellieres E, Assemat E, Arsanto JP, Le Bivic A, Massey-Harroche D. Crumbs proteins in epithelial morphogenesis. *Front Biosci.* 2009;14:2149-2169.
343. Bhat MA, Izaddoost S, Lu Y, Cho KO, Choi KW, Bellen HJ. Discs Lost, a novel multi-PDZ domain protein, establishes and maintains epithelial polarity. *Cell.* 1999;96(6):833-845.
344. Bachmann A, Schneider M, Theilenberg E, Grawe F, Knust E. Drosophila Stardust is a partner of Crumbs in the control of epithelial cell polarity. *Nature.* 2001;414(6864):638-643.
345. Hong Y, Stronach B, Perrimon N, Jan LY, Jan YN. Drosophila Stardust interacts with Crumbs to control polarity of epithelia but not neuroblasts. *Nature.* 2001;414(6864):634-638.
346. Roh MH, Makarova O, Liu CJ, et al. The Maguk protein, Pals1, functions as an adapter, linking mammalian homologues of Crumbs and Discs Lost. *J Cell Biol.* 2002;157(1):161-172.

347. Doerks T, Bork P, Kamberov E, Makarova O, Muecke S, Margolis B. L27, a novel heterodimerization domain in receptor targeting proteins Lin-2 and Lin-7. *Trends Biochem Sci.* 2000;25(7):317-318.
348. Tepass U. Adherens junctions: new insight into assembly, modulation and function. *Bioessays.* 2002;24(8):690-695.
349. Tepass U, Knust E. Crumbs and Stardust act in a genetic pathway that controls the organization of epithelia in *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol.* 1993;159(1):311-326.
350. Petronczki M, Knoblich JA. DmPAR-6 directs epithelial polarity and asymmetric cell division of neuroblasts in *Drosophila*. *Nat Cell Biol.* 2001;3(1):43-49.
351. Gao L, Joberty G, Macara IG. Assembly of epithelial tight junctions is negatively regulated by Par6. *Curr Biol.* 2002;12(3):221-225.
352. Suzuki A, Yamanaka T, Hirose T, et al. Atypical protein kinase C is involved in the evolutionarily conserved par protein complex and plays a critical role in establishing epithelia-specific junctional structures. *J Cell Biol.* 2001;152(6):1183-1196.
353. Qiu RG, Abo A, Steven Martin G. A human homolog of the *C. elegans* polarity determinant Par-6 links Rac and Cdc42 to PKC ζ signaling and cell transformation. *Curr Biol.* 2000;10(12):697-707.
354. Tabuse Y, Izumi Y, Piano F, Kemphues KJ, Miwa J, Ohno S. Atypical protein kinase C cooperates with PAR-3 to establish embryonic polarity in *Caenorhabditis elegans*. *Development.* 1998;125(18):3607-3614.
355. Munson C, Huisken J, Bit-Avragim N, et al. Regulation of neurocoel morphogenesis by Pard6 gamma b. *Dev Biol.* 2008;324(1):41-54.
356. Solecki DJ. Sticky situations: recent advances in control of cell adhesion during neuronal migration. *Curr Opin Neurobiol.* 2012.
357. Etienne-Manneville S, Hall A. Cdc42 regulates GSK-3 β and adenomatous polyposis coli to control cell polarity. *Nature.* 2003;421(6924):753-756.
358. Rosse C, Formstecher E, Boeckeler K, et al. An aPKC-exocyst complex controls paxillin phosphorylation and migration through localised JNK1 activation. *PLoS Biol.* 2009;7(11):e1000235.
359. Hurov JB, Watkins JL, Piwnicka-Worms H. Atypical PKC phosphorylates PAR-1 kinases to regulate localization and activity. *Curr Biol.* 2004;14(8):736-741.

360. Suzuki A, Hirata M, Kamimura K, et al. aPKC acts upstream of PAR-1b in both the establishment and maintenance of mammalian epithelial polarity. *Curr Biol.* 2004;14(16):1425-1435.
361. Vaccari T, Rabouille C, Ephrussi A. The Drosophila PAR-1 spacer domain is required for lateral membrane association and for polarization of follicular epithelial cells. *Curr Biol.* 2005;15(3):255-261.
362. Betschinger J, Eisenhaber F, Knoblich JA. Phosphorylation-induced autoinhibition regulates the cytoskeletal protein Lethal (2) giant larvae. *Curr Biol.* 2005;15(3):276-282.
363. Eder AM, Sui X, Rosen DG, et al. Atypical PKC ζ contributes to poor prognosis through loss of apical-basal polarity and cyclin E overexpression in ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(35):12519-12524.
364. Kojima Y, Akimoto K, Nagashima Y, et al. The overexpression and altered localization of the atypical protein kinase C lambda/iota in breast cancer correlates with the pathologic type of these tumors. *Hum Pathol.* 2008;39(6):824-831.
365. Nolan ME, Aranda V, Lee S, et al. The polarity protein Par6 induces cell proliferation and is overexpressed in breast cancer. *Cancer Res.* 2008;68(20):8201-8209.
366. Thiery JP, Sleeman JP. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006;7(2):131-142.
367. Friedl P, Gilmour D. Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009;10(7):445-457.
368. Dumortier JG, Martin S, Meyer D, Rosa FM, David NB. Collective mesendoderm migration relies on an intrinsic directionality signal transmitted through cell contacts. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(42):16945-16950.
369. Rorth P. Collective cell migration. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2009;25:407-429.
370. Drubin DG, Nelson WJ. Origins of cell polarity. *Cell.* 1996;84(3):335-344.
371. Iden S, Collard JG. Crosstalk between small GTPases and polarity proteins in cell polarization. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008;9(11):846-859.
372. Osmani N, Peglion F, Chavrier P, Etienne-Manneville S. Cdc42 localization and cell polarity depend on membrane traffic. *J Cell Biol.* 2010;191(7):1261-1269.
373. Petrie RJ, Doyle AD, Yamada KM. Random versus directionally persistent cell migration. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009;10(8):538-549.

374. Marinkovich MP. Tumour microenvironment: laminin 332 in squamous-cell carcinoma. *Nat Rev Cancer*. 2007;7(5):370-380.
375. Bar-Sagi D, Hall A. Ras and Rho GTPases: a family reunion. *Cell*. 2000;103(2):227-238.
376. Burridge K, Wennerberg K. Rho and Rac take center stage. *Cell*. 2004;116(2):167-179.
377. Raftopoulou M, Hall A. Cell migration: Rho GTPases lead the way. *Dev Biol*. 2004;265(1):23-32.
378. Adams AE, Johnson DI, Longnecker RM, Sloat BF, Pringle JR. CDC42 and CDC43, two additional genes involved in budding and the establishment of cell polarity in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol*. 1990;111(1):131-142.
379. Caviston JP, Tcheperegine SE, Bi E. Singularity in budding: a role for the evolutionarily conserved small GTPase Cdc42p. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(19):12185-12190.
380. Nalbant P, Hodgson L, Kraynov V, Touthkine A, Hahn KM. Activation of endogenous Cdc42 visualized in living cells. *Science*. 2004;305(5690):1615-1619.
381. Nobes C, Marsh M. Dendritic cells: new roles for Cdc42 and Rac in antigen uptake? *Curr Biol*. 2000;10(20):R739-741.
382. Palazzo AF, Joseph HL, Chen YJ, et al. Cdc42, dynein, and dynactin regulate MTOC reorientation independent of Rho-regulated microtubule stabilization. *Curr Biol*. 2001;11(19):1536-1541.
383. Cain RJ, Vanhaesebroeck B, Ridley AJ. The PI3K p110alpha isoform regulates endothelial adherens junctions via Pyk2 and Rac1. *J Cell Biol*. 2010;188(6):863-876.
384. Knezevic, II, Predescu SA, Neamu RF, et al. Tiam1 and Rac1 are required for platelet-activating factor-induced endothelial junctional disassembly and increase in vascular permeability. *J Biol Chem*. 2009;284(8):5381-5394.
385. Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, Zeiher AM. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature*. 1999;399(6736):601-605.
386. Fleming I, Fisslthaler B, Dimmeler S, Kemp BE, Busse R. Phosphorylation of Thr(495) regulates Ca(2+)/calmodulin-dependent endothelial nitric oxide synthase activity. *Circ Res*. 2001;88(11):E68-75.
387. Harris MB, Ju H, Venema VJ, et al. Reciprocal phosphorylation and regulation of endothelial nitric-oxide synthase in response to bradykinin stimulation. *J Biol Chem*. 2001;276(19):16587-16591.

388. Chen CA, Druhan LJ, Varadharaj S, Chen YR, Zweier JL. Phosphorylation of endothelial nitric-oxide synthase regulates superoxide generation from the enzyme. *J Biol Chem.* 2008;283(40):27038-27047.
389. Partovian C, Zhuang Z, Moodie K, et al. PKC α activates eNOS and increases arterial blood flow in vivo. *Circ Res.* 2005;97(5):482-487.
390. Thurston G, Rudge JS, Ioffe E, et al. Angiopoietin-1 protects the adult vasculature against plasma leakage. *Nat Med.* 2000;6(4):460-463.
391. Uemura A, Ogawa M, Hirashima M, et al. Recombinant angiopoietin-1 restores higher-order architecture of growing blood vessels in mice in the absence of mural cells. *J Clin Invest.* 2002;110(11):1619-1628.
392. Hanahan D. Signaling vascular morphogenesis and maintenance. *Science.* 1997;277(5322):48-50.
393. Kim I, Kim HG, So JN, Kim JH, Kwak HJ, Koh GY. Angiopoietin-1 regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-Kinase/Akt signal transduction pathway. *Circ Res.* 2000;86(1):24-29.
394. Duval M, Bedard-Goulet S, Delisle C, Gratton JP. Vascular endothelial growth factor-dependent down-regulation of Flk-1/KDR involves Cbl-mediated ubiquitination. Consequences on nitric oxide production from endothelial cells. *J Biol Chem.* 2003;278(22):20091-20097.
395. Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, et al. Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science.* 1997;277(5322):55-60.
396. Sessa WC, Garcia-Cardena G, Liu J, et al. The Golgi association of endothelial nitric oxide synthase is necessary for the efficient synthesis of nitric oxide. *J Biol Chem.* 1995;270(30):17641-17644.
397. Michell BJ, Griffiths JE, Mitchelhill KI, et al. The Akt kinase signals directly to endothelial nitric oxide synthase. *Curr Biol.* 1999;9(15):845-848.
398. Fulton D, Fontana J, Sowa G, et al. Localization of endothelial nitric-oxide synthase phosphorylated on serine 1179 and nitric oxide in Golgi and plasma membrane defines the existence of two pools of active enzyme. *J Biol Chem.* 2002;277(6):4277-4284.
399. Wang Y, Pampou S, Fujikawa K, Varticovski L. Opposing effect of angiopoietin-1 on VEGF-mediated disruption of endothelial cell-cell interactions requires activation of PKC β . *J Cell Physiol.* 2004;198(1):53-61.
400. Murohara T, Scalia R, Lefer AM. Lysophosphatidylcholine promotes P-selectin expression in platelets and endothelial cells. Possible involvement of protein kinase C activation and its inhibition by nitric oxide donors. *Circ Res.* 1996;78(5):780-789.

401. Wu HM, Yuan Y, McCarthy M, Granger HJ. Acidic and basic FGFs dilate arterioles of skeletal muscle through a NO-dependent mechanism. *Am J Physiol.* 1996;271(3 Pt 2):H1087-1093.
402. Cascone I, Audero E, Giraud E, et al. Tie-2-dependent activation of RhoA and Rac1 participates in endothelial cell motility triggered by angiotensin-1. *Blood.* 2003;102(7):2482-2490.
403. Papapetropoulos A, Garcia-Cardena G, Dengler TJ, Maisonpierre PC, Yancopoulos GD, Sessa WC. Direct actions of angiotensin-1 on human endothelium: evidence for network stabilization, cell survival, and interaction with other angiogenic growth factors. *Lab Invest.* 1999;79(2):213-223.
404. Babaei S, Teichert-Kuliszewska K, Zhang Q, Jones N, Dumont DJ, Stewart DJ. Angiogenic actions of angiotensin-1 require endothelium-derived nitric oxide. *Am J Pathol.* 2003;162(6):1927-1936.
405. Chen JX, Lawrence ML, Cunningham G, Christman BW, Meyrick B. HSP90 and Akt modulate Ang-1-induced angiogenesis via NO in coronary artery endothelium. *J Appl Physiol.* 2004;96(2):612-620.
406. Lee JS, Song SH, Kim JM, et al. Angiotensin-1 prevents hypertension and target organ damage through its interaction with endothelial Tie2 receptor. *Cardiovasc Res.* 2008;78(3):572-580.
407. Zhao YD, Campbell AI, Robb M, Ng D, Stewart DJ. Protective role of angiotensin-1 in experimental pulmonary hypertension. *Circ Res.* 2003;92(9):984-991.
408. Lin MI, Fulton D, Babbitt R, et al. Phosphorylation of threonine 497 in endothelial nitric-oxide synthase coordinates the coupling of L-arginine metabolism to efficient nitric oxide production. *J Biol Chem.* 2003;278(45):44719-44726.
409. Garcia-Cardena G, Fan R, Shah V, et al. Dynamic activation of endothelial nitric oxide synthase by Hsp90. *Nature.* 1998;392(6678):821-824.
410. Gratton JP, Fontana J, O'Connor DS, Garcia-Cardena G, McCabe TJ, Sessa WC. Reconstitution of an endothelial nitric-oxide synthase (eNOS), hsp90, and caveolin-1 complex in vitro. Evidence that hsp90 facilitates calmodulin stimulated displacement of eNOS from caveolin-1. *J Biol Chem.* 2000;275(29):22268-22272.
411. Ha CH, Bennett AM, Jin ZG. A novel role of vascular endothelial cadherin in modulating c-Src activation and downstream signaling of vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem.* 2008;283(11):7261-7270.
412. Michel JB, Feron O, Sacks D, Michel T. Reciprocal regulation of endothelial nitric-oxide synthase by Ca²⁺-calmodulin and caveolin. *J Biol Chem.* 1997;272(25):15583-15586.

413. Michel JB, Feron O, Sase K, Prabhakar P, Michel T. Caveolin versus calmodulin. Counterbalancing allosteric modulators of endothelial nitric oxide synthase. *J Biol Chem*. 1997;272(41):25907-25912.
414. Li X, Hahn CN, Parsons M, Drew J, Vadas MA, Gamble JR. Role of protein kinase C ζ in thrombin-induced endothelial permeability changes: inhibition by angiotensin-1. *Blood*. 2004;104(6):1716-1724.
415. Dejana E, Tournier-Lasserre E, Weinstein BM. The control of vascular integrity by endothelial cell junctions: molecular basis and pathological implications. *Dev Cell*. 2009;16(2):209-221.
416. Herbert SP, Stainier DY. Molecular control of endothelial cell behaviour during blood vessel morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2011;12(9):551-564.
417. Hellstrom M, Phng LK, Hofmann JJ, et al. Dll4 signalling through Notch1 regulates formation of tip cells during angiogenesis. *Nature*. 2007;445(7129):776-780.
418. Carmona-Fontaine C, Matthews HK, Kuriyama S, et al. Contact inhibition of locomotion in vivo controls neural crest directional migration. *Nature*. 2008;456(7224):957-961.
419. Jain RK. Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med*. 2003;9(6):685-693.
420. Hidalgo-Carcedo C, Hooper S, Chaudhry SI, et al. Collective cell migration requires suppression of actomyosin at cell-cell contacts mediated by DDR1 and the cell polarity regulators Par3 and Par6. *Nat Cell Biol*. 2011;13(1):49-58.
421. Macara IG. Parsing the polarity code. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2004;5(3):220-231.
422. Keely PJ, Westwick JK, Whitehead IP, Der CJ, Parise LV. Cdc42 and Rac1 induce integrin-mediated cell motility and invasiveness through PI(3)K. *Nature*. 1997;390(6660):632-636.
423. Lampugnani MG, Orsenigo F, Rudini N, et al. CCM1 regulates vascular-lumen organization by inducing endothelial polarity. *J Cell Sci*. 2010;123(Pt 7):1073-1080.
424. Lee HS, Nishanian TG, Mood K, Bong YS, Daar IO. EphrinB1 controls cell-cell junctions through the Par polarity complex. *Nat Cell Biol*. 2008;10(8):979-986.
425. Matthews HK, Marchant L, Carmona-Fontaine C, et al. Directional migration of neural crest cells in vivo is regulated by Syndecan-4/Rac1 and non-canonical Wnt signaling/RhoA. *Development*. 2008;135(10):1771-1780.
426. Cui S, Otten C, Rohr S, Abdelilah-Seyfried S, Link BA. Analysis of aPKC λ and aPKC ζ reveals multiple and redundant functions during vertebrate retinogenesis. *Mol Cell Neurosci*. 2007;34(3):431-444.

427. Korff T, Augustin HG. Integration of endothelial cells in multicellular spheroids prevents apoptosis and induces differentiation. *J Cell Biol.* 1998;143(5):1341-1352.
428. Senger DR, Ledbetter SR, Claffey KP, Papadopoulos-Sergiou A, Peruzzi CA, Detmar M. Stimulation of endothelial cell migration by vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor through cooperative mechanisms involving the α v β 3 integrin, osteopontin, and thrombin. *Am J Pathol.* 1996;149(1):293-305.
429. Witzenbichler B, Maisonpierre PC, Jones P, Yancopoulos GD, Isner JM. Chemotactic properties of angiopoietin-1 and -2, ligands for the endothelial-specific receptor tyrosine kinase Tie2. *J Biol Chem.* 1998;273(29):18514-18521.
430. Fukuhara S, Sako K, Noda K, Nagao K, Miura K, Mochizuki N. Tie2 is tied at the cell-cell contacts and to extracellular matrix by angiopoietin-1. *Exp Mol Med.* 2009;41(3):133-139.
431. Fukuhara S, Sako K, Noda K, Zhang J, Minami M, Mochizuki N. Angiopoietin-1/Tie2 receptor signaling in vascular quiescence and angiogenesis. *Histol Histopathol.* 2010;25(3):387-396.
432. Jones N, Chen SH, Sturk C, et al. A unique autophosphorylation site on Tie2/Tek mediates Dok-R phosphotyrosine binding domain binding and function. *Mol Cell Biol.* 2003;23(8):2658-2668.
433. Ayalon O, Sabanai H, Lampugnani MG, Dejana E, Geiger B. Spatial and temporal relationships between cadherins and PECAM-1 in cell-cell junctions of human endothelial cells. *J Cell Biol.* 1994;126(1):247-258.
434. Rorth P. Whence directionality: guidance mechanisms in solitary and collective cell migration. *Dev Cell.* 2011;20(1):9-18.
435. Ridley AJ, Schwartz MA, Burridge K, et al. Cell migration: integrating signals from front to back. *Science.* 2003;302(5651):1704-1709.
436. Chen SH, Babichev Y, Rodrigues N, et al. Gene expression analysis of Tek/Tie2 signaling. *Physiol Genomics.* 2005;14(2):257-267.
437. Cote JF, Vuori K. GEF what? Dock180 and related proteins help Rac to polarize cells in new ways. *Trends Cell Biol.* 2007;17(8):383-393.
438. Itoh RE, Kurokawa K, Ohba Y, Yoshizaki H, Mochizuki N, Matsuda M. Activation of rac and cdc42 video imaged by fluorescent resonance energy transfer-based single-molecule probes in the membrane of living cells. *Mol Cell Biol.* 2002;22(18):6582-6591.
439. Pegtel DM, Ellenbroek SI, Mertens AE, van der Kammen RA, de Rooij J, Collard JG. The Par-Tiam1 complex controls persistent migration by stabilizing microtubule-dependent front-rear polarity. *Curr Biol.* 2007;17(19):1623-1634.

440. Desai RA, Gao L, Raghavan S, Liu WF, Chen CS. Cell polarity triggered by cell-cell adhesion via E-cadherin. *J Cell Sci.* 2009;122(Pt 7):905-911.
441. Dupin I, Camand E, Etienne-Manneville S. Classical cadherins control nucleus and centrosome position and cell polarity. *J Cell Biol.* 2009;185(5):779-786.
442. Serrels A, Canel M, Brunton VG, Frame MC. Src/FAK-mediated regulation of E-cadherin as a mechanism for controlling collective cell movement: Insights from in vivo imaging. *Cell Adh Migr.* 2011;5(4):360-365.
443. Koh W, Mahan RD, Davis GE. Cdc42- and Rac1-mediated endothelial lumen formation requires Pak2, Pak4 and Par3, and PKC-dependent signaling. *J Cell Sci.* 2008;121(Pt 7):989-1001.
444. Pietila R, Natynki M, Tammela T, et al. Ligand oligomerization state controls Tie2 receptor trafficking and angiopoietin-2-specific responses. *J Cell Sci.* 2012;125(Pt 9):2212-2223.
445. Montero-Balaguer M, Swirsding K, Orsenigo F, Cotelli F, Mione M, Dejana E. Stable vascular connections and remodeling require full expression of VE-cadherin in zebrafish embryos. *PLoS One.* 2009;4(6):e5772.
446. Wang Y, Kaiser MS, Larson JD, et al. Moesin1 and Ve-cadherin are required in endothelial cells during in vivo tubulogenesis. *Development.* 2010;137(18):3119-3128.
447. Arima S, Nishiyama K, Ko T, et al. Angiogenic morphogenesis driven by dynamic and heterogeneous collective endothelial cell movement. *Development.* 2011;138(21):4763-4776.
448. Suchting S, Freitas C, le Noble F, et al. The Notch ligand Delta-like 4 negatively regulates endothelial tip cell formation and vessel branching. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(9):3225-3230.
449. Gjini E, Hekking LH, Kuchler A, et al. Zebrafish Tie-2 shares a redundant role with Tie-1 in heart development and regulates vessel integrity. *Dis Model Mech.* 2011;4(1):57-66.
450. Iden S, Rehder D, August B, et al. A distinct PAR complex associates physically with VE-cadherin in vertebrate endothelial cells. *EMBO Rep.* 2006;7(12):1239-1246.
451. Plant PJ, Fawcett JP, Lin DC, et al. A polarity complex of mPar-6 and atypical PKC binds, phosphorylates and regulates mammalian Lgl. *Nat Cell Biol.* 2003;5(4):301-308.
452. Mitra RD, Silva CM, Youvan DC. Fluorescence resonance energy transfer between blue-emitting and red-shifted excitation derivatives of the green fluorescent protein. *Gene.* 1996;173(1 Spec No):13-17.
453. Kim I, Kim HG, Moon SO, et al. Angiopoietin-1 induces endothelial cell sprouting through the activation of focal adhesion kinase and plasmin secretion. *Circ Res.* 2000;86(9):952-959.

454. Dumont DJ, Gradwohl G, Fong GH, et al. Dominant-negative and targeted null mutations in the endothelial receptor tyrosine kinase, tek, reveal a critical role in vasculogenesis of the embryo. *Genes Dev.* 1994;8(16):1897-1909.
455. Kawamura H, Li X, Goishi K, et al. Neuropilin-1 in regulation of VEGF-induced activation of p38MAPK and endothelial cell organization. *Blood.* 2008;112(9):3638-3649.
456. Chen TT, Luque A, Lee S, Anderson SM, Segura T, Iruela-Arispe ML. Anchorage of VEGF to the extracellular matrix conveys differential signaling responses to endothelial cells. *J Cell Biol.* 2010;188(4):595-609.
457. Robinson SD, Reynolds LE, Kostourou V, et al. Alpha v beta3 integrin limits the contribution of neuropilin-1 to vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis. *J Biol Chem.* 2009;284(49):33966-33981.
458. Lee S, Jilani SM, Nikolova GV, Carpizo D, Iruela-Arispe ML. Processing of VEGF-A by matrix metalloproteinases regulates bioavailability and vascular patterning in tumors. *J Cell Biol.* 2005;169(4):681-691.
459. Chen SL, Zhu CC, Liu YQ, et al. Mesenchymal stem cells genetically modified with the angiopoietin-1 gene enhanced arteriogenesis in a porcine model of chronic myocardial ischaemia. *J Int Med Res.* 2009;37(1):68-78.
460. Shen F, Walker EJ, Jiang L, et al. Coexpression of angiopoietin-1 with VEGF increases the structural integrity of the blood-brain barrier and reduces atrophy volume. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2011;31(12):2343-2351.
461. Zhang J, Fukuhara S, Sako K, et al. Angiopoietin-1/Tie2 signal augments basal Notch signal controlling vascular quiescence by inducing delta-like 4 expression through AKT-mediated activation of beta-catenin. *J Biol Chem.* 2011;286(10):8055-8066.
462. Kontos CD, Stauffer TP, Yang WP, et al. Tyrosine 1101 of Tie2 is the major site of association of p85 and is required for activation of phosphatidylinositol 3-kinase and Akt. *Mol Cell Biol.* 1998;18(7):4131-4140.
463. Lebensohn AM, Kirschner MW. Activation of the WAVE complex by coincident signals controls actin assembly. *Mol Cell.* 2009;36(3):512-524.
464. Oikawa T, Yamaguchi H, Itoh T, et al. PtdIns(3,4,5)P3 binding is necessary for WAVE2-induced formation of lamellipodia. *Nat Cell Biol.* 2004;6(5):420-426.
465. Sossey-Alaoui K, Li X, Ranalli TA, Cowell JK. WAVE3-mediated cell migration and lamellipodia formation are regulated downstream of phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem.* 2005;280(23):21748-21755.
466. Pankov R, Endo Y, Even-Ram S, et al. A Rac switch regulates random versus directionally persistent cell migration. *J Cell Biol.* 2005;170(5):793-802.

467. Gupton SL, Anderson KL, Kole TP, et al. Cell migration without a lamellipodium: translation of actin dynamics into cell movement mediated by tropomyosin. *J Cell Biol.* 2005;168(4):619-631.
468. Liebner S, Corada M, Bangsow T, et al. Wnt/beta-catenin signaling controls development of the blood-brain barrier. *J Cell Biol.* 2008;183(3):409-417.
469. Yang DH, Yoon JY, Lee SH, et al. Wnt5a is required for endothelial differentiation of embryonic stem cells and vascularization via pathways involving both Wnt/beta-catenin and protein kinase Calpha. *Circ Res.* 2009;104(3):372-379.
470. Luna-Ulloa LB, Hernandez-Maqueda JG, Castaneda-Patlan MC, Robles-Flores M. Protein kinase C in Wnt signaling: Implications in cancer initiation and progression. *IUBMB Life.* 2011;63(10):873-879.
471. Luna-Ulloa LB, Hernandez-Maqueda JG, Santoyo-Ramos P, Castaneda-Patlan MC, Robles-Flores M. Protein kinase C zeta is a positive modulator of canonical Wnt signaling pathway in tumoral colon cell lines. *Carcinogenesis.* 2011;32(11):1615-1624.
472. Ossipova O, Bardeesy N, DePinho RA, Green JB. LKB1 (XEEK1) regulates Wnt signalling in vertebrate development. *Nat Cell Biol.* 2003;5(10):889-894.
473. Cui J, Jiang W, Wang S, Wang L, Xie K. Role of Wnt/beta-catenin signaling in drug resistance of pancreatic cancer. *Curr Pharm Des.* 2012;18(17):2464-2471.
474. Jamieson C, Sharma M, Henderson BR. Wnt signaling from membrane to nucleus: beta-catenin caught in a loop. *Int J Biochem Cell Biol.* 2012;44(6):847-850.
475. Valenta T, Hausmann G, Basler K. The many faces and functions of beta-catenin. *EMBO J.* 2012;31(12):2714-2736.
476. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med.* 1971;285(21):1182-1186.
477. Losordo DW, Vale PR, Isner JM. Gene therapy for myocardial angiogenesis. *Am Heart J.* 1999;138(2 Pt 2):S132-141.
478. Baumgartner I, Isner JM. Stimulation of peripheral angiogenesis by vascular endothelial growth factor (VEGF). *Vasa.* 1998;27(4):201-206.
479. Lee LY, Patel SR, Hackett NR, et al. Focal angiogen therapy using intramyocardial delivery of an adenovirus vector coding for vascular endothelial growth factor 121. *Ann Thorac Surg.* 2000;69(1):14-23; discussion 23-14.

