

Université de Montréal

**Rôle de la protéine tyrosine phosphatase DEP-1 dans la régulation du programme  
angiogénique induit par le VEGF**

par

Catherine Chabot

Programme de Biologie Moléculaire

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté de Médecine

En vue de l'obtention du grade de

Philosophiae Doctor (Ph. D.)

en Biologie Moléculaire

Mars, 2009

©Catherine Chabot, 2009

Université de Montréal  
Faculté de Médecine

Cette thèse intitulée :

**Rôle de la protéine tyrosine phosphatase DEP-1 dans la régulation du programme  
angiogénique induit par le VEGF**

par

Catherine Chabot

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Anne-Marie Mes-Masson, président-rapporteur

Isabelle Royal, directeur de recherche

Marie-Josée Hébert, membre du jury

Michel Tremblay, examinateur externe

Muriel Aubry, représentante du doyen

## Résumé

Depuis la découverte de la première protéine possédant une activité tyrosine kinase (proteïn tyrosine kinase [PTK]) dans les années 1980, l'importance des PTKs et de la phosphorylation sur résidu tyrosine dans la régulation des événements de signalisation intracellulaire est bien établie. Quant aux protéines qui possèdent une activité tyrosine phosphatase (proteïn tyrosine phosphatase [PTP]), dont l'existence n'a été dévoilée qu'une dizaine d'années plus tard, elles ont longtemps été perçues comme des enzymes dont le rôle ne se résumait qu'à contrecarrer passivement les activités des PTKs. Il est maintenant clair que les activités des PTPs sont spécifiques, hautement régulées, et qu'elles doivent être coordonnées avec celles des PTKs pour une régulation adéquate des événements de signalisation intracellulaire. En dépit de cette évidence, la contribution des PTPs à la régulation des différents processus physiologiques fondamentaux demeure encore peu caractérisée. C'est le cas, notamment, de l'angiogenèse, le processus par lequel de nouveaux vaisseaux sanguins sont formés à partir de ceux préexistants. Le VEGF (Vascular endothelial growth factor), un des facteurs angiogéniques les plus importants, est connu pour induire majoritairement ses effets biologiques via l'activation du récepteur à activité tyrosine kinase VEGFR2 (Vascular endothelial growth factor receptor 2). Puisque l'angiogenèse est impliquée dans le développement d'une multitude de pathologies, dont la progression tumorale, une meilleure caractérisation des PTPs qui assurent la qualité de la réponse angiogénique en agissant de pair avec le VEGFR2 s'avère cruciale et ce, afin de raffiner les outils thérapeutiques actuels.

L'expression de la PTP DEP-1 corrèle avec la déphosphorylation du récepteur VEGFR2 localisé au niveau des jonctions cellules-cellules et contribue à l'inhibition de la prolifération des cellules endothéliales en réponse au VEGF lorsque les cellules sont à confluence. Par contre, la contribution spécifique de DEP-1 à la régulation des voies de signalisation et des réponses biologiques induites par le VEGF demeurerait toujours inconnue. Les travaux de recherche présentés dans cette thèse démontrent tout d'abord que DEP-1 régule négativement l'activité tyrosine kinase de VEGFR2 en déphosphorylant spécifiquement les résidus tyrosine Y1054/Y1059 de sa boucle

d'activation. Cette déphosphorylation mène par conséquent à une diminution générale de la phosphorylation du récepteur et à une atténuation de la plupart des voies de signalisation induites par le VEGF, incluant la voie mitogénique PLC $\gamma$ -ERK1/2. Par ailleurs, malgré ce rôle négatif global, nos travaux révèlent étonnement, et pour la première fois, que DEP-1 contribue d'une manière positive à la promotion de la survie des cellules endothéliales via l'activation de la voie Src-Gab1-Akt en aval du récepteur VEGFR2. Ce pouvoir pro-survie de DEP-1 dans les cellules endothéliales réside avant tout dans sa capacité à déphosphoryler la tyrosine inhibitrice de Src (Y529). Au cours de notre étude, nous avons pu identifier deux résidus tyrosine au niveau de l'extrémité carboxy-terminale de DEP-1, Y1311 et Y1320, dont la phosphorylation est dépendante de Src. Nos travaux révèlent par ailleurs que ces deux résidus tyrosine phosphorylés lient le domaine SH2 de Src et que la Y1320 est principalement requise pour l'activation de Src et d'Akt en réponse au VEGF dans les cellules endothéliales.

Ces résultats constituent donc une avancée majeure dans la compréhension des mécanismes moléculaires par lesquels DEP-1 peut réguler le programme angiogénique dépendant du VEGF. De plus, cette découverte d'un rôle positif pour DEP-1 dans la survie des cellules endothéliales pourrait mener à l'élaboration de nouvelles approches thérapeutiques visant à inhiber cette fonction spécifique de DEP-1 pour bloquer l'angiogenèse pathologique.

**Mots clés**

Angiogenèse, cellules endothéliales, signalisation intracellulaire, VEGFR2, Src, Gab1, Akt, VE-cadhérine, survie

## Abstract

Since the discovery of the first protein tyrosine kinase [PTK] in 1980, the importance of these proteins and of tyrosine phosphorylation cascades in the regulation of intracellular signaling events has been well-established. The protein tyrosine phosphatases [PTPs], whose existence was only revealed ten years later, have been regarded for a long time as passive PTKs counteracting enzymes. It is now evident that PTPs activities are specific, exquisitely regulated, and that they have to be coordinated with PTKs activities for an appropriate regulation of intracellular signaling events. Despite these findings, the contribution of PTPs to the regulation of many fundamental physiological processes is not well-characterized. This is the case of angiogenesis, the process whereby new vessels are generated from pre-existing ones. Vascular endothelial growth factor (VEGF), one of the most important angiogenic factors, is known to induce its biological effects mainly by activating VEGFR2 (Vascular endothelial growth factor receptor 2). As angiogenesis is involved in the development of a multitude of pathologies, including tumoral progression, a better characterization of PTPs, which ensure the quality of the angiogenic response by acting together with VEGFR2, is crucial to refine current therapeutic tools.

Expression of a PTP called DEP-1 correlates with dephosphorylation of VEGFR2, and contributes to the inhibition of VEGF-induced endothelial cell proliferation at high cell confluence. However, the specific contribution of DEP-1 to the regulation of signaling pathways and biological responses induced by VEGF remained unknown. The research presented in this thesis demonstrates that DEP-1 negatively regulates the tyrosine kinase activity of VEGFR2 by dephosphorylating the specific tyrosine residues Y1054/Y1059 in its activation loop. Consequently, this leads to a global decrease in the phosphorylation of the receptor and to a reduced activation of most of the signaling cascades induced by VEGF, including the mitogenic PLC $\gamma$ -ERK1/2 pathway. Moreover, despite this negative role, our work reveals for the first time that DEP-1 contributes in a positive way to promote the survival of endothelial cells via the activation of the Src-Gab1-Akt pathway downstream of VEGFR2. This survival function of DEP-1 in endothelial cells is accomplished by the

dephosphorylation of the Src inhibitory tyrosine (Y529). During our study, we identified two residues in the carboxy-terminal tail of DEP-1, Y1311 and Y1320, whose phosphorylation is dependent on Src. These two phosphorylated tyrosine residues bind to the SH2 domain of Src, and our work also revealed that mostly Y1320 is required for Src and Akt activation upon VEGF stimulation of endothelial cells.

These findings represent a major step forward in our understanding of the molecular mechanisms by which DEP-1 may regulate the VEGF-dependent angiogenic program. Moreover, the discovery of a positive role for DEP-1 in the survival of endothelial cells could lead to the development of new therapeutic approaches to inhibit this specific function of DEP-1 in order to block pathological angiogenesis.

**Key words**

Angiogenesis, endothelial cells, cell signaling, VEGFR2, Src, Gab1, Akt, VE-cadherin, survival



## Table des matières

Résumé .....	i
Mots clés.....	iii
Abstract.....	iv
Key words.....	vi
Table des matières .....	vii
Liste des figures.....	x
Abréviations .....	xii
Remerciements .....	xiv

## Chapitre 1

1. Introduction .....	1
1.1 L'angiogenèse et la vasculogenèse : deux processus impliqués dans la formation de nouveaux vaisseaux sanguins .....	1
1.2 Les principaux médiateurs de la formation de nouveaux vaisseaux sanguins .....	2
1.2.1 Rôle du VEGF dans la détermination du phénotype endothélial lors de la formation d'un nouveau rameau vasculaire .....	3
1.2.2 La famille du VEGF et ses récepteurs.....	5
1.2.3 Activités biologiques induites par le VEGF-A <sub>165</sub> via le récepteur VEGFR2 ..	8
1.2.3.1 Prolifération.....	9
1.2.3.2 Migration .....	11
1.2.3.3 Survie.....	11
1.2.3.4 Perméabilité vasculaire.....	13
1.3 Les PTPs.....	14
1.3.1 La réaction de déphosphorylation .....	14
1.3.2 Les PTPs classiques.....	15
1.3.3 Mécanismes de régulation des PTPs classiques .....	15
1.3.3.1 Niveaux d'expression .....	16
1.3.3.2 Localisation subcellulaire.....	17

1.3.3.3 Ligands des PTPs de type récepteur .....	18
1.3.3.4 Dimérisation des PTPs de type récepteur .....	19
1.3.3.5 Phosphorylation sur résidus sérine et tyrosine .....	19
1.3.3.6 Clivage protéolytique limité .....	21
1.3.3.7 Oxydation des PTPs .....	22
1.4 Les kinases de la famille de Src (SFks) .....	22
1.4.1 Structure des SFks .....	22
1.4.2 Principaux mécanismes d'activation des SFks .....	24
1.5 Régulation des SFks par les PTPs classiques .....	25
1.5.1 PTP $\alpha$ .....	26
1.5.2 CD45 .....	28
1.5.3 PTP $\epsilon$ .....	30
1.5.4 PTP1B .....	30
1.5.5 SHP-2 .....	31
1.6 Régulation des activités du récepteur VEGFR2 par les PTPs .....	31
1.6.1 SHP-1 et SHP-2 .....	32
1.6.2 TC-PTP .....	32
1.6.3 PTP $\beta$ /VE-PTP .....	33
1.6.4 PTP1B .....	34
1.6.5 DEP-1/ PTP $\eta$ / CD148/PTPRJ .....	34
1.6.5.1 Régulation du récepteur VEGFR2 par le complexe VE-cadhérine/ $\beta$ -caténine/DEP-1 .....	36
1.7 Objectifs des travaux de recherche .....	39

**Chapitre 2: New role for the protein tyrosine phosphatase DEP-1 in Akt activation and endothelial cell survival (Molecular and Cellular Biology, vol. 29(1): 241-253)**

Abstract .....	42
Introduction .....	43
Materials and Methods .....	46
Results .....	53

Discussion.....	72
Acknowledgments .....	78

**Chapitre 3: Tyrosine 1320 from the carboxy-terminal tail of the protein tyrosine phosphatase DEP-1 is required for VEGF-induced Src and Akt activation in endothelial cells (article non publié au moment du dépôt final de la thèse)**

Abstract.....	80
Introduction .....	81
Materials and Methods .....	83
Results .....	86
Discussion.....	95
Acknowledgments .....	97

**Chapitre 4**

4. Discussion.....	98
4.1 Conclusions et perspectives thérapeutiques .....	108

**Chapitre 5**

5. Références .....	111
---------------------	-----

## Liste des figures

### Chapitre 1

Figure 1. Développement du système vasculaire. ....	2
Figure 2. Modèle de formation d'un nouveau rameau vasculaire. ....	4
Figure 3. Patrons d'expression, spécificité et effets cellulaires/physiologiques des récepteurs au VEGF (VEGFRs). ....	7
Figure 4. Voies de signalisation intracellulaires induites par le VEGF-A via l'activation du récepteur VEGFR2. ....	10
Figure 5. Les PTPs classiques. ....	16
Figure 6. Structure des SFKs et principaux sites de phosphorylation sur tyrosine. ....	23
Figure 7. Conformation active et inactive de Src et principaux mécanismes impliqués dans l'activation des SFKs. ....	25
Figure 8. Modèle d'activation de Src par un mécanisme de phospho-déplacement de son domaine SH2. ....	28
Figure 9. Modèle de régulation des propriétés signalitiques du récepteur VEGFR2 par les VE-cadhérines au niveau des jonctions adhérentes. ....	38

### Chapitre 2

Figure 1. VEGFR2 and the CSF-VEGFR2 chimera are substrates of DEP-1. ....	56
Figure 2. DEP-1 leads to the global dephosphorylation of VEGFR2. ....	58
Figure 3. DEP-1 D/A traps VEGFR2 via tyrosine residues in the activation loop. ....	60
Figure 4. Depletion of DEP-1 leads to the global increase in tyrosine phosphorylation of VEGFR2. ....	62
Figure 5. Depletion of DEP-1 does not lead to the general enhancement of VEGF-dependent signaling. ....	64
Figure 6. Src activity is required for VEGF-dependent Akt activation and is impaired in DEP-1-depleted cells. ....	66

Figure 7. Depletion of DEP-1 interferes with the Src-sensitive tyrosine phosphorylation of Gab1 and its association with Src and PI3K in response to VEGF stimulation. ....	68
Figure 8. Gab1 associates with VEGFR2/VE-cadherin complexes and this is impaired in DEP-1-depleted HUVECs. ....	70
Figure 9. The depletion of DEP-1 promotes endothelial cell death in response to VEGF and FGF. ....	72
Figure 10. Model. ....	73

### **Chapitre 3**

Figure 1. DEP-1 is phosphorylated on tyrosine residues by Src .....	86
Figure 2. Y1311 and Y1320 of DEP-1 are the major sites of tyrosine phosphorylation on DEP-1. ....	88
Figure 3. DEP-1 associates with Src via Y1311 and Y1320. ....	89
Figure 4. DEP-1 Y1311 and Y1320 bind Src via its SH2 domain. ....	91
Figure 5. DEP-1 Y1320 is required for Src activation. ....	94

### **Chapitre 4**

Figure 10. Nouveau modèle de régulation des propriétés signalitiques du récepteur VEGFR2 par le complexe VE-cadhérine/ $\beta$ -caténine/DEP-1. ....	99
--	----

## Abréviations

ARNm: acide ribonucléique messenger

BCR : récepteur des cellules B

BS<sup>3</sup> : bis (sulfosuccinimidyl) suberate

DNA: acide déoxyribonucléique

EGF : facteur de croissance de l'épiderme

eNOS : synthase endothéliale de NO

ERK1/2 : kinases régulées par les signaux extracellulaires

FAK : kinase des complexes d'adhérence focale

bFGF : facteur de croissance fibroblastique (basique)

FOXO1/4 : facteurs de transcription de la famille Forkhead du groupe O-1/4

GFP : protéine à fluorescence verte

HA : hemagglutinine

HEK 293: cellules embryonnaires humaines de rein

HGF : facteur de croissance des hépatocytes

HSPG : protéoglycan d'héparan-sulfate

HUVECs: cellules endothéliales de veines ombilicales

kDa : kilo Dalton

kpb : kilo paires de bases

MBP : protéine basique des membranes de myéline

NRP-1 : neuropiline-1

PDGF- $\beta$  : facteur de croissance dérivé des plaquettes- $\beta$

PI3K : kinase du phosphatidyl inositol-3

pNPP : para-nitrophenyl phosphate

PCR : réaction de polymérisation en chaîne

PKA : protéine kinase A

PKC : protéine kinase C

PLC $\gamma$ : phospholipase C  $\gamma$

PLGF : facteur de croissance du placenta

PTK : protéine à activité tyrosine kinase

PTP : protéine tyrosine phosphatase

ROS : espèce réactive de l'oxygène

RTK : récepteur à activité tyrosine kinase

SFK : kinase de la famille de Src

TCR : récepteur des cellules T

VEGF : facteur de croissance de l'endothélium vasculaire

VEGFR-1 : récepteur au facteur de croissance de l'endothélium vasculaire-1

VEGFR-2/KDR/Flk-1 : récepteur au facteur de croissance de l'endothélium vasculaire-2

VEGFR-3 : récepteur au facteur de croissance de l'endothélium vasculaire-3

## Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de recherche, le Dr Isabelle Royal, pour l'excellence de son encadrement, sa passion et son dévouement. Je remercie également mes collègues de travail actuels, Christine Caron et plus particulièrement Kathleen Spring, avec qui j'ai travaillé en étroite collaboration pour la réalisation du deuxième article présenté dans cette thèse. Je tiens aussi à accorder une reconnaissance toute spéciale à tous les membres de la grande famille de l'Institut du cancer de Montréal, qui ont su m'aider par leur support technique ou moral tout au long de mon parcours.

J'aimerais remercier les membres de mon comité de thèse, le Dr Anne-Marie Mes-Masson et le Dr Mounib Elchebly, qui m'ont suivi durant toute ma formation doctorale. J'aimerais de plus souligner les différents organismes qui ont participé au financement de mon projet de recherche, soit l'Institut du cancer de Montréal, Canderel, la fondation Marc Bourgie, la fondation Robert-Bourassa, le programme de biologie moléculaire, la Faculté des études supérieures de l'université de Montréal et le Centre de recherche du CHUM.

Je remercie en terminant mes parents, pour leur fierté, ainsi que Karl, mon mari, pour la vie...



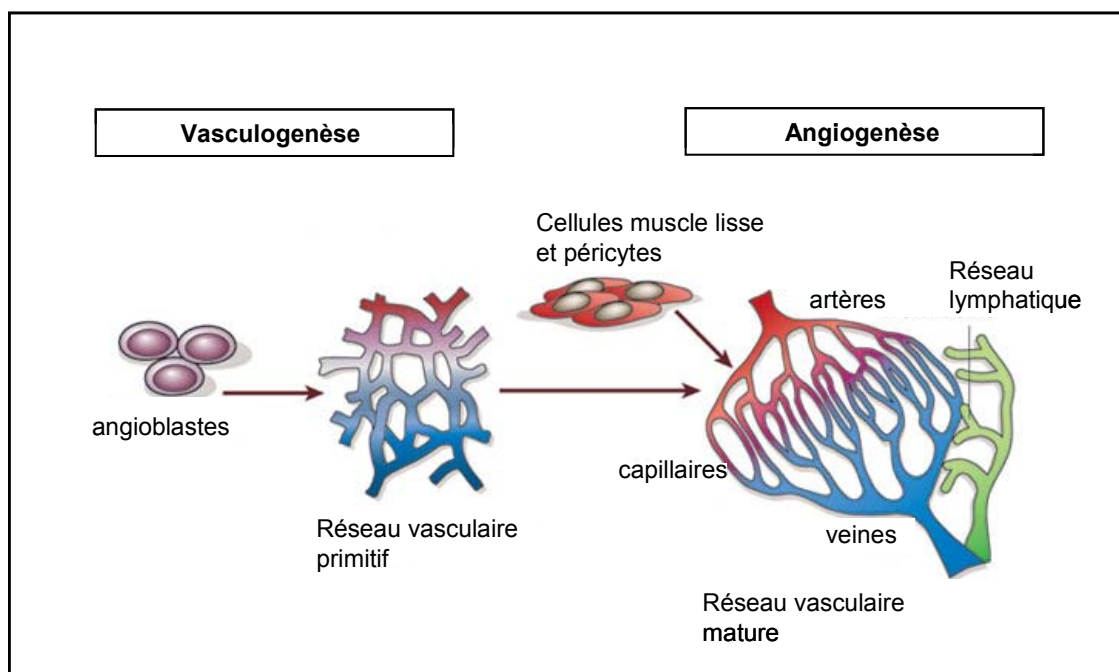
## 1. Introduction

### 1.1 L'angiogenèse et la vasculogenèse : deux processus impliqués dans la formation de nouveaux vaisseaux sanguins

La formation de nouveaux vaisseaux sanguins résulte principalement de deux processus, la vasculogenèse et l'angiogenèse (49, 50, 319) (Figure 1). La vasculogenèse, qui se produit très tôt lors du développement embryonnaire, est le processus par lequel les cellules endothéliales vont se différencier à partir de cellules souches et proliférer *in situ* pour générer un réseau tubulaire primitif. Ce réseau est composé d'artérioles et de veinules interconnectées entre elles pour former une structure alvéolaire plus ou moins définie. L'angiogenèse embryonnaire permettra la croissance, le remodelage et la stabilisation de ces capillaires immatures pour donner lieu à une vasculature ramifiée et hautement organisée. Si ces deux processus sont aussi impliqués l'un que l'autre dans le développement du système vasculaire chez l'embryon, l'angiogenèse est la principale responsable de la formation de nouveaux vaisseaux sanguins chez l'adulte. Cette dernière n'est toutefois déclenchée que dans certaines conditions particulières, soit au cours du cycle ovarien chez la femme, lors du développement du placenta durant la grossesse ou lors de la réparation d'organes endommagés. L'angiogenèse repose donc chez l'adulte sur la rétention par les cellules endothéliales de leur capacité à dégrader la membrane basale qui les entoure pour se remettre à proliférer, migrer et s'organiser en une structure tubulaire fonctionnelle en réponse à un gradient de facteurs angiogéniques. Une fois les nouveaux vaisseaux formés, les cellules endothéliales retrouvent finalement leur état de quiescence originel. Une fine régulation de l'angiogenèse s'avère par ailleurs essentielle car si elle est insuffisante ou excessive, l'angiogenèse peut contribuer au développement d'une multitude de pathologies dont l'arthrite, l'athérosclérose, les rétinopathies diabétiques, l'ischémie cardiaque, ou la progression tumorale (49).

## 1.2 Les principaux médiateurs de la formation de nouveaux vaisseaux sanguins

Le VEGF est de loin l'inducteur le plus critique dans la formation de nouveaux vaisseaux sanguins puisqu'il contrôle l'initiation de la vasculogénèse, mais aussi celle de l'angiogénèse, à la fois lors du développement embryonnaire et chez l'adulte. La formation de nouveaux vaisseaux sanguins est toutefois un processus complexe qui fait appel à la participation concertée de plusieurs médiateurs moléculaires (3). Parmi ceux-ci, les plus importants et les mieux caractérisés sont les récepteurs à activité tyrosine kinase de la famille de l'angiopoïétine et de l'éphrine, qui sont préférentiellement exprimés à la surface des cellules endothéliales (49, 331).



**Figure 1. Développement du système vasculaire.** Lors de la vasculogénèse, des cellules souches (angioblastes) donnent naissance à un enchevêtrement d'artères et de veines. Lors de l'angiogénèse embryonnaire, ce réseau vasculaire primitif s'étend et se ramifie et des cellules de support recouvrent les canaux pour stabiliser cette nouvelle structure hautement organisée (adapté de (50) avec la permission de Macmillan Publishers Ltd : [Nature], copyright (2005)).

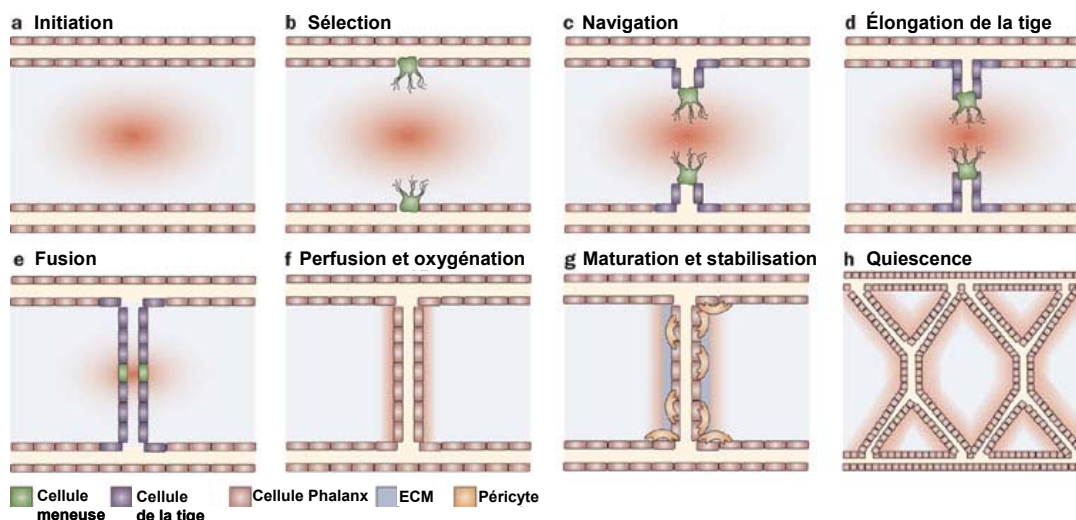
Les membres de la famille de l'angiopoïétine, et leurs récepteurs Tie1 et Tie2, de même que les membres de la famille de l'éphrine, plus particulièrement l'éphrin-B2 et son récepteur EphB4, sont nécessaires pour le remodelage et la maturation de cette

vasculature initiale induite par le VEGF. L'ephrin-B2 et son récepteur EphB4 sont aussi particulièrement importants pour la définition de l'identité artérielle ou veineuse des vaisseaux sanguins en développement. L'angiopoïétine continuerait par ailleurs à être requise pour le maintien de la stabilité et de la quiescence du réseau vasculaire mature. Les cellules endothéliales expriment aussi d'autres RTKs, tels que les récepteurs au bFGF, PDGF et à l'EGF, qui ne sont pas spécifiques à l'endothélium vasculaire mais qui vont agir de concert avec les récepteurs au VEGF, à l'angiopoïétine et à l'éphrine, pour orchestrer la formation de nouveaux vaisseaux sanguins (7, 66, 243, 251, 335).

### **1.2.1 Rôle du VEGF dans la détermination du phénotype endothélial lors de la formation d'un nouveau rameau vasculaire**

Malgré l'importance du phénomène angiogénique aussi bien en conditions physiologiques qu'en conditions pathologiques, comment, précisément, un nouveau rameau vasculaire peut être créé à partir d'un vaisseau sanguin pré-existant demeure encore largement indéfini. Par contre, un nouveau modèle d'angiogenèse *in vivo* commence à émerger (72). Ce modèle, mis de l'avant par le groupe de Carmeliet en 2009, repose essentiellement sur la reconnaissance de cellules endothéliales spécialisées qui possèdent une signature moléculaire et un phénotype distinct (72, 145, 322). Ainsi, selon ce modèle, il existerait trois types de cellules endothéliales au niveau du rameau vasculaire en bourgeonnement ; la cellule meneuse, les cellules de la tige et les cellules de type "Phalanx" (Figure 2).

La cellule meneuse, qui a été observée dans plusieurs modèles d'angiogenèse, est celle qui est reconnue pour guider le nouveau vaisseau sanguin en formation (119, 212, 256). Cette cellule est en effet fortement polarisée et elle présente plusieurs filopodes qui sondent l'environnement et qui vont lui permettre de migrer vers le stimulus angiogénique. La cellule meneuse est aussi celle qui est exposée aux plus fortes doses de facteurs angiogéniques et des études génétiques ont démontré que le VEGF est primordial dans le processus de sélection et d'induction de la cellule meneuse (119).



**Figure 2. Modèle de formation d'un nouveau rameau vasculaire.** **A)** En réponse à l'hypoxie, les cellules non-vasculaires produisent un gradient de VEGF (illustré par un point rouge dont l'intensité s'atténue graduellement afin de représenter des concentrations de plus en plus faibles de ce facteur angiogénique). **B)** La cellule exposée à la plus forte concentration de VEGF est sélectionnée pour devenir une cellule meneuse (en vert) **C)** À l'aide de ses nombreux filopodes, la cellule meneuse envahit le tissu environnant et influe une direction au nouveau bourgeon vasculaire. **D)** Le nouveau bourgeon vasculaire s'allonge en raison de la prolifération des cellules qui suivent tout juste derrière la cellule meneuse et que l'on a défini comme les cellules de la tige (en violet). **E)** La nouvelle branche se connecte à une autre suite à la fusion des cellules meneuses situées à l'extrémité de chacune de ces deux branches. **F)** La formation d'une lumière vasculaire permet l'initiation du flux sanguin et, en retour, l'oxygénation du tissu, ce qui réduit les niveaux de VEGF. **G)** La maturation et la stabilisation des vaisseaux sanguins naissants se fait ensuite via le recrutement de péricytes (en orange) et le dépôt d'une nouvelle matrice extracellulaire (en bleu). **H)** Au niveau des vaisseaux sanguins bien établis, les cellules endothéliales sont quiescentes et elles présentent une morphologie de type "Phalanx" (en beige) (adapté de (51) avec la permission de Macmillan Publishers Ltd : [Nature Reviews Clinical Oncology], copyright (2009)).

L'activation du récepteur VEGFR2 par le VEGF induit l'expression de Dll4, qui serait impliqué dans le remodelage du cytosquelette d'actine qui se produit au sein de la cellule meneuse (90). Dll4 lie par ailleurs le récepteur Notch situé au niveau des cellules voisines et la signalisation induite par Notch mène quant à elle à une diminution de l'expression de VEGFR2 et par conséquent à celle de Dll4 (249). Ainsi, l'activation du récepteur VEGFR2 par le VEGF permet d'une part à la cellule meneuse de gagner son

titre et d'autre part de le conserver en empêchant les cellules suivantes de quitter leur position au niveau de la tige.

Les cellules de la tige sont celles qui suivent tout juste derrière la cellule meneuse et dont les fonctions principales consistent à proliférer pour allonger la tige, former une lumière et éventuellement se connecter à la circulation (72). Contrairement aux cellules meneuses, les cellules de la tige ne présentent pas de filopodes et comme mentionné précédemment, le phénotype de ces cellules est entre autre induit par la liaison de Dll4 au récepteur Notch (134, 230, 249, 280).

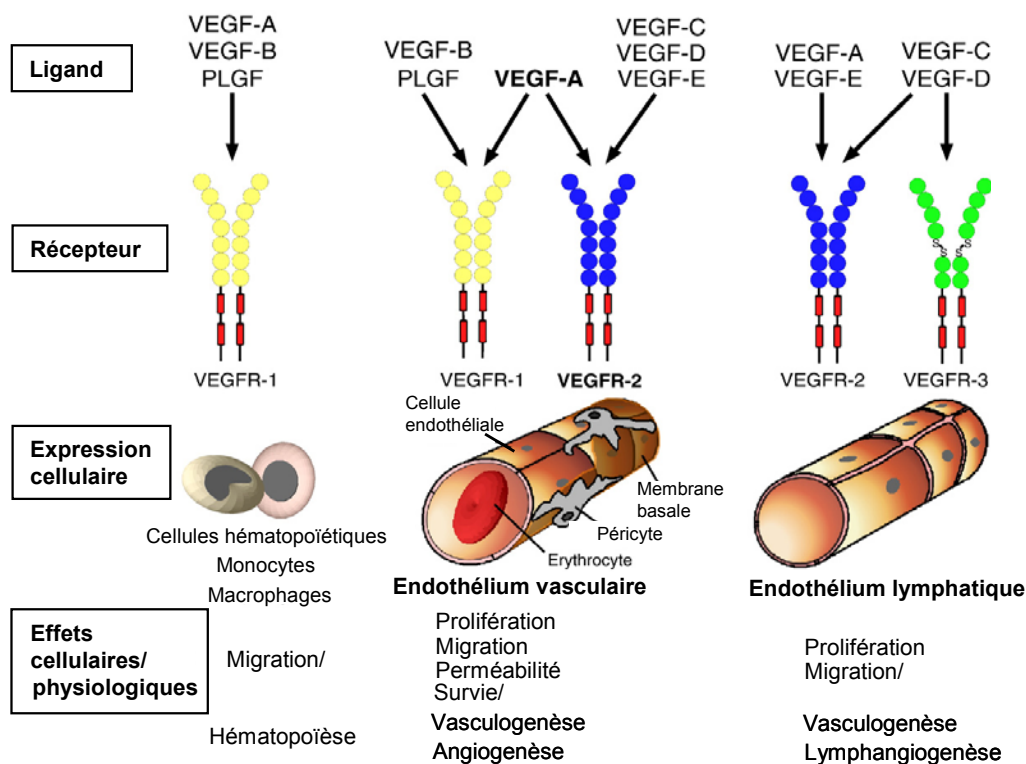
Pour ce qui est des cellules de type "Phalanx", elles ressemblent aux cellules de la tige en ce sens qu'elles ne présentent pas de filopodes, qu'elles établissent des liens serrés et qu'elles participent à la production et au dépôt d'une nouvelle membrane basale, mais elles diffèrent de ces dernières par leur état de quiescence plus marqué et leur prolifération fortement réduite en réponse au VEGF (72, 216). Ces cellules ont été nommées ainsi par le groupe de Carmeliet parce qu'elles sont bien alignées et bien serrées à l'image de la formation militaire du même nom qui était adoptée par les soldats de la Grèce antique et leur rôle présumé est d'assurer la perfusion de la nouvelle branche (216). Les déterminants moléculaires des cellules de type Phalanx sont encore largement inconnus mais il semblerait que l'état de quiescence de ces cellules soit entre autres maintenu par des niveaux élevés de VE-cadhérines (216). Les VE-cadhérines peuvent former un complexe avec le VEGFR2 et ce complexe est reconnu pour orienter la réponse angiogénique induite par le VEGF vers la survie et la quiescence plutôt que la migration et la prolifération (193, 315). Ainsi, à la lumière de ce nouveau modèle d'angiogenèse, on peut affirmer que la signalisation induite par le VEGF, via le récepteur VEGFR2, est un déterminant majeur du phénotype endothélial lors de la création d'un nouveau rameau vasculaire.

### **1.2.2 La famille du VEGF et ses récepteurs**

Chez les mammifères, la famille du VEGF est constituée de 5 membres; le VEGF-A, -B, -C, -D et le PLGF (96, 228). Il existe aussi deux autres protéines structurellement apparentées aux membres de cette famille, soit le VEGF-E, qui est produit par le parapoxvirus, et le VEGF-F, découvert dans le venim de serpent (220,

330). Parmi ces membres, le VEGF-A est celui dont la contribution à la formation de nouveaux vaisseaux sanguins est la plus importante et la perte d'un seul allèle de VEGF-A est létale chez la souris (52, 95, 96, 233). Plusieurs isoformes de VEGF-A sont par ailleurs générées suite à l'épissage alternatif d'un même ARNm précurseur (VEGF-A<sub>121</sub>, VEGF-A<sub>145</sub>, VEGF-A<sub>165</sub>, VEGF-A<sub>183</sub>, VEGF-A<sub>189</sub>, VEGF-A<sub>206</sub>). Ces isoformes se distinguent avant tout par leur biodisponibilité (146, 238). Le VEGF-A<sub>145</sub> et le VEGF-A<sub>183</sub> sont des variants d'épissage peu fréquents. Le VEGF-A<sub>189</sub> et le VEGF-A<sub>206</sub> sont quant à eux séquestrés en grande partie par la matrice extracellulaire en raison d'une forte affinité pour l'héparine. Ces isoformes peuvent néanmoins être relâchées, sous la forme d'un fragment actif de 110 acides aminés, suite à un clivage carboxy-terminal médié, entre autre, par la plasmine et les métalloprotéinases de la matrice extracellulaire (146, 198). Pour ce qui est du VEGF-A<sub>121</sub>, on le retrouve uniquement sous une forme soluble car ce dernier ne lie pas l'héparine. Le VEGF-A<sub>165</sub> est finalement l'isoforme de VEGF-A la plus abondante chez l'humain et elle est majoritairement sécrétée par les cellules sous forme d'homodimères solubles, même si une fraction significative reste liée à la surface cellulaire et à la matrice extracellulaire. En plus d'être le plus répandu, le VEGF-A<sub>165</sub> est aussi le plus actif sur le plan biologique. En effet, sa capacité à lier des molécules reliées à l'héparine, comme les protéoglycans d'héparan-sulfate (HSPGs), stabilise son interaction avec le récepteur 2 du VEGF (VEGFR2) et potentialise sa réponse angiogénique (13, 151, 157). De plus, le VEGF-A<sub>165</sub> est la seule isoforme qui induit la formation d'un complexe stable entre la neuropiline-1 (NRP-1), une glycoprotéine transmembranaire, et le VEGFR2 (269, 321). Bien qu'elle soit dépourvue d'activité catalytique, la NRP-1 peut favoriser la liaison du VEGF au niveau de ses différents récepteurs et moduler la signalisation et les activités biologiques induites par ces derniers (108, 170, 171, 229, 269).

Trois RTKs peuvent lier les différents membres de la famille du VEGF (Figure 3) (140). Le récepteur VEGFR1 peut lier le VEGF-A, -B ou le PLGF, le récepteur VEGFR2 lie le VEGF-A, et le récepteur VEGFR3 peut lier le VEGF-C ou le -D. Le clivage protéolytique du VEGF-C et -D permet aussi à ces facteurs de lier le récepteur VEGFR2 mais avec une affinité moindre que celle qu'ils présentent au départ pour le récepteur VEGFR3.



**Figure 3. Patterns d'expression, spécificité et effets cellulaires/physiologiques des récepteurs au VEGF (VEGFRs).** Les membres de la famille du VEGF (VEGF-A,-B,-C,-D et le PLGF) se lient d'une manière spécifique à trois récepteurs à activité tyrosine-kinase, VEGFR-1,-2 ou -3. Le VEGFR-1 est exprimé à la surface des cellules hématopoïétiques, des monocytes/macrophages et au niveau de l'endothélium vasculaire. Le VEGFR-2 est exprimé au niveau de l'endothélium vasculaire et lymphatique alors que l'expression du VEGFR3 est de façon générale restreinte à l'endothélium lymphatique (adapté de (140) avec la permission de Elsevier, copyright (2007)).

Le VEGFR1 est exprimé à la surface des cellules souches hématopoïétiques, des monocytes, des macrophages et des cellules endothéliales vasculaires. Il existe aussi une forme soluble du récepteur VEGFR1 (sVEGFR1), produite par épissage alternatif, qui ne possède pas de domaine transmembranaire ni de domaine tyrosine kinase. Le sVEGFR1 est abondamment sécrété par plusieurs tissus lors du développement embryonnaire normal et il est reconnu pour inhiber les activités du VEGF (144, 175). Il

est par ailleurs associé cliniquement au développement de la prééclampsie chez la femme enceinte car la neutralisation du VEGF par le sVEGFR1 peut conduire à une dysfonction vasculaire endothéliale maternelle, une vasoconstriction et de l'hypertension (206). L'ablation chez la souris du gène codant pour le VEGFR1 entraîne leur mort entre le jour embryonnaire 8.5 et 9.0 en raison d'une prolifération excessive des angioblastes (102, 103). Par contre, si on procède uniquement à la délétion du domaine kinase de VEGFR1, l'expression du domaine extracellulaire, à elle seule, permet au système vasculaire de ces souris de se développer tout-à-fait normalement (139). Ces travaux indiquent donc que le récepteur VEGFR1, lors du développement embryonnaire, agit comme un régulateur négatif des activités du VEGF en prévenant sa liaison au récepteur VEGFR2. L'activité tyrosine kinase du récepteur VEGFR1 est par contre indispensable pour l'hématopoïèse (117, 132) et la migration des monocytes/macrophages en réponse au VEGF (16, 139). Le VEGFR1 participe également d'une manière positive au développement de certaines conditions pathologiques chez l'adulte, incluant l'athérosclérose, l'arthrite et l'angiogenèse tumorale, notamment via le recrutement de cellules souches hématopoïétiques (138, 207, 208). Le VEGFR3, exprimé presque exclusivement au niveau de l'endothélium lymphatique, est quant à lui essentiel à la lymphangiogenèse (140). Pour ce qui est du récepteur VEGFR2, il est présent à la surface des cellules endothéliales lymphatiques et vasculaires. Les souris déficientes en VEGFR2 meurent entre les jours embryonnaires 8.5 et 9.5 en raison d'un défaut majeur au niveau de la vasculogenèse mais aussi au niveau de l'angiogenèse (266). Plusieurs études ont en outre permis de démontrer que le récepteur VEGFR2 est le principal médiateur des effets angiogéniques induits par le VEGF-A<sub>165</sub>, autant chez l'embryon que chez l'adulte (122, 167, 176, 199, 244, 266, 316, 336).

### **1.2.3 Activités biologiques induites par le VEGF-A<sub>165</sub> via le récepteur VEGFR2**

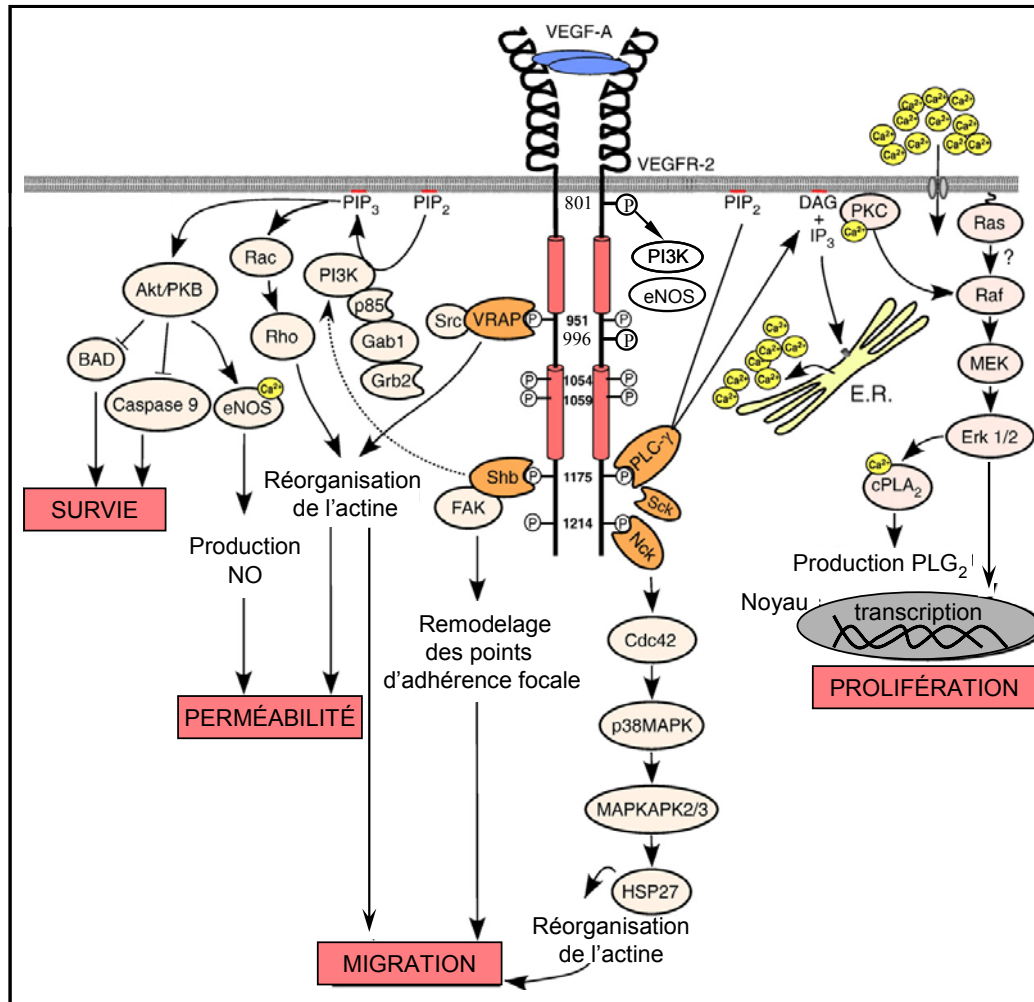
Le récepteur VEGFR2 est constitué d'un domaine extracellulaire s'apparentant à celui des immunoglobulines, d'un segment transmembranaire, et d'une portion intracellulaire contenant le domaine kinase divisé par une insertion de 70 acides aminés (Figure 4) (292). La liaison du VEGF-A<sub>165</sub> au niveau du récepteur induit un changement



de conformation du dimère qui favorise son autophosphorylation au niveau de résidus tyrosine spécifiques (255). Sept sites majeurs d'autophosphorylation ont été identifiés: Y801, dans la portion juxtamembranaire, Y951/Y996 au niveau de l'insertion, Y1054/Y1059 dans le domaine kinase et Y1175/Y1214 dans la queue carboxy-terminale du récepteur (68, 83, 214, 287). La phosphorylation des résidus Y1054/Y1059 est essentielle à l'induction de l'activité kinase du récepteur (174) alors que la phosphorylation des autres résidus participe à la création de sites de liaison permettant le recrutement et l'activation de molécules de signalisation qui possèdent un domaine SH2 (140). Ces molécules vont à leur tour déclencher les cascades enzymatiques qui leur sont propres et qui sont impliquées dans la promotion de la survie, de la perméabilité, de la migration ou de la prolifération des cellules endothéliales (Figure 4).

### **1.2.3.1 Prolifération**

Le VEGFR2 stimule la prolifération des cellules endothéliales en activant les ERK1/2 comme la majorité des autres RTKs, mais la voie qu'il privilégie pour en venir à cette activation est plutôt atypique. En effet, plutôt que d'activer la voie classique Grb2-Sos-Ras (286), le VEGFR2 active la PKC par l'entremise de la PLC $\gamma$  (287) (Figure 4). Cette phosphorylation/activation de la PLC $\gamma$  par le VEGFR2 se produit suite à la liaison de cette dernière au niveau de la tyrosine 1175 située dans la portion carboxy-terminale du récepteur (287). Une fois activée, la PLC $\gamma$  procède à l'hydrolyse du phosphatidylinositol(4,5)-bisphosphate (PIP2) de la membrane plasmique pour générer du diacylglycérol (DAG) et de l'inositol 1, 4, 5-triphosphate (IP<sub>3</sub>) (178). La hausse de la concentration intracellulaire des ions calcium causée par l'IP<sub>3</sub> va ensuite contribuer de pair avec le DAG à l'activation de la PKC et par conséquent, au déclenchement de la voie Raf-MEK-ERK1/2 menant à l'induction de la prolifération des cellules endothéliales (286).



**Figure 4. Voies de signalisation intracellulaires induites par le VEGF-A via l'activation du récepteur VEGFR2.** Le VEGF-A induit majoritairement ses effets biologiques tels que la survie, la perméabilité, la migration et la prolifération cellulaire via l'activation du récepteur VEGFR2 situé à la surface des cellules endothéliales. L'activation de VEGFR2 entraîne son autophosphorylation au niveau de certains résidus tyrosine (801, 951, 996, 1054, 1059, 1175 et 1214). Ces résidus phosphorylés vont ensuite servir de site d'ancrage pour des molécules de signalisation qui contiennent des domaines SH2 (TSA<sub>d</sub>/VRAP, Shb, PLC- $\gamma$ , Sck ou Nck). La liaison de ces molécules entraîne leur phosphorylation/activation et l'initiation des différentes cascades enzymatiques qui conduisent aux effets biologiques associés au VEGF-A (adapté de (140) avec la permission de Elsevier, copyright (2007)).

### 1.2.3.2 Migration

Le VEGF-A<sub>165</sub>, via l'activation de VEGFR2, peut induire la migration des cellules endothéliales et plusieurs voies de signalisation ont été décrites comme étant impliquées dans la promotion de ce phénomène complexe. Il a été rapporté que la protéine adaptatrice Shb peut lier la Y1175 de VEGFR2 et que la présence de cette protéine est nécessaire pour l'activation de la phosphoinositide 3 kinase (PI3K), la réorganisation du cytosquelette d'actine et la migration des cellules endothéliales en réponse au VEGF (141). Un autre site pouvant jouer un rôle important dans la régulation de la migration est la Y951 de VEGFR2, un site de liaison pour la molécule adaptatrice TSAd (T-cell-specific adaptor; aussi connu sous le nom de VEGF receptor-associated protein (VRAP)) (214, 337). La molécule TSAd s'associe aussi à Src en réponse au VEGF-A<sub>165</sub>, ce qui suggère que TSAd pourrait réguler l'activation de Src en aval du récepteur VEGFR2. La liaison de la protéine Nck à la Y1214 de VEGFR2 peut également conduire au remodelage du réseau d'actine de la cellule via l'activation de PAK-2, cdc42 et de la p38 (187, 188).

La PI3K est connue pour réguler la migration cellulaire induite par plusieurs facteurs de croissance puisque les phosphatidylinositol-3, 4, 5-trisphosphate (PIP<sub>3</sub>) que cette enzyme produit au niveau de la membrane plasmique contribuent à l'activation de Rac et à la formation des lamellipodes (246). Contrairement aux autres RTKs, le VEGFR2 ne possède pas de séquence de liaison (pY-X-X-M) pour la sous-unité régulatrice p85 de la PI3K (271). La protéine adaptatrice Gab1 est toutefois pourvue d'un tel site et il a été démontré que cette dernière peut s'associer au récepteur VEGFR2 et contribuer au phénotype motile des cellules endothéliales, ainsi qu'à leur survie, en médiant l'activation de la PI3K (69, 194). Il a par ailleurs été démontré que cette liaison de la PI3K au niveau de Gab1 est dépendante de la phosphorylation de Gab1 par Src (69).

### 1.2.3.3 Survie

La production de PIP<sub>3</sub> par la PI3K est également cruciale pour la survie des cellules en général. En effet, ces lipides phosphorylés permettent le recrutement de la protéine kinase B/Akt au niveau de la membrane plasmique et sa

phosphorylation/activation subséquente par les kinases PDK1 et PDK2 (47). Une fois activée, la protéine Akt contribue au maintien de la survie cellulaire en procédant à la phosphorylation de plusieurs substrats. Akt peut entre autres phosphoryler la protéine pro-apoptotique Bad ainsi que la caspase 9, ce qui inhibe leur pouvoir apoptotique (Figure 4) (48, 70). Akt peut aussi réguler l'activité de protéines appelées FOXOs, qui sont des facteurs de transcription de la famille Forkhead (41). En présence de facteurs de croissance, Akt phosphoryle les protéines FOXOs, ce qui mène à leur association avec la protéine 14-3-3 et leur rétention dans le cytoplasme. En absence de facteurs de croissance, lorsque les cellules sont sevrées par exemple, les protéines FOXOs non-phosphorylées vont être redirigées vers le noyau où elles vont contribuer au déclenchement de l'apoptose en activant la transcription de gènes pro-apoptotiques, tel que le gène codant pour le ligand Fas (105). Au niveau des cellules endothéliales, il a été démontré que le VEGF-A<sub>165</sub> pouvait prévenir l'apoptose des cellules cultivées en absence de tout autre facteur de croissance et que cette survie dépendait exclusivement de l'activation de la PI3K et de Akt par le récepteur VEGFR2, et non le récepteur VEGFR1 (118). Il a de plus été rapporté que le VEGF-A<sub>165</sub> peut induire la transcription de gènes anti-apoptotiques comme la protéine Bcl-2 et les inhibiteurs d'apoptose XIAP et survivin, mais le mécanisme moléculaire à l'origine de cette induction n'est pas connu (115, 301).

La survie des cellules endothéliales en réponse au VEGF peut aussi être déterminée par le contexte dans lequel se retrouvent ces cellules. Les signaux de survie au sein des cellules endothéliales peuvent par exemple s'avérer plus forts si ces cellules sont en contact avec la matrice extracellulaire. Il a en effet été démontré que le récepteur VEGFR2 peut s'associer avec les intégrines  $\alpha_v\beta_3$  et que l'activation d'Akt médiée par le VEGF-A<sub>165</sub> est plus élevée si les intégrines sont engagées avec la matrice extracellulaire (270). Les intégrines  $\alpha_v\beta_3$  sont d'ailleurs requises pour la survie des vaisseaux naissants, mais non pour la survie de ceux qui sont déjà formés (39). Le contact intercellulaire s'avère aussi être un déterminant important de la survie des cellules endothéliales. En effet, l'association du récepteur VEGFR2 avec le complexe VE-cadhérine/ $\beta$ -caténine est essentielle pour son interaction avec la PI3K et la survie

des cellules endothéliales en réponse au VEGF et ce, lors de l'angiogenèse, et non la vasculogenèse, embryonnaire (54).

En plus d'être essentiel lors du développement embryonnaire, le VEGF est indispensable à l'angiogenèse néonatale (116). Toutefois, bien que certains lits vasculaires puissent présenter une certaine sensibilité à une diminution du VEGF circulant, comme les capillaires fenestrés du glomérule rénal, l'homéostasie de la majorité des endothéliums matures ne semble pas dépendante d'une source exogène de VEGF (88, 165). En effet, le maintien de la survie des cellules endothéliales des endothéliums matures serait plutôt assuré par une signalisation autocrine médiée par le VEGF provenant des cellules endothéliales elles-mêmes (196). Par contre, lorsque l'angiogenèse est déclenchée chez l'adulte, les capillaires en formation deviennent alors plus vulnérables à une inhibition de la signalisation induite par le VEGF circulant que les vaisseaux sanguins préétablis (165). C'est en outre cette différence de sensibilité qui permet de faire régresser les néovaisseaux dans les cas d'angiogenèse pathologique et ce, sans atteintes majeures à la vasculature déjà en place (22, 23, 36, 88, 116, 165, 334). Certaines études ont par ailleurs rapportées que la protéine Akt1 n'est pas essentielle pour le développement du système vasculaire chez l'embryon (60, 63, 64) alors que cette dernière joue un rôle crucial dans l'angiogenèse postnatale médiée par le VEGF ou déclenchée en réponse à une ischémie des membres postérieurs chez la souris (2, 59). Ainsi, différentes voies de signalisation semblent être privilégiées par le VEGF pour la médiation de ses effets biologiques, dont la survie cellulaire, lors de l'angiogenèse embryonnaire et postnatale.

#### **1.2.3.4 Perméabilité vasculaire**

Le récepteur VEGFR2 peut induire la perméabilité vasculaire *in vivo* (18) et celle-ci nécessite la production d'oxyde nitrique (NO) par la synthase d'oxyde nitrique endothéliale (eNOS) (109). L'activité de la eNOS peut être induite par un mécanisme dépendant de l'influx de calcium déclenché par la PLC $\gamma$  ou par la phosphorylation de la eNOS en sérine 1177 par Akt (80, 110, 133) (Figure 4). La phosphorylation de la Y801 de VEGFR2 serait par ailleurs un événement intracellulaire indispensable à la phosphorylation de la eNOS en sérine 1177 via l'activation de la PI3K et de Akt (32).

L'activation du récepteur VEGFR2 peut par ailleurs conduire à la phosphorylation sur résidu tyrosine des VE-cadhérines et des autres composantes des jonctions adhérentes, un événement associé au relâchement des liens intercellulaires (74, 89, 114, 202, 241, 253). Bien que le mécanisme moléculaire précis impliqué dans l'activation de Src en aval du récepteur VEGFR2 demeure encore inconnu, cette kinase est requise pour la phosphorylation des VE-cadhérines et l'induction de la perméabilité vasculaire *in vivo* (85, 189, 318).

### 1.3 Les PTPs

Étant donné l'importance capitale du récepteur VEGFR2 dans la médiation de la réponse angiogénique dépendante du VEGF, les activités de ce dernier doivent être finement régulées pour assurer, d'une manière adéquate, la formation de nouveaux vaisseaux sanguins et prévenir l'apparition de conditions pathologiques. Depuis ces dernières années, on découvre de plus en plus que les activités des RTKs sont en fait modulées par l'action spécifique de protéines tyrosine phosphatases (PTPs).

La superfamille des PTPs compte 107 membres chez l'humain et elle est constituée d'enzymes qui présentent une séquence consensus d'acides aminés, HC(X)<sub>5</sub>R, située au coeur de leur site actif et que l'on a défini comme étant un motif signature (298).

#### 1.3.1 La réaction de déphosphorylation

Le résidu cystéine (C) du site catalytique des PTPs est primordial car il agit comme nucléophile dans la réaction de catalyse, c'est-à-dire que c'est lui qui va attaquer l'atome de phosphate du substrat pour former un intermédiaire thiophosphate. En raison de la nature transitoire du complexe enzyme-substrat, il est très difficile d'isoler des PTPs en association stable avec leurs substrats (9, 342). Par contre, la mutation de ce résidu cystéine (C) pour une sérine (S) peut diminuer l'activité catalytique d'une PTP à un point tel qu'il est parfois possible d'isoler des complexes stables formés de la phosphatase liée à ses substrats (160). Ces mutants, que l'on appelle "*C to S*"(C/S), ont permis l'identification de plusieurs substrats physiologiques et ce, pour plusieurs PTPs (30). Il existe aussi un autre résidu critique pour la fonction

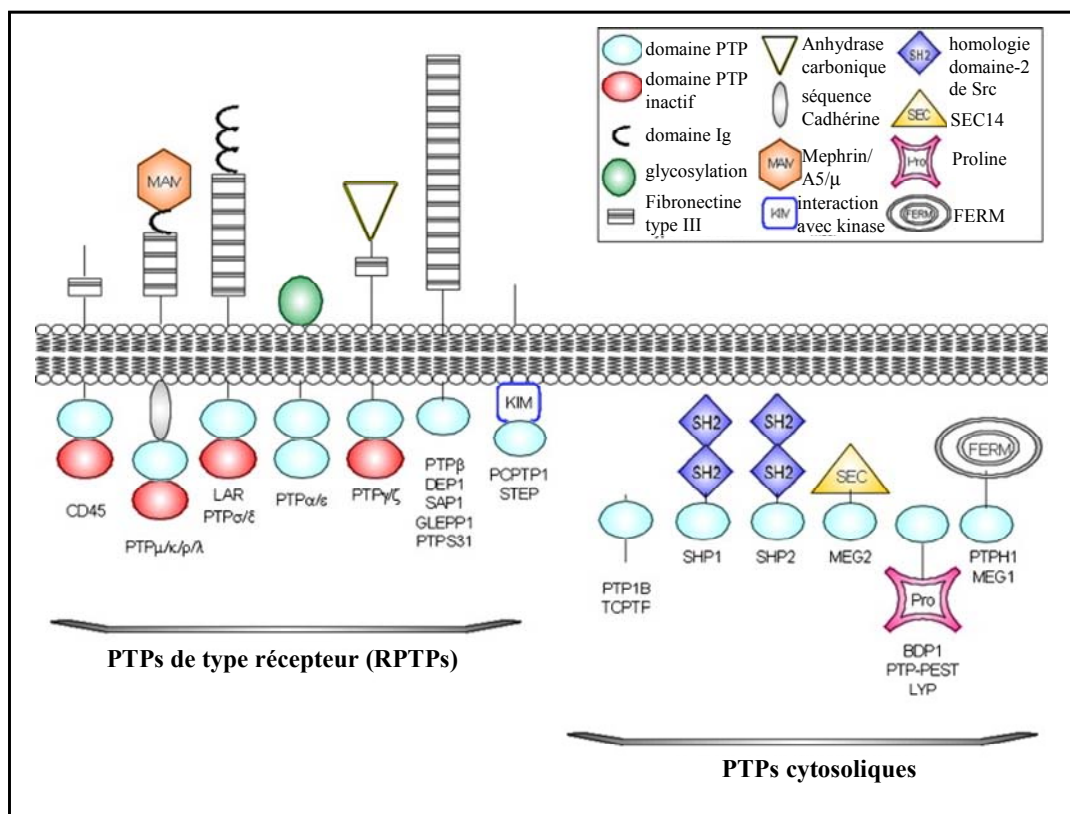
enzymatique des PTPs, soit l'acide aspartique (D), présent au niveau d'une boucle de la phosphatase appelée "WPD loop". Ce résidu agit comme un acide dans la réaction de catalyse et permet au substrat, en lui donnant un atome d'hydrogène, de se libérer de son groupement phosphate et de se détacher de la phosphatase. La mutation de ce résidu pour une alanine génère un mutant que l'on appelle "*D to A*" ou "*substrate-trapping*" parce qu'il possède une très grande capacité à interagir de façon stable avec ses substrats (99).

### 1.3.2 Les PTPs classiques

La superfamille des PTPs se divise en deux grandes familles, les PTPs dites "classiques", qui ciblent uniquement les résidus tyrosine, et les PTPs à double spécificité, qui peuvent déphosphoryler à la fois les résidus sérine/thréonine et les résidus tyrosine (298). Nous nous attarderons ici à l'étude des PTPs classiques puisque ce sont elles qui ont été impliquées, jusqu'à maintenant, dans la régulation des activités du récepteur VEGFR2 (voir la section 1.6). La famille des PTPs classiques, dont il existe 38 représentantes chez l'humain, se divise par ailleurs en deux groupes; les PTPs transmembranaires, que l'on dit de type récepteur (RPTPs), et les PTPs cytosoliques (Figure 5). Parmi les RPTPs, plusieurs sont composées de deux domaines phosphatases disposés en tandem. Seul le domaine le plus près de la membrane plasmique est catalytiquement actif, excepté pour la PTP $\alpha$ , pour qui le domaine distal présente une faible activité résiduelle (43).

### 1.3.3 Mécanismes de régulation des PTPs classiques

Les PTPs démontrent en général une faible spécificité *in vitro* (17). Il s'agit probablement d'une des raisons pour lesquelles ces phosphatases ont à tort été longtemps considérées comme des enzymes peu spécifiques. Bien qu'une analyse récente des structures cristallographiques de plusieurs PTPs révèle que la configuration du site catalytique des PTPs est probablement cruciale dans la détermination de leurs substrats, c'est avant tout une régulation stricte, et à différents niveaux, de leurs activités qui permet à ces enzymes d'atteindre un degré élevé de spécificité *in vivo* (17, 76). Cette section traite de ces différents mécanismes de régulation des PTPs classiques.



**Figure 5. Les PTPs classiques.** Les PTPs classiques peuvent être divisées en deux groupes, les PTPs de type récepteur (RPTPs) et les PTPs cytosoliques. Cette classification n'est toutefois pas absolue puisque pour certaines PTPs, il existe à la fois une forme transmembranaire et cytoplasmique en raison d'un épissage alternatif (GLEPP1) ou de l'utilisation de promoteurs différents pour un même gène (PTPε). Dans l'encadré on peut voir la légende pour les différents domaines protéiques que l'on retrouve chez les PTPs classiques et qui sont illustrés ici (adapté de (100) avec la permission de Elsevier, copyright (2008)).

### 1.3.3.1 Niveaux d'expression

Le premier niveau de régulation d'une protéine consiste à contrôler son expression. Bien que l'expression de certaines PTPs soit plus abondante dans certains organes ou tissus, il n'en demeure pas moins que dans un type cellulaire donné, comme par exemple dans les cellules endothéliales, la plupart des 38 gènes codant pour les PTPs classiques sont exprimés (168). La transcription des messagers d'ARN (ARNm) de ces PTPs peut toutefois être induite dans certaines circonstances, comme par exemple lors de la différenciation neuronale et hématopoïétique (232, 290, 317). Les



niveaux d'expression de certaines PTPs sont aussi augmentés avec la confluence. C'est le cas de DEP-1 (236), PTP-LAR (204), RPTP $\mu$  (46), RPTPk (106, 112) et la PTP $\beta$ /VE-PTP (112). L'existence de différents promoteurs au sein d'un même gène codant pour une PTP en particulier peut aussi mener à l'expression d'ARNm qui sont spécifiques de certains tissus (15) ou à l'expression de différentes isoformes (86). Au niveau post-transcriptionnel, l'épissage alternatif des ARNm des PTPs peut aussi réguler leurs activités. Un bon exemple de ce mode de régulation est l'épissage alternatif de l'ARNm du gène codant pour la TC-PTP, qui peut générer deux isoformes structurellement différentes de la phosphatase, soit une forme de 48 kDa et une forme de 45 kDa. En raison de leurs structures non identiques, ces deux isoformes assureront des fonctions distinctes au sein de la cellule puisque la forme de 45 kDa, qui possède un signal de localisation nucléaire, sera dirigée vers le noyau mais non la forme de 48 kDa qui n'en possède pas (150).

### **1.3.3.2 Localisation subcellulaire**

Le contrôle de la localisation subcellulaire d'une PTP est certainement le moyen le plus simple et le plus efficace permettant de contrôler son activité. Pour assurer ce contrôle, la cellule a doté ses différentes PTPs cytoplasmiques de domaines uniques leur permettant d'être localisées dans le bon compartiment cellulaire. Parmi ces domaines on retrouve les domaines SH2, FERM, PDZ, Sec14 et des domaines riches en proline (voir la figure 5) (76). Les domaines SH2 permettent le recrutement des PTPs au niveau de certains RTKs ou adaptateurs moléculaires alors que les domaines FERM, PDZ et riches en proline permettent entre autre l'association des PTPs avec les protéines des jonctions cellulaires et des complexes d'adhérence focale. Le domaine Sec14 médie quant à lui la liaison de certaines PTPs avec les vésicules sécrétoires. D'autres PTPs présentent aussi des séquences de localisation nucléaire, comme l'isoforme de 45 kDa de la TC-PTP, ou des motifs qui les dirigent vers les radeaux lipidiques. Les PTPs peuvent par ailleurs être composées de séquences hydrophobes, comme l'isoforme de 48 kDa de la TC-PTP et la PTP 1B, qui forcent ces dernières à demeurer ancrées au réticulum endoplasmique (RE) (150, 299). Malgré leur attachement au RE, l'orientation cytosolique de leur domaine catalytique permet tout de même à ces phosphatases de procéder à la

déphosphorylation de leurs substrats lorsque ceux-ci viennent en contact avec la surface du RE, dont le réseau enchevêtré de membranes peut parcourir toute l'étendue de la cellule (129, 137). Au niveau du RE comme tel, les PTPs peuvent réguler la signalisation déclenchée par la protéine IRE 1 en réponse à un stress du RE (124), ou encore aider à la maturation des RTKs lors de leur synthèse en supprimant leur activité basale spontanée (190, 264, 296). Dans le cas des PTPs de type récepteur, le domaine transmembranaire qu'elles arborent les confine au niveau de la membrane plasmique. Cet endroit est toutefois stratégique car de là, elles sont en mesure de réguler rapidement les événements de phosphorylation qui sont déclenchés de l'extérieur par les facteurs de croissance, la matrice extracellulaire ou encore le contact avec une autre cellule (44, 235, 259). La localisation subcellulaire des PTPs permet donc de restreindre l'activité de ces enzymes aux substrats avec qui elles cohabitent au niveau des différents compartiments cellulaires.

### **1.3.3.3 Ligands des PTPs de type récepteur**

La grande diversité qui existe au niveau de la structure des domaines extracellulaires des PTPs de type récepteur suggère que ceux-ci peuvent réguler différemment les fonctions de ces phosphatases. Plusieurs RPTPs peuvent former des liaisons homophiliques qui sont importantes pour le maintien de l'intégrité des jonctions cellulaires. C'est le cas notamment de la RPTP $\mu$ , RPTP $\kappa$  et RPTP $\lambda$  (37, 62, 262). Ces interactions homologues ne sont pas reconnues pour affecter directement l'activité catalytique des RPTPs. Toutefois, en forçant les RPTPs à demeurer exclusivement au niveau des jonctions adhérentes lorsque les cellules sont à confluence, ces interactions contribueraient à restreindre l'activité de ces RPTPs aux substrats associés au complexe des cadhérines (11, 38, 75). De plus, plusieurs ligands hétérologues, parmi lesquels on retrouve beaucoup de protéoglycans d'héparan-sulfate, ont été identifiés pour certaines RPTPs (76). Dans la plupart des cas, l'effet engendré par la liaison de ces ligands reste à élucider. Un exemple illustrant bien toutefois le pouvoir de régulation que peut posséder ces ligands est celui de la phosphatase LAR lors du développement de la jonction neuromusculaire de la drosophile. L'activité de LAR, située dans la partie présynaptique de la jonction, peut être respectivement activée ou inhibée selon si cette

dernière interagit avec le Syndecan ou Dallylike, deux protéoglycans d'héparan-sulfate exprimés à la surface de la cellule musculaire (163). Ainsi, l'activité de certaines phosphatases de type récepteur peut être induite ou inhibée selon le ligand avec lequel elles interagissent. L'effet inducteur ou inhibiteur du ligand sur l'activité catalytique de la phosphatase pourrait par ailleurs dépendre du changement de conformation que ce ligand impose au dimère que forme la phosphatase (voir section suivante).

#### **1.3.3.4 Dimérisation des PTPs de type récepteur**

Il a été démontré que les PTPs de type récepteur CD45, RPTP $\mu$ , LAR, RPTP $\sigma$ , RPTP $\alpha$ , SAP1 et DEP-1 peuvent former des dimères, tout comme le font les récepteurs à activité tyrosine kinase (31, 154, 161, 197, 288, 293, 310, 313, 327). Même si la dimérisation est généralement décrite comme un mécanisme de régulation négative de l'activité catalytique des RPTPs (17, 28, 79, 162, 209), certaines études suggèrent l'existence de dimères actifs (154, 162, 284). Il a par exemple été rapporté qu'un ligand présent au niveau de la matrice extracellulaire pouvait stimuler l'activité catalytique de DEP-1 (273) et que cette activité ne pouvait être induite que par un anticorps bivalent dirigé contre DEP-1, et non un anticorps monovalent (284). Ainsi, le modèle actuel tend plutôt à suggérer que c'est la conformation tridimensionnelle adoptée par le dimère qui détermine si ce dernier sera actif ou inactif (76). Selon ce modèle, différents ligands exogènes pourraient induire différents changements de conformation au niveau des domaines extracellulaires des RPTPs et stabiliser le dimère dans une forme active ou inactive, selon le cas. De plus, différentes modifications post-traductionnelles se produisant dans la portion intracellulaire des RPTPs, comme l'oxydation ou la phosphorylation, pourraient aussi réguler l'activité catalytique des RPTPs en modifiant l'état conformationnel du dimère (31, 123, 197).

#### **1.3.3.5 Phosphorylation sur résidus sérine et tyrosine**

En général, la phosphorylation régule directement l'activité catalytique des enzymes par des mécanismes allostériques ou alors elle dirige cette activité en procurant un site de liaison pour une autre protéine. La phosphorylation sur résidus sérine et tyrosine a été rapportée pour certaines PTPs. Même si les études qui s'y sont attardées sont encore relativement peu nombreuses, ces modifications post-traductionnelles se

révèlent de plus en plus comme un important mode de régulation des fonctions enzymatiques des PTPs.

Les phosphatases cytosoliques SHP-1 et SHP-2 sont phosphorylées sur résidus tyrosine et cet événement peut stimuler leur activité catalytique d'une manière intrinsèque (93, 205, 311, 341). La phosphorylation sur résidu tyrosine permet aussi à SHP-2 de recruter les protéines Grb2-SOS au niveau de certains RTKs activés, faisant ainsi de lui un adaptateur moléculaire (24).

Les PTPs de type récepteur CD45, DEP-1, PTP $\alpha$  et PTP $\epsilon$  sont aussi phosphorylées sur résidus tyrosine (10, 14, 25, 78, 158, 275, 278, 297). Dans le cas de CD45, cet événement entraîne une augmentation de l'activité catalytique intrinsèque de cette PTP et crée aussi un site de liaison pour la kinase Lck (14). Quant à DEP-1, sa phosphorylation sur résidus tyrosine a été rapportée dans plusieurs lignées de cancer du sein, et DEP-1 peut être phosphorylée lorsqu'elle est surexprimée en présence d'une forme constitutivement active de Src (10, 158). Cette phosphorylation pourrait par ailleurs être à l'origine de l'augmentation de l'activité catalytique intrinsèque de la phosphatase observée en réponse à la somatostatine (10). Toutefois, le ou les résidus tyrosine ciblés, de même que le mécanisme moléculaire impliqué dans cette activation, ne sont pas connus. Pour ce qui est des PTP $\alpha$  et PTP $\epsilon$ , elles sont phosphorylées au niveau d'un résidu tyrosine carboxy-terminal particulier, soit Y789 pour la PTP $\alpha$  et Y695 pour la PTP $\epsilon$  (25, 297). Cette phosphorylation n'affecte pas directement l'activité catalytique de ces RPTPs mais elle est spécifiquement requise pour la déphosphorylation de la tyrosine inhibitrice (Y529) de Src par ces dernières (25, 345). Le mécanisme moléculaire via lequel la phosphorylation sur résidus tyrosine de ces RPTPs peut favoriser l'activation de Src est décrit en détails à la section 1.5.1. Dans le cas de la PTP $\alpha$ , une autre étude est venue renforcer l'idée voulant que la phosphorylation de la Y789 puisse moduler la spécificité de cette phosphatase sans affecter globalement son activité catalytique. En effet, il a été démontré que la phosphorylation de la PTP $\alpha$  au niveau de cette tyrosine favorise la déphosphorylation de Fyn dans les lymphocytes T alors qu'elle défavorise celle de Pyk2, un autre de ses substrats (210). Cette étude rapporte par ailleurs que CD45 peut déphosphoryler la Y789 de la PTP $\alpha$  dans les lymphocytes T, suggérant que la spécificité d'une PTP peut

aussi être régulée par une autre PTP (210). La PTP $\alpha$  est la principale activatrice de Src lors de la mitose (344, 345). Au cours de la division cellulaire, l'association du domaine SH2 de Grb2 avec la Y789 phosphorylée de la PTP $\alpha$  est diminuée et celle du domaine SH2 de Src est augmentée (345, 346). Cette dissociation de Grb2 est en outre nécessaire pour la déphosphorylation de la Y527 de Src par la PTP $\alpha$ . Ainsi, la phosphorylation sur résidus tyrosine de la PTP $\alpha$  et de la PTP $\epsilon$  permet, via la liaison de différentes protéines, de réguler la spécificité et les fonctions enzymatiques de ces phosphatases sans affecter d'une manière intrinsèque leur activité catalytique.

Plusieurs PTPs, dont CD45, PTP1B et PTP-PEST, sont phosphorylées sur résidus sérine mais le rôle de cette phosphorylation est largement inconnu (98, 113, 328). La PTP $\alpha$  est également phosphorylée au niveau de deux résidus sérine juxtamembranaires (S180 et S204) et cette phosphorylation stimule son activité catalytique intrinsèque (77, 300, 344). Cette stimulation résulterait vraisemblablement d'un changement de conformation du dimère induit par la phosphorylation de ces résidus (28, 76). Par ailleurs, la phosphorylation des résidus S180 et/ou S204 est nécessaire pour que puisse se produire ce changement d'affinité de la PTP $\alpha$  qui favorise sa liaison au domaine SH2 de Src plutôt qu'au domaine SH2 de Grb2 lors de la mitose (344). Il semble donc que la phosphorylation sur résidus sérine peut elle aussi réguler directement les fonctions enzymatiques des PTPs, en affectant leur activité catalytique intrinsèque, ou indirectement, en modifiant leurs partenaires d'interaction.

### 1.3.3.6 Clivage protéolytique limité

L'activité des RPTPs peut également être régulée par protéolyse limitée. Au cours de leur maturation, certaines PTPs de type récepteur (RPTP $\mu$ , RPTP $\kappa$ , RPTP $\rho$ , RPTP $\lambda$ , LAR, RPTP $\sigma$  et RPTP $\delta$ ) subissent, par des protéinases/convertases, un clivage protéolytique limité au niveau de leur domaine extracellulaire (76). Ces phosphatases sont donc en réalité composées d'un domaine extracellulaire associé de façon non covalente à un domaine transmembrane-intracellulaire (277). D'autres événements de protéolyse limitée médiés par la protéase ADAM10, la  $\gamma$ -sécrétase, la caspase 3 ou la calpaïne peuvent par ailleurs contribuer à la régulation des fonctions de certaines RPTPs et PTPs cytosoliques et ce, en réponse à différents stimulus (76). Le clivage

protéolytique d'une PTP peut affecter directement son activité catalytique ou alors moduler indirectement ses fonctions cellulaires en entraînant sa relocalisation ou une redéfinition de ses partenaires d'interaction (5, 8, 92, 130).

### **1.3.3.7 Oxydation des PTPs**

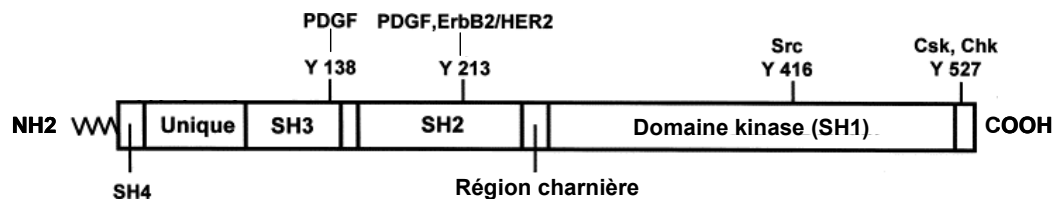
L'oxydation du résidu cystéine présent au niveau du site actif de toutes les PTPs est reconnue comme un mécanisme général permettant l'inhibition réversible de l'activité catalytique de ces enzymes (260, 261). Cette inhibition est engendrée par une augmentation du niveau des espèces réactives de l'oxygène (ROS) dans l'entourage de la PTP. Dans la plupart des cas, ces ROS sont produits par la NAD(P)H oxydase et ce, en réponse à l'activation d'une grande variété de récepteurs présents à la surface cellulaire (245, 307).

## **1.4 Les kinases de la famille de Src (SFKs)**

Comme décrit précédemment, les PTPs peuvent être régulées par phosphorylation sur résidus tyrosine. Cette phosphorylation est dans la majorité des cas médiée par les kinases de la famille de Src (Src family kinases [SFKs]).

### **1.4.1 Structure des SFKs**

La famille des SFKs comprend 9 membres; Src, Fyn, Yes, Lck, Hck, Blk, Fgr, Lyn et Yrk (295). Les kinases de cette famille ont toutes une structure semblable et sont composées d'une extrémité amino-terminale riche en carbone pouvant être myristylée, suivie, dans l'ordre, par un domaine SH4, un segment unique, un domaine SH3, un domaine SH2, un domaine kinase (SH1) et finalement une queue carboxy-terminale aux propriétés régulatrices (Figure 6).



**Figure 6. Structure des SFKs et principaux sites de phosphorylation sur tyrosine.** Les chiffres en annotation font référence à la position des résidus au niveau de la protéine Src de poulet, le prototype de cette famille de kinases (Y; tyrosine) (adapté de (252) avec la permission de Elsevier, copyright (2005)).

Les SFKs possèdent deux sites principaux de phosphorylation sur résidu tyrosine; une tyrosine située dans le domaine catalytique (Y416 au niveau de la protéine prototype de poulet et Y418 chez l'humain), et une tyrosine localisée au niveau de la queue carboxy-terminale de la protéine (Y527 chez le poulet et Y529 chez l'humain) (Figure 6). La phosphorylation de la tyrosine du domaine catalytique est associée à une potentialisation de l'activité kinase des enzymes de cette famille alors que celle de la tyrosine carboxy-terminale est généralement associée à une inhibition de cette activité (213). Les structures cristallographiques des SFKs démontrent en effet que lorsque la tyrosine de la queue carboxy-terminale des SFKs est phosphorylée, elle s'associe avec le domaine SH2 de ces dernières (263, 267, 325, 326, 333) (Figure 7). Cette interaction intramoléculaire entraîne donc le repliement de l'enzyme et stabilise celle-ci dans une conformation que l'on appelle fermée car elle présente une faible activité catalytique. L'association du domaine SH3 des SFKs avec une séquence riche en proline située au niveau de la région charnière, qui relie le domaine SH2 avec le domaine kinase, contribue aussi à la stabilisation de cette conformation fermée et inactive.

Pour ce qui est de la phosphorylation de la tyrosine du domaine kinase, les études de cristallographie indiquent que celle-ci permet l'optimisation de l'activité phosphotransférase des SFKs en contribuant au positionnement adéquat d'une boucle particulière à l'intérieur du domaine kinase. C'est par ailleurs l'enzyme elle-même qui

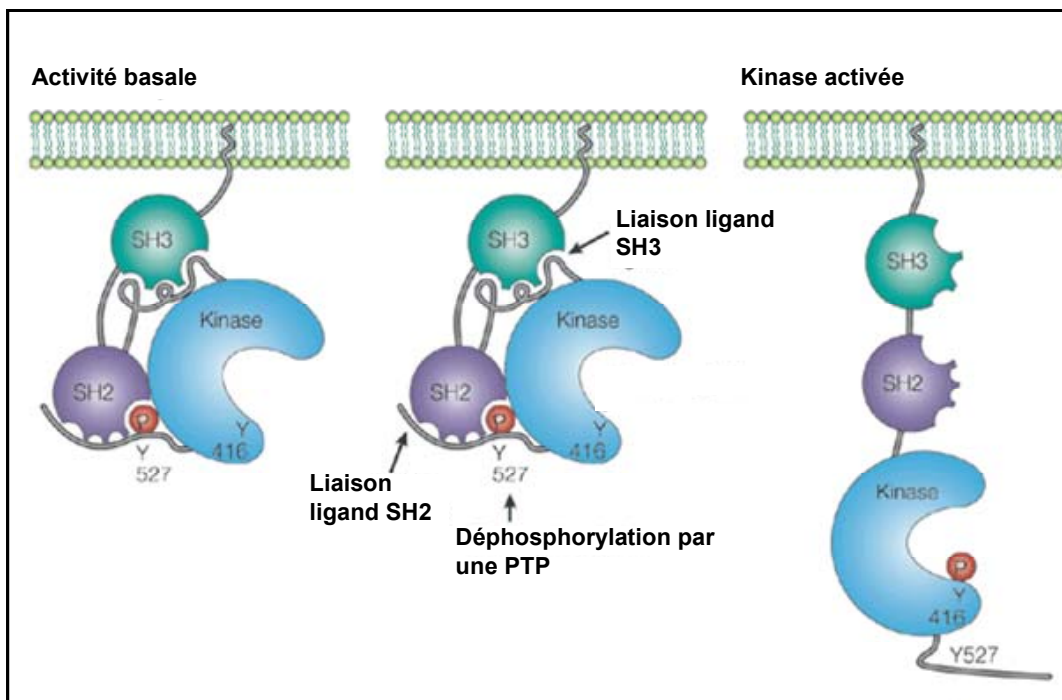
procède à la phosphorylation de cette tyrosine par transphosphorylation intermoléculaire (213). Pour ce qui est de la phosphorylation de la tyrosine carboxy-terminale, deux enzymes seulement sont connues pour accomplir cette tâche, soit les kinases Csk et son homologue Chk (65).

D'autres résidus tyrosine peuvent aussi être phosphorylés au niveau des SFKs et contribuer à leur régulation dans certaines circonstances (252). C'est le cas de la Y213, qui est phosphorylée suite à l'activation du récepteur au PDGF et du récepteur à l'EGF (ErbB2/HER2). La phosphorylation de ce résidu au niveau du domaine SH2 des SFKs contribuerait à leur activation en réponse à ces facteurs car cette phosphorylation diminue la force de la liaison intramoléculaire qui existe entre le domaine SH2 de Src et sa queue carboxy-terminale (276, 309). La stimulation du récepteur au PDGF pourrait aussi mener à la phosphorylation de la Y138 située dans le domaine SH3 des SFKs mais l'impact de cette phosphorylation sur l'activité des SFKs n'est pas clairement défini (40, 276).

#### **1.4.2 Principaux mécanismes d'activation des SFKs**

À la lumière des données sur la structure tridimensionnelle adoptée par les SFKs lorsqu'elles sont inactives, deux principaux mécanismes d'activation de ces enzymes ont été décrits (33, 213) (Figure 7). Étant donné la faible affinité du domaine SH2 des SFKs pour la tyrosine phosphorylée carboxy-terminale, l'association de ce domaine à un site de haute affinité au sein d'une autre molécule peut être suffisante pour entraîner le déploiement de l'enzyme et son activation. De la même façon, la liaison du domaine SH3 avec un ligand hétérologue peut aussi mener à l'ouverture et l'activation des SFKs. L'engagement des domaines SH2 ou SH3 des SFKs avec un partenaire cellulaire de haute affinité constitue donc le premier mécanisme d'activation des SFKs. La déphosphorylation de la tyrosine inhibitrice carboxy-terminale (Y527) par une PTP classique constitue par ailleurs le deuxième mécanisme d'activation des SFKs.





**Figure 7. Conformation active et inactive de Src et principaux mécanismes impliqués dans l'activation des SFKs.** Lorsque Src est dans une conformation inactive (panneau de gauche), la tyrosine Y527 est associée avec le domaine SH2 et le domaine SH3 est en interaction avec la région charnière située entre le domaine SH2 et le domaine kinase. Le panneau du centre illustre les principaux mécanismes impliqués dans l'activation des SFKs. Le panneau de droite représente la conformation active de Src (adapté de (213) avec la permission de Macmillan Publishers Ltd : [Nature Reviews Molecular Cell Biology], copyright (2001) et d'après les travaux de (182, 263, 267, 325, 326, 333)).

### 1.5 Régulation des SFKs par les PTPs classiques

Les SFKs sont des molécules effectrices essentielles impliquées dans la promotion d'une multitude d'événements cellulaires dont l'adhésion, la migration, la survie, la prolifération, la différenciation et la perméabilité vasculaire (239, 295). Dans un nombre croissant de cas, on rapporte qu'une promotion adéquate de ces événements par les SFKs nécessite une activation optimale de ces enzymes par les PTPs classiques. La présente section fait donc état des principales PTPs classiques reconnues pour leur contribution importante aux activités des SFKs.

### 1.5.1 PTP $\alpha$

La PTP $\alpha$  est la première PTP reconnue pour sa participation à l'activation des SFKs. En effet, la surexpression de la PTP $\alpha$  entraîne une augmentation de l'activité de Src, Fyn et Yes, alors que cette activité est fortement réduite dans les fibroblastes issus des souris PTP $\alpha$  -/- (27, 131, 279, 347). Cette diminution de l'activité des SFKs dans les fibroblastes PTP $\alpha$  -/- corrèle de plus avec une augmentation de la phosphorylation de la tyrosine inhibitrice carboxy-terminale (Y527) des SFKs. Cette réduction de l'activité des SFKs dans les fibroblastes PTP $\alpha$  -/- a par ailleurs été observée en réponse à l'adhésion et au niveau des cellules cultivées en milieu complet, qui comprend une panoplie de facteurs de croissance. La PTP $\alpha$  ne serait toutefois pas nécessaire à l'activation de toutes les SFKs en réponse aux différents facteurs de croissance. Effectivement, on rapporte dans une étude récente que suite à une stimulation au PDGF, l'induction de l'ensemble des SFKs de la fraction soluble au détergent n'est pas altérée en absence de la PTP $\alpha$  (308). Par contre, l'activation des SFKs localisées au niveau des radeaux lipidiques, principalement Fyn, est complètement abolie. Par conséquent, la phosphorylation de Cbp/PAG, un substrat de Fyn situé au niveau des radeaux lipidiques, est grandement affectée, alors que la phosphorylation des autres substrats des SFKs, tels que STAT-3, Vav2 et Cbl, n'est grossièrement pas modifiée. Comme la PTP $\alpha$  est davantage recrutée au niveau des radeaux lipidiques en réponse aux facteurs de croissance, ces résultats suggèrent que la PTP $\alpha$  est spécifiquement impliquée dans l'activation des SFKs associées à ce microdomaine membranaire en réponse au PDGF.

La PTP $\alpha$  se retrouve aussi au niveau des complexes d'adhérence focale (191), où il a été rapporté qu'elle peut s'associer de façon transitoire avec les intégrines lors de l'étalement des cellules (312). Comme les intégrines sont dépourvues d'activité catalytique, ce sont les SFKs qui assument le rôle de transmetteur signalitique lors de l'adhésion des cellules à la matrice extracellulaire. Plusieurs protéines sont donc phosphorylées par les SFKs en réponse à l'engagement des intégrines, dont les principales sont FAK (Focal adhesion kinase), la p130Cas, la paxilline et la vinculline (242). L'étalement des fibroblastes PTP $\alpha$  -/- sur un substrat composé de fibronectine est grandement retardé, et ce retard initial entraîne un délai majeur dans le réarrangement

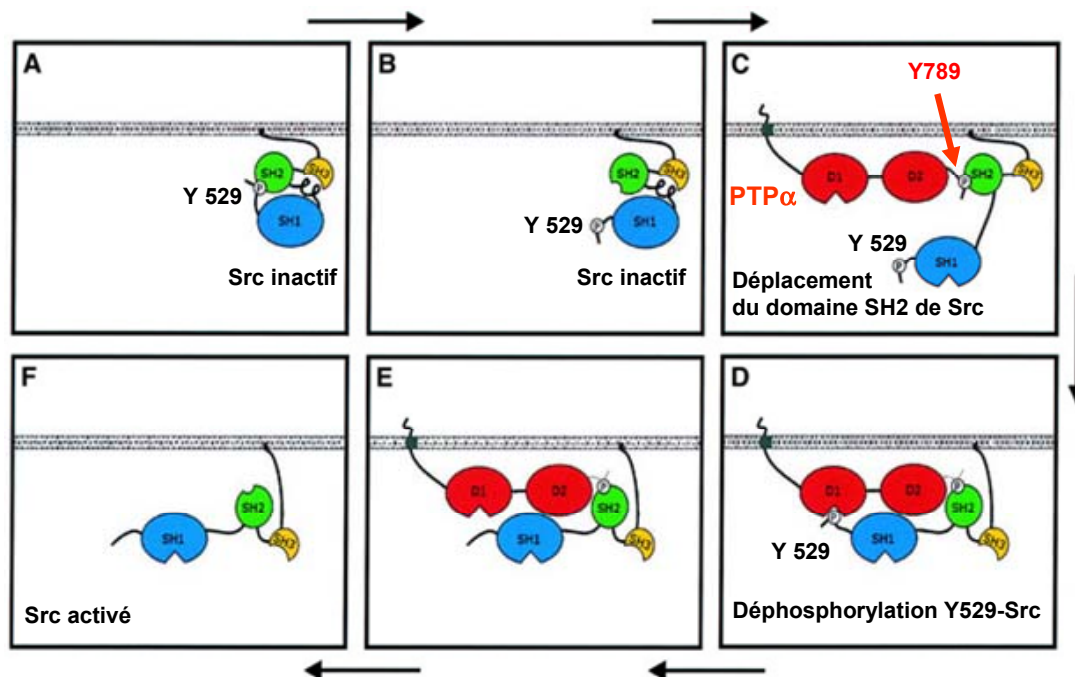
du cytosquelette d'actine, la formation des complexes d'adhérence focale et la migration des cellules en réponse à l'engagement des intégrines (279, 338). Ce délai est par ailleurs associé à une réduction de l'activité de Src et de Fyn, de la phosphorylation de FAK et de l'association de Src et de Fyn avec FAK. L'activité de la PTP $\alpha$  est donc sollicitée au niveau des complexes d'adhérence focale pour une activation adéquate des SFKs impliquées dans la promotion de l'adhésion à la matrice.

La PTP $\alpha$ , via l'activation des SFKs, est de plus impliquée dans la promotion de la division cellulaire (344, 346), de la différenciation neuronale (268) et de la carcinogenèse des cancers du sein et du côlon (343).

Comme mentionné précédemment, la phosphorylation de la Y789 de la PTP $\alpha$  est requise pour l'activation des SFKs par cette phosphatase. Les travaux de Zheng et al. ont démontré d'une façon convaincante comment la phosphorylation de ce résidu carboxy-terminal peut favoriser l'activation de Src (345). En effet, ces travaux révèlent que la mutation Y789F abolie complètement la capacité de la PTP $\alpha$  à lier le domaine SH2 de Src, à déphosphoryler sa tyrosine inhibitrice (Y529) et à l'activer, à la fois *in vitro* et suite à la surexpression de la phosphatase dans des fibroblastes. De plus, si la surexpression de la PTP $\alpha$  permet aux cellules fibroblastiques de croître en absence de substrat (agar mou), la surexpression de la PTP $\alpha$  Y789F bloque complètement l'induction de ce phénotype transformant. Cette mutation n'affecte toutefois pas l'activité catalytique intrinsèque de la protéine car la PTP $\alpha$  Y789F conserve sa capacité de déphosphoryler des substrats non-spécifiques comme la protéine MBP (myelin basic protein). Finalement, la PTP $\alpha$  peut aussi, lorsqu'elle est incubée *in vitro* avec une forme de Src exclusivement phosphorylée en Y418 (Y529F), procéder à la déphosphorylation de la tyrosine activatrice Y418. La PTP $\alpha$  Y789F est également capable de déphosphoryler ce résidu avec la même efficacité que la phosphatase de type sauvage *in vitro*. On peut donc conclure que la phosphorylation de la Y789 de la PTP $\alpha$  module la spécificité de la phosphatase pour ses substrats mais non son activité catalytique de façon général.

Zheng et al. ont donc élaboré un modèle de "phospho-déplacement" qui permet d'expliquer comment la phosphorylation de l'extrémité carboxy-terminale de la PTP $\alpha$

peut promouvoir la déphosphorylation spécifique de la tyrosine Y529 de Src et son activation subséquente (Figure 8).



**Figure 8. Modèle d'activation de Src par un mécanisme de phospho-déplacement de son domaine SH2.** En conditions basales, la pY529 de Src est généralement liée au domaine SH2 de Src (A) mais des fluctuations thermiques peuvent mener à une rupture transitoire de cette liaison (B), permettant ainsi à la pY789 de la PTP $\alpha$  de lier le domaine SH2 de Src (C). Ce déplacement du domaine SH2 de Src par la pY789 permet ensuite à la phosphatase d'adopter une conformation qui facilite la déphosphorylation de la pY529 de Src par le domaine catalytique D1 (D-E). Cette déphosphorylation de la Y529 de Src entraîne le déploiement de l'enzyme et son activation (F) (adapté de (345) avec la permission de Macmillan Publishers Ltd : [The EMBO Journal], copyright (2000)).

### 1.5.2 CD45

Les SFKs sont aussi reconnues pour jouer un rôle critique dans l'initiation de la signalisation induite par les immunorécepteurs dans les cellules B, T et les macrophages puisque ces récepteurs, tout comme les intégrines, ne possèdent pas d'activité tyrosine-kinase (155). La RPTP CD45, dont l'expression est restreinte aux leucocytes, est aussi

d'une importance magistrale dans la transmission de ces signaux. En effet, une déficience en CD45 chez la souris (45, 180, 217), ainsi que chez l'humain (186, 291), mène à une immunodéficiência sévère combinée (SCID). L'absence de CD45 bloque sévèrement le développement des thymocytes car CD45 régule positivement la signalisation émise par le récepteur des cellules T (T-cell receptor [TCR]), en activant Lck et Fyn via la déphosphorylation de leur tyrosine inhibitrice carboxy-terminale (136). Le développement des cellules B dans la moëlle osseuse des souris CD45  $-/-$  est par contre relativement normal. De même, les lignées myéloïdes ne présentent pas de défauts majeurs.

Bien que la phosphatase CD45 soit reconnue pour sa capacité à activer les SFKs dans les cellules T, l'ablation des SFKs spécifiques aux cellules B entraîne un blocage dans la maturation des cellules B qui est beaucoup plus grave et précoce que celui que l'on observe en absence de CD45 (258). Ces résultats suggéraient donc qu'une autre PTP présente dans ces cellules pouvait déphosphoryler la tyrosine carboxy-terminale des SFKs et ainsi contribuer à leur activation en absence de CD45. Effectivement, l'ablation de DEP-1 chez la souris entraîne un blocage partiel au niveau du développement des lymphocytes B périphériques, un phénotype ressemblant à celui des souris déficientes en CD45 (348). Conséquemment, des souris déficientes à la fois en CD45 et DEP-1 (CD45 $-/-$ CD148 $-/-$ ) présentent des défauts majeurs dans le développement des lignées de cellules B et myéloïdes ainsi que dans la signalisation induite par les immunorécepteurs. L'hyperphosphorylation de la tyrosine carboxy-terminale des SFKs (Lyn) dans les cellules B et les macrophages de ces souris suggère que l'activité de ces kinases est fortement réduite *in vivo* et qu'elle mène à une diminution majeure des capacités signalitiques du récepteur des cellules B (B-cell receptor [BCR]), et du récepteur Fc. Ces travaux ont donc permis de révéler que CD45 et DEP-1, via la déphosphorylation de la tyrosine carboxy-terminale des SFKs, sont toutes deux des régulateurs positifs essentiels à l'activation des SFKs induite par les immunorécepteurs des cellules B et des macrophages (348).

Il est à noter que CD45 est aussi en mesure de déphosphoryler le site d'autophosphorylation des SFKs et ainsi d'inhiber leur activité kinase *in vitro* et *in vivo* (148, 294). C'est entre autre le cas dans les macrophages dérivés de la moëlle osseuse

où il a été démontré que CD45 régule négativement l'adhésion médiée par les intégrines en déphosphorylant la tyrosine activatrice des kinases Hck et Lyn (248).

### 1.5.3 PTPε

La capacité de la PTPε à activer les SFKs fût démontrée dans les tumeurs mammaires de souris induites *in vivo* par l'oncogène Neu/ErbB2, qui code pour un récepteur à activité tyrosine kinase de la famille du récepteur à l'EGF (87, 121). Les niveaux d'expression de la PTPε sont en effet très élevés dans ces tumeurs et l'activité de Src, Fyn et Yes est réduite dans les tumeurs induites par Neu lorsque les souris sont génétiquement déficientes pour la PTPε (Ptpre<sup>-/-</sup>/Neu). Le niveau de prolifération des cellules tumorales issues des souris Ptpre<sup>-/-</sup>/Neu est d'ailleurs beaucoup moins élevé *in vitro* et *in vivo* et ces cellules apparaissent morphologiquement moins transformées. De plus, il a été démontré que Neu peut induire la phosphorylation d'un résidu tyrosine (Y695) situé en carboxy-terminale de la PTPε et que tout comme pour la PTPα, cette phosphorylation est requise pour l'activation de Src par la PTPε (25). La phosphorylation de la Y695 n'affecte pas l'activité de la phosphatase envers un autre de ses substrats, le canal au potassium voltage-dépendant Kv2.1, lorsque les deux protéines sont surexprimées dans les cellules HEK293. Ainsi, comme pour la PTPα, il a été suggéré que la phosphorylation sur résidu tyrosine de la PTPε peut modifier la spécificité de la phosphatase en dirigeant celle-ci vers certains de ses substrats.

### 1.5.4 PTP1B

La PTP1B, via la déphosphorylation de la Y529 de Src, peut aussi contribuer à l'activation de Src médiée par les intégrines au niveau des complexes d'adhérence focale (12, 61, 201). De plus, de par cette action sur Src, la PTP 1B serait impliquée dans le processus de transformation des cellules de cancers du sein et du côlon (29, 349). La PTP1B peut toutefois promouvoir le développement des tumeurs du sein induites par ErbB2 par un mécanisme qui ne nécessite pas la déphosphorylation de la Y529 de Src (164), supportant certaines études démontrant que Src peut promouvoir la tumorigenèse d'une façon indépendante de son activité kinase, en agissant comme molécule adaptatrice (6, 42, 166).

### 1.5.5 SHP-2

Le recrutement de Csk au niveau de PAG/cbp, une glycoprotéine transmembranaire phosphorylée sur résidu tyrosine, permet la phosphorylation de la tyrosine inhibitrice Y529 de Src par Csk et son inactivation (169). Il a été démontré que SHP-2 peut procéder à la déphosphorylation de PAG et diminuer l'association de Csk avec PAG (340). SHP-2 peut donc réguler indirectement la phosphorylation de la tyrosine inhibitrice Y529 des SFKs en contrôlant l'accessibilité de Csk. Ainsi, par ce mécanisme indirect, il a été démontré que SHP-2 joue un rôle essentiel dans l'activation des SFKs en aval des intégrines et de plusieurs récepteurs aux facteurs de croissance dont les récepteurs à l'EGF, au FGF et au PDGF. Dans les cellules endothéliales, la principale fraction de Src qui est activée en réponse au VEGF est celle qui est associée aux VE-cadhérines (128). SHP-2 peut aussi contribuer indirectement à l'activation de Src en réponse au VEGF en déphosphorylant le site de liaison de Csk au niveau des VE-cadhérines (128).

### 1.6 Régulation des activités du récepteur VEGFR2 par les PTPs

Bien que les activités des PTPs soient spécifiques, hautement régulées, et qu'elles doivent être coordonnées avec celles des protéines à activité tyrosine kinase [PTKs] pour une régulation adéquate des événements de signalisation intracellulaire, la contribution des PTPs à la régulation des différents processus physiologiques fondamentaux demeure encore peu caractérisée. En raison du rôle crucial que tient le récepteur VEGFR2 dans l'angiogenèse induite par le VEGF, il est impératif de définir les mécanismes moléculaires impliqués dans la régulation de ses activités par les PTPs. Ainsi, uniquement au cours des deux dernières années, quatre PTPs, sur un total de six identifiées jusqu'à maintenant, ont été rapportées comme pouvant déphosphoryler le récepteur VEGFR2. Cela démontre bien l'importance grandissante que l'on accorde aux PTPs dans la régulation du processus angiogénique. Les PTPs SHP-2, TC-PTP, VE-PTP et PTP1B sont donc venues s'ajouter aux PTPs SHP-1 et DEP-1, déjà reconnues pour leur implication dans la régulation de l'angiogenèse dépendante du VEGF depuis, respectivement, 2002 et 2003 (193, 215, 219, 222, 225, 226). La présente section

résume donc les connaissances actuelles concernant ces PTPs et leur interaction avec le récepteur VEGFR2.

### **1.6.1 SHP-1 et SHP-2**

Les phosphatases cytosoliques SHP-1 et SHP-2 peuvent toutes deux être recrutées au niveau du récepteur VEGFR2 en réponse à une stimulation des cellules endothéliales avec le VEGF (185). Le recrutement de SHP-1 peut en outre être augmenté par un pré-traitement au TNF- $\alpha$ , ce qui entraîne une diminution générale de la phosphorylation de VEGFR2 et l'inhibition de l'activation des ERK1/2 et de la prolifération cellulaire en réponse au VEGF (127, 225, 281). Quant à la phosphatase SHP-2, son recrutement peut être stimulé par l'adhésion des cellules endothéliales au collagène de type I, et non à la vitronectine, ce qui mène à une réduction de la phosphorylation de VEGFR2 en réponse au VEGF (222). Ces derniers résultats expliquent par ailleurs les résultats antérieurs rapportant que la prolifération des cellules endothéliales induite par le VEGF est plus faible sur le collagène que sur la vitronectine (270). Ainsi, lorsque les cellules endothéliales sont respectivement en présence de TNF- $\alpha$  ou en contact avec une matrice extracellulaire qui contient du collagène de type I, les phosphatases cytosoliques SHP-1 et SHP-2 peuvent réguler les activités biologiques du récepteur VEGFR2.

### **1.6.2 TC-PTP**

La TC-PTP peut aussi procéder à la déphosphorylation du récepteur VEGFR2 (215). La surexpression de la TC-PTP et de VEGFR2 entraîne la déphosphorylation des résidus tyrosine Y1054/59, Y996 et Y1214 de VEGFR2 alors que la Y1175 ne semble pas ciblée. Fait intéressant, l'adhésion des cellules endothéliales à une matrice de collagène, médiée par l'intégrine  $\alpha$ 1, entraîne une relocalisation de la TC-PTP au niveau de la membrane plasmique et stimule l'activité de la phosphatase. De même, un peptide perméable composé d'une portion de la queue cytoplasmique de l'intégrine  $\alpha$ 1, dont la capacité à activer la TC-PTP a déjà été démontrée, inhibe complètement l'activité kinase de VEGFR2 dans les cellules endothéliales stimulées avec le VEGF. Par conséquent, l'activation de la TC-PTP par ce peptide diminue grandement la



prolifération et la migration des cellules endothéliales en réponse au VEGF. Ainsi, lorsque les cellules endothéliales sont entourées d'une matrice extracellulaire riche en collagène, la TC-PTP activée peut contribuer à la régulation des activités biologiques du récepteur VEGFR2.

### 1.6.3 PTP $\beta$ /VE-PTP

Les souris déficientes en RPTP $\beta$ /VE-PTP meurent au jour embryonnaire 9.5 (E9.5) en raison d'un défaut au niveau de l'angiogenèse (19, 82). L'expression de cette phosphatase de type récepteur est spécifique à l'endothélium vasculaire et elle augmente avec la densité cellulaire. La VE-PTP interagit directement avec les VE-cadhérines et elle est requise pour le maintien de l'intégrité des jonctions adhérentes des cellules endothéliales puisque l'inhibition de son expression augmente la perméabilité paracellulaire et la transmigration des leucocytes (227, 231). Ces effets semblent par ailleurs être reliés à une augmentation de la phosphorylation de la plakoglobine, ce qui suggère que cette dernière est un substrat de la VE-PTP. Cette phosphatase peut aussi procéder à la déphosphorylation du récepteur à l'angiopoïétine Tie2, lorsqu'elle est co-transfectée avec celui-ci (91). Lorsque des cellules endothéliales cultivées dans un gel tridimensionnel de collagène sont stimulées avec le VEGF, elles cessent de proliférer pour former des structures tubulaires. Tout récemment, il a été rapporté que le niveau d'expression de la VE-PTP augmente dans les cellules endothéliales lors de la morphogenèse tubulaire induite par le VEGF, si on compare ce niveau à celui que l'on retrouve dans les cellules endothéliales en prolifération sur une matrice de fibronectine (219). Les auteurs de cette étude démontrent de plus que la VE-PTP s'associe au récepteur VEGFR2 dans les cellules endothéliales quiescentes et que l'inhibition de l'expression de la VE-PTP mène à une augmentation du niveau de phosphorylation de VEGFR2, à une augmentation du nombre de cellules en phases S et G2/M, et à une inhibition de la formation de capillaires en réponse au VEGF. Par ailleurs, les niveaux de phosphorylation des résidus tyrosine Y951 et Y1175 de VEGFR2 augmentent davantage que celui de la Y1214. Ces résultats suggèrent donc que la VE-PTP est impliquée dans la régulation des activités du récepteur VEGFR2 lors du processus angiogénique et ce, plus particulièrement à l'étape de la tubulogenèse.

#### 1.6.4 PTP1B

La PTP1B est l'une des principales PTPs dont l'expression et l'activité est fortement induite lors de l'angiogenèse déclenchée en réponse à l'ischémie des membres postérieurs chez la souris (226). Il a aussi été démontré que la PTP1B peut lier le récepteur VEGFR2 et entraîner une diminution de son niveau de phosphorylation sur résidus tyrosine (226). Cette diminution de phosphorylation mène à une atténuation de l'activation des ERK1/2 et de la prolifération cellulaire mais n'affecte pas l'induction de la p38 et d'Akt, ni la migration et la survie qui en dépendent. La Y1175 du récepteur VEGFR2, impliquée dans la liaison et l'activation de la PLC $\gamma$ , est entre autre déphosphorylée, mais il n'est pas mentionné si d'autres résidus tyrosine sont aussi touchés. Cette étude rapporte par ailleurs que la PTP1B peut aussi s'associer aux VE-cadhérines et réduire leur niveau de phosphorylation sur résidus tyrosine, ce qui pourrait contribuer à la stabilisation des jonctions intercellulaires (226). La PTP1B serait donc impliquée, via sa capacité à déphosphoryler le récepteur VEGFR2 et les VE-cadhérines, dans la modulation de la réponse angiogénique dépendante du VEGF.

#### 1.6.5 DEP-1/ PTP $\eta$ / CD148/PTPRJ

DEP-1, aussi connue sous le nom de PTP $\eta$ , CD148 ou PTPRJ, est une phosphatase de type récepteur d'environ 180-220 kDa qui est exprimée dans plusieurs types cellulaires dont les cellules endothéliales et hématopoïétiques (35, 71, 143, 236). Elle est constituée d'un domaine extracellulaire comportant 8 répétitions fibronectine de type III, un segment transmembranaire et un seul domaine catalytique intracellulaire (voir les figures 5 et 9) (236). Comme son nom l'indique, DEP-1 (Density enhanced phosphatase-1) est une phosphatase dont l'expression augmente avec la densité cellulaire, suggérant ainsi un rôle dans "l'inhibition de contact" (236). L'expression de DEP-1 a aussi été associée à la différenciation et l'inhibition de la prolifération des cellules tumorales, deux propriétés associées aux gènes suppresseurs de tumeurs (172, 303, 339). Le gène codant pour DEP-1 a d'ailleurs été identifié comme gène de susceptibilité au cancer du côlon chez la souris (Sccl1), et il est fréquemment délété ou muté dans les cancers humains (257). L'inactivation fonctionnelle de DEP-1 au niveau embryonnaire, causée par le remplacement des séquences cytoplasmiques de la

phosphatase par des séquences codant pour la protéine fluorescente verte (GFP), est létale chez la souris (285). En effet, l'hyperprolifération des cellules endothéliales et l'incapacité des vaisseaux nouvellement formés à se remodeler et se ramifier correctement entraîne une profonde désorganisation des structures vasculaires de l'embryon incompatible avec la survie. Ce phénotype révèle donc que DEP-1 joue un rôle crucial dans l'angiogenèse lors du développement embryonnaire. Étonnamment toutefois, le groupe de Fusco rapporte que l'ablation totale de DEP-1, suite à une délétion des exons 3, 4 et 5 du gène, n'a aucun effet sur le développement du système vasculaire de la souris et ces dernières sont viables et fertiles (302). Cette absence d'aberrations majeures visibles chez les souris déficientes en DEP-1 a aussi été constatée par le groupe de Weiss (348). Comme mentionné dans la section 1.5.2, une analyse plus en détails du système immunitaire de ces souris révèle toutefois que ces dernières présentent un blocage partiel au niveau du développement de leurs cellules B périphériques, un phénotype ressemblant à celui des souris déficientes en CD45. La double mutation de DEP-1 et CD45 mène par contre à l'apparition de défauts majeurs au niveau du développement des lignées de lymphocytes B et myéloïdes (348). La double mutation de CD45 et DEP-1 a donc permis de mettre en évidence la contribution importante, bien que redondante, de DEP-1 et CD45 dans le développement du système immunitaire et l'activation des SFKs en aval des immunorécepteurs. Cette étude amène aussi à penser que l'absence de phénotype vasculaire apparent dans les souris déficientes en DEP-1 pourrait signifier que d'autres phosphatases peuvent remplir les fonctions de DEP-1 en son absence. Il semble cependant que cette substitution soit impossible lorsqu'une forme tronquée de DEP-1 est toujours exprimée, comme c'est le cas des souris exprimant le domaine extracellulaire de DEP-1 fusionnée à la GFP (285). Un rôle pour DEP-1 dans le développement du système vasculaire a aussi été rapporté récemment chez le poisson zèbre où l'inhibition de l'expression de DEP-1 réduit la spécification artérielle et augmente l'expression des marqueurs veineux (250).

Au niveau des cellules endothéliales comme telles, il a été montré que la déplétion de DEP-1 entraîne une augmentation de la phosphorylation de VEGFR2 et une perte de l'inhibition de la prolifération cellulaire médiée par le complexe des VE-cadhérines (73, 193). Ces résultats suggéraient donc que VEGFR2 est un substrat de

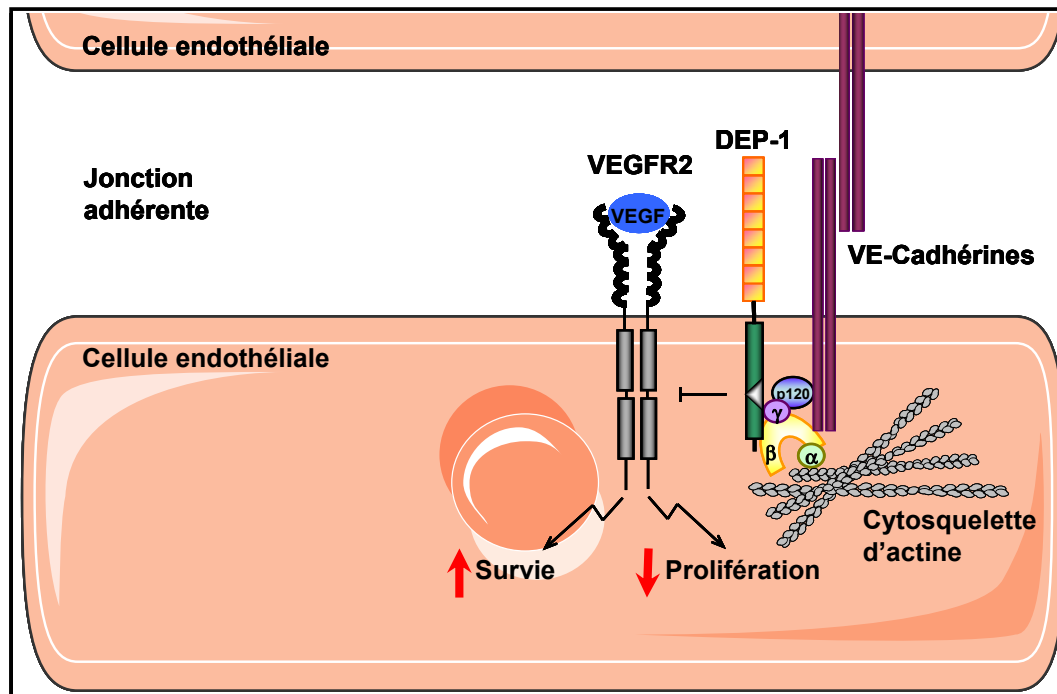
DEP-1. Mis-à-part le récepteur VEGFR2, seulement six substrats ont été identifiés jusqu'à ce jour pour DEP-1, parmi lesquels on retrouve quatre récepteurs à activité tyrosine kinase, soient les récepteurs au PDGF (PDGFR- $\beta$ ), HGF (HGFR/Met), EGF (EGFR) et le récepteur RET, ainsi que la kinase Src et la p120 caténine (26, 142, 153, 173, 183, 195, 237). Dans le cas des récepteurs PDGFR- $\beta$  et HGFR/Met, il a été démontré que DEP-1 cible spécifiquement les résidus tyrosine qui sont impliqués, respectivement, dans la promotion de la prolifération cellulaire et la morphogenèse (183, 237). Pour ce qui est de Src, il a été montré que la surexpression de DEP-1 dans une lignée cancéreuse de la glande thyroïde de rat induit la déphosphorylation de sa tyrosine inhibitrice Y529 et augmente son activité (195). L'absence de DEP-1, comme mentionné plus haut, diminue par ailleurs l'activation des SFKs en aval des immunorécepteurs. Cette capacité de DEP-1 à activer Src a aussi été rapportée en réponse à l'adhésion (159). La p120-caténine est également un substrat de DEP-1 mais les conséquences physiologiques de la déphosphorylation de cette composante du complexe des VE-cadhérines par DEP-1 ne sont pas connues (142). DEP-1 peut d'autre part s'associer avec la  $\beta$ -caténine et la plakoglobine (237).

#### **1.6.5.1 Régulation du récepteur VEGFR2 par le complexe VE-cadhérine/ $\beta$ -caténine/DEP-1**

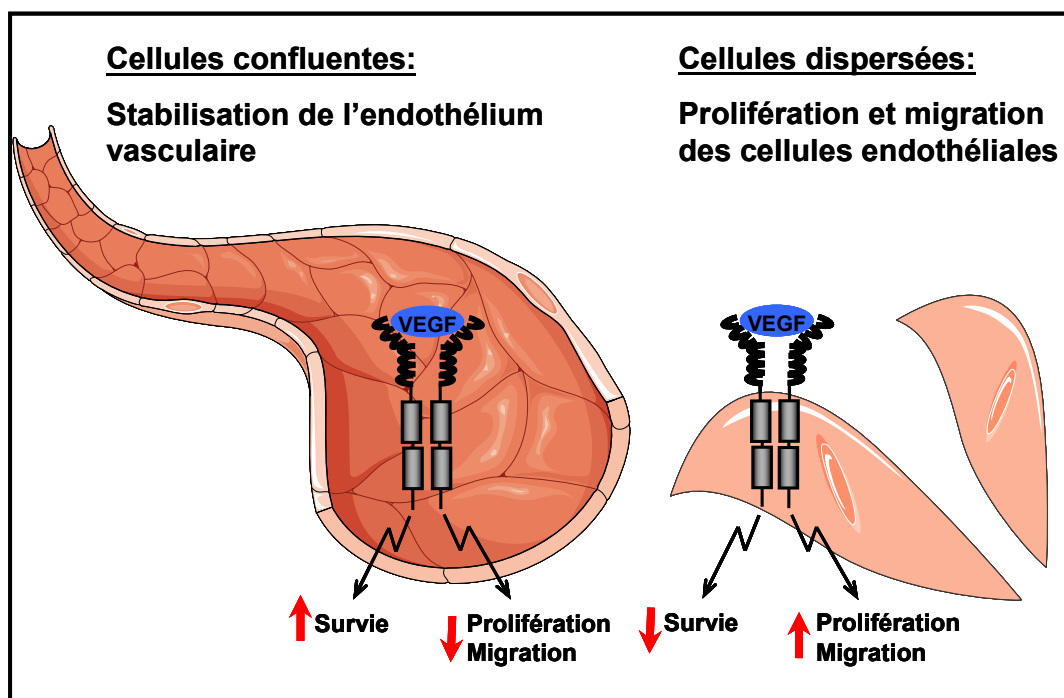
Lorsque les cellules endothéliales à confluence sont stimulées avec le VEGF, le VEGFR2 s'associe au complexe des VE-cadhérines via la  $\beta$ -caténine (Figure 9A) (54, 193). Comme tous les membres de la famille des cadhérines, les VE-cadhérines, qui sont spécifiques aux cellules endothéliales vasculaires, forment des liaisons homophiliques via leur domaine extracellulaire et sont liées aux protéines p120-caténine,  $\beta$ -caténine et plakoglobine ( $\gamma$ -caténine) par l'entremise de leur domaine cytoplasmique (20, 192). La  $\beta$ -caténine et la plakoglobine se lient quant à elles à l' $\alpha$ -caténine, qui interagit directement avec l'actine et plusieurs autres protéines pouvant lier l'actine dont l' $\alpha$ -actinine et la vinculine. Le lien moléculaire exact qui relie le complexe formé des VE-cadhérines et des caténines au cytosquelette d'actine reste toutefois un sujet de débat (329). Il n'en demeure pas moins que ce complexe est

essentiel pour la formation et le maintien de l'intégrité des jonctions cellules-cellules au niveau de l'endothélium vasculaire (314).

A)



B)



**Figure 9. Modèle de régulation des propriétés signalitiques du récepteur VEGFR2 par les VE-cadhérines au niveau des jonctions adhérentes.** **A)** Le VEGFR2 s'associe avec les VE-cadhérines au niveau des jonctions adhérentes. Les VE-cadhérines forment des liens intercellulaires via leurs interactions homophiliques avec d'autres molécules situées sur une cellule voisine. Leur domaine cytoplasmique est rattaché au cytosquelette d'actine par l'intermédiaire des caténines (p120,  $\alpha$ ,  $\beta$ - et  $\gamma$ -caténine). L'association des VE-cadhérines avec le récepteur VEGFR2 est reconnue pour affecter différenciellement la capacité du récepteur à stimuler la prolifération et la survie des cellules endothéliales et la phosphatase membranaire DEP-1 est impliquée dans ce phénomène (54, 193) **B)** Dans les cellules endothéliales confluentes, les VE-cadhérines sont regroupées et associées avec le VEGFR2 au niveau des jonctions adhérentes. Selon le modèle élaboré par Lampugnani et al. en 2003 (73, 193), le VEGFR2 peut donc, dans ces conditions, promouvoir la survie des cellules endothéliales plutôt que leur prolifération pour favoriser la stabilisation de l'endothélium vasculaire. À l'inverse, dans les cellules dispersées, puisque les jonctions cellulaires sont démantelées, l'activation du récepteur VEGFR2 par le VEGF mènerait préférentiellement à l'émission de signaux de prolifération plutôt que de survie.

L'association de VEGFR2 avec le complexe des VE-cadhérines a de fortes répercussions sur les propriétés signalitiques du récepteur. En effet, les travaux de Lampugnani et al. ont démontré qu'en réponse au VEGF, la phosphorylation du récepteur VEGFR2 est réduite en présence des VE-cadhérines et que cette réduction s'accompagne d'une diminution de l'activation des ERK1/2 et de la division cellulaire (193). DEP-1 serait par ailleurs impliquée dans cette inhibition de la prolifération qui survient au contact cellulaire et que l'on appelle communément "inhibition de contact". Les travaux de Lampugnani et al. démontrent effectivement qu'en absence de protéines DEP-1 fonctionnelles, l'activité du récepteur VEGFR2 n'est plus sous le contrôle des VE-cadhérines. Aucune interaction directe entre VEGFR2 et DEP-1 n'a toutefois été démontrée dans cette étude (193).

Même si le récepteur VEGFR2 subit une baisse de phosphorylation lorsque les cellules endothéliales sont assujetties à l'action astreignante du complexe VE-cadhérine/ $\beta$ -caténine/DEP-1, l'induction de la PI3K médiée par le VEGFR2 doit demeurer soutenue pour assurer la survie des cellules endothéliales, comme démontré dans les travaux de Carmeliet et al. (54). Les auteurs ont donc suggéré que la déphosphorylation de VEGFR2 par DEP-1 dans les cellules confluentes se produit au niveau de certains résidus tyrosine spécifiques impliqués dans la promotion de la

prolifération, comme la Y1175 par exemple, sans cibler les résidus tyrosine dont la phosphorylation est strictement nécessaire pour assurer l'activation de la PI3K et de Akt. À l'inverse, lorsque les cellules sont dispersées et que les jonctions sont désorganisées, le VEGFR2, non associé aux VE-cadhérine/ $\beta$ -caténine/DEP-1, serait davantage en mesure d'émettre des signaux de prolifération que de survie. Ce modèle de régulation des propriétés signalitiques du récepteur VEGFR2 par le complexe des VE-cadhérines est illustré à la figure 9 B) (73).

Malgré la mise en évidence par Lampugnani et al. de cette fonction biologique importante pour DEP-1, les mécanismes moléculaires employés par DEP-1 pour exercer cette fonction de manière spécifique n'ont pas été investigués. Le patron de déphosphorylation de VEGFR2 par DEP-1, de même que l'implication de DEP-1 dans la régulation des autres voies de signalisation et activités biologiques dépendantes du VEGF demeuraient toujours inconnus.

### **1.7 Objectifs des travaux de recherche**

Compte tenu du rôle majeur que semble jouer DEP-1 dans la détermination du phénotype endothélial et du peu de connaissances que nous avons de sa contribution aux activités du récepteur VEGFR2, le but de nos travaux de recherche était de mieux définir le rôle de DEP-1 dans la régulation du programme angiogénique dépendant du VEGF. Les objectifs spécifiques de notre première étude, dont les résultats sont présentés au chapitre 2, étaient donc les suivants :

- Confirmer que le récepteur VEGFR2 est un substrat de DEP-1
- Identifier parmi les 7 sites majeurs d'autophosphorylation de VEGFR2 ceux qui sont spécifiquement ciblés par DEP-1
- Déterminer les conséquences de cette déphosphorylation de VEGFR2 par DEP-1 sur la signalisation et les activités biologiques dépendantes du VEGF dans les cellules endothéliales

Dans cette première étude, nous démontrons que DEP-1 régule positivement l'activation de Src et de la voie Src-Gab1-Akt en aval du récepteur VEGFR2. De plus, au cours de nos travaux, nous avons pu observer la phosphorylation de DEP-1 sur résidus tyrosine. Puisqu'il a été démontré que la phosphorylation sur résidus tyrosine de

la PTP $\alpha$  et de la PTP $\epsilon$  pouvait spécifiquement diriger l'activité de ces phosphatases vers Src, les objectifs spécifiques de notre deuxième étude présentée au chapitre 3 étaient les suivants :

- Déterminer si la phosphorylation de DEP-1 est dépendante de Src
- Identifier le ou les résidus tyrosine qui sont phosphorylés au niveau de DEP-1
- Évaluer la contribution de ces résidus à l'activation de Src médiée par DEP-1 en réponse au VEGF dans les cellules endothéliales



**NEW ROLE FOR THE PROTEIN TYROSINE PHOSPHATASE DEP-1  
IN AKT ACTIVATION AND ENDOTHELIAL CELL SURVIVAL**

Catherine Chabot<sup>1\*</sup>, Kathleen Spring<sup>1</sup>, Jean-Philippe Gratton<sup>2,3,4</sup>, Mounib Elchebly<sup>5,6</sup>,  
and Isabelle Royal<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Centre de recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM) and  
Institut du Cancer de Montréal, Montréal, Québec, Canada, H2L 4M1, <sup>2</sup>Laboratory of  
Endothelial Cell Biology, Institut de recherches cliniques de Montréal (IRCM),  
Montréal, Québec, Canada, H2W 1R7, <sup>5</sup>Centre de recherche de l'Hôpital Sainte-Justine,  
Montréal, Québec, Canada, H3T 1C5. Departments of <sup>3</sup>Medicine, <sup>4</sup>Pharmacology, and  
<sup>6</sup>Biochemistry, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada.

**Article publié dans *Molecular and Cellular Biology*, vol. 29(1): 241-253, 2009**

\*Catherine Chabot a réalisé plus de 95 % des travaux de recherche de cet article. Kathleen Spring a participé à la révision de l'article en vue de son acceptation finale par l'éditeur. Isabelle Royal a supervisé l'ensemble des travaux et rédigé le manuscrit. Jean-Philippe Gratton et Mounib Elchebly ont collaboré à cette étude en fournissant certains réactifs et en apportant leurs commentaires au manuscrit.

**Abstract**

Functional inactivation of the protein tyrosine phosphatase DEP-1 leads to increased endothelial cell proliferation, and failure of vessels to remodel and branch. DEP-1 was also proposed to contribute to the contact inhibition of endothelial cell growth via dephosphorylation of VEGFR2, a mediator of vascular development. However, how DEP-1 regulates VEGF-dependent signaling and biological responses remains ill-defined. We show here that DEP-1 targets tyrosine residues in the VEGFR2 kinase activation loop. Consequently, depletion of DEP-1 results in the increased phosphorylation of all major VEGFR2 autophosphorylation sites, but surprisingly, not in the overall stimulation of VEGF-dependent signaling. The increased phosphorylation of Src on Y529 in these conditions results in impaired Src and Akt activation. This inhibition is similarly observed upon expression of catalytically inactive DEP-1, and co-expression of active Src-Y529F mutant rescues Akt activation. Reduced Src activity correlates with decreased phosphorylation of Gab1, an adapter protein involved in VEGF-dependent Akt activation. Hypophosphorylated Gab1 is unable to fully associate with PI3K, VEGFR2, and VE-cadherin complexes, leading to sub-optimal Akt activation and increased cell death. Overall, our results reveal that despite its negative role on global VEGFR2 phosphorylation, DEP-1 is a positive regulator of VEGF-mediated Src and Akt activation, and endothelial cell survival.

## Introduction

Angiogenesis, or the formation of new blood vessels from pre-existing ones, is a tightly regulated process essential for development, female reproductive functions and wound healing (101, 247). When uncontrolled or dysfunctional, angiogenesis also contributes to the development of several pathologies including cancer, rheumatoid arthritis, retinopathies, and cardiovascular diseases (53, 177). In normal or pathological conditions, neovascularization relies on the ability of endothelial cells to respond to gradients of angiogenic factors such as vascular endothelial growth factor (VEGF), which promotes the survival, permeability, migration and proliferation of loosely associated endothelial cells as they form new capillary tubes (21, 94). At the surface of endothelial cells, the VEGFR2 (KDR/Flk-1) receptor tyrosine kinase (RTK) has been identified as the major mediator of VEGF-dependent signaling and cellular activities (96). The tight coordination of phosphorylation and dephosphorylation events downstream of RTKs is required to maintain the proper signaling and kinetic specificities which dictate biological outcome. Control of tyrosine kinase-dependent signaling is in part mediated by protein tyrosine phosphatases (PTPs). However, despite the importance of VEGFR2 in the orchestration of the angiogenic response, the molecular mechanisms critical for the regulation of its signaling and biological activities are ill-defined, and little is known with respect to the implication of PTPs.

Density enhanced protein-1 (DEP-1/PTP- $\eta$ /CD148/PTPRJ) is a receptor-type PTP of about 180-220 kDa, which is expressed in several cell types including endothelial, epithelial and hematopoietic cells (35, 71, 143, 236). It comprises an extracellular domain containing 8 fibronectin type III motifs, a transmembrane domain, and a single intracellular catalytic domain (236). The expression level of DEP-1 was initially reported to increase with cell density, suggesting that it might work as a regulator of cell contact-mediated growth inhibition (236). DEP-1 expression was also shown to be implicated in cell differentiation and the inhibition of tumor cell proliferation, suggestive of a role as a tumor suppressor (172, 303, 339). In line with these findings, DEP-1 was identified as the gene associated with the mouse colon cancer susceptibility locus (*Scc1*), and is frequently deleted or mutated in human

cancers (257). In vivo inactivation of DEP-1 catalytic activity disrupts proper vascular development, leading to increased endothelial cell proliferation and impaired vessel remodeling and branching (285). Since VEGFR2 is a major promoter of vascular development, these observations suggested its potential interaction with DEP-1. Interestingly, a fraction of DEP-1 localizes at endothelial cell-cell junctions, where VEGFR2 has also been reported to associate (35, 54). Consistent with this co-localization, DEP-1 was shown to partly regulate VE-cadherin-mediated contact-inhibition, via the concomitant dephosphorylation of VEGFR2 and inhibition of ERK1/2 activation (193). However, despite these important biological functions of DEP-1 in endothelial cells in vitro and in vivo, there is relatively little functional and mechanistic insight into how DEP-1 regulates the endothelial cell phenotype.

A few DEP-1 candidate substrates have been identified besides VEGFR2, including p120catenin, Src, and the PDGF- $\beta$ , Met/HGF, EGF, and RET receptors (26, 142, 153, 183, 195, 237). DEP-1 dephosphorylates specific tyrosine residues of PDGFR- $\beta$  and Met/HGF receptors that are involved in the promotion of cell proliferation and morphogenesis, respectively (183, 237). In addition, DEP-1 overexpression in a malignant rat thyroid cell line was reported to specifically induce dephosphorylation of the Src inhibitory Y529, and thus, increase Src activity (195). Although DEP-1 was shown to negatively regulate the VEGF-dependent activation of ERK1/2 and DNA synthesis (193), the pattern of VEGFR2 dephosphorylation by DEP-1 as well as its potential implication in the regulation of other VEGF-dependent signaling cascades and biological activities remain unknown. In response to VEGF stimulation, VEGFR2 activates Src, phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), Akt, and eNOS, which provide cell survival, migratory, and permeability signals (1, 85, 107, 118, 126, 133, 224, 324). Activated VEGFR2 has been reported to associate with VE-cadherin complexes via  $\beta$ -catenin, and this is essential for its association with PI3K, the activation of Akt, and the promotion of cell survival in response to VEGF (54). In addition, we and others have recently shown that the Gab1 adapter protein recruits PI3K, associates with VEGFR2 complexes, and mediates optimal VEGF-dependent Akt activation, as well as endothelial cell migration and capillary formation (69, 194). In order to determine if a targeted action of DEP-1 was involved in the differential

regulation of VEGF-evoked angiogenic pathways in endothelial cells, we investigated the consequences of DEP-1 expression on the VEGFR2 phosphorylation profile and downstream signaling. We show here that in contrast to other RTKs, DEP-1 expression induces the global dephosphorylation of VEGFR2 by targeting tyrosine residues in the kinase activation loop involved in VEGFR2 activation. Reciprocally, depletion of DEP-1 from endothelial cells results in the simultaneous increased phosphorylation of every major VEGFR2 autophosphorylation sites. Unexpectedly, this does not translate into the upregulation of all VEGF-dependent signaling since DEP-1 is required for dephosphorylation of Src Y529 and consequent Src and Akt activation. Thus, the depletion of DEP-1 leads to the reduced Src-dependent phosphorylation of Gab1 and its decreased association with PI3K, Src, VE-cadherin and VEGFR2 complexes, resulting in the inhibition of Akt activation and increased cell death. Our work therefore reveals an unforeseen role for DEP-1 in the association of Gab1 to the VEGFR2/VE-cadherin signaling complexes, the promotion of Src and Akt activation, and endothelial cell survival.

## Materials and Methods

**Cell culture.** HEK 293 cells were grown in DMEM high glucose (Invitrogen) containing 10% FBS (Invitrogen) and 50 µg/ml gentamycin (Wisent). Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) (from Clonetics/Lonza or Cascade Biologics, purchased from Cedarlane Laboratories Ltd., Burlington, ON, Canada) were cultured (passages 1 to 4) on 0.2% gelatin-coated tissue culture dishes and maintained in EBM-2 supplemented with 2% FBS, EGF, VEGF, FGF, heparin, IGF-1, hydrocortisone and ascorbic acid (EGM-2 bullet kit; Clonetics/Lonza).

**Antibodies and reagents.** Antibodies against phosphotyrosine (PY99), Myc (clone 9E10), VEGFR2 (clone C-1158 to immunoprecipitate VEGFR2, and clone A-3 for immunoblotting), Gab1 (clone H-198), and VE-cadherin (clone C-19 for immunoblotting) were purchased from Santa Cruz Biotechnology. A third anti-VEGFR2 antibody (rabbit antiserum) purchased from Upstate/Millipore (Cedarlane Laboratories) was also used to immunoprecipitate VEGFR2. Antibodies against VEGFR2 pY1054, VEGFR2 pY1059, p85 subunit of PI3-kinase, PLC $\gamma$ , GST, and Src (clone GD11 for immunoprecipitation) were obtained from Upstate/Millipore. Phosphospecific antibodies against VEGFR2 pY1054/1059, VEGFR2 pY1214, PLC $\gamma$  pY783, Src pY529, and Src pY418 were obtained from BioSource Inc. (Invitrogen). Antibodies against VEGFR2 pY951, VEGFR2 pY996, VEGFR2 pY1175, Src (clone 36D10 for immunoblotting), Akt pS473, Akt pT308, Akt, ERK1/2 pT202/pY204, ERK1/2, eNOS pS1177, eNOS, FOXO1 pS256, FOXO1, p38 MAPK pT180/pY182, and p38 MAPK were from Cell Signaling Technology Inc., New England Biolabs. The VE-Cadherin (clone 11D4.1 for immunoprecipitation) and  $\beta$ -catenin antibodies were from BD Transduction Laboratories, BD Biosciences. The actin (JLA20) monoclonal antibody developed by Jim Jung-Ching Lin was obtained from the Developmental Studies Hybridoma Bank developed under the auspices of the NICHD and maintained by The University of Iowa, Department of Biological Sciences, Iowa City, IA. PP2 was purchased from Biomol (Plymouth Meeting, PA). Anti-VEGFR2 pY801 was generated as previously described (32). Horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-mouse or -

rabbit IgG from Cell Signaling Technology Inc. were used for immunodetection. VEGF, CSF-1, FGF, and the DEP-1 antibody were purchased from R&D Systems (distributed by Cedarlane Laboratories).

**Generation of Myr-DEP-1 construct.** The cDNA encoding the intracellular domain of human DEP-1 (amino acids 997 to 1337 (236)) was generated by RT-PCR carried out on total RNA extracted from HeLa cells with TRIZOL (Invitrogen), and using RNase H Reverse transcriptase (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Primers used were 5'-GTCGGATCCAGAAAGAAGAGGAAA-GATGCA-3' (sense orientation) and 5'-TTTCTCGAGGCGATGTAACCATT-GGTCTT-3' (antisense orientation). The underlined sequences correspond to added *Bam*HI and *Xho*I restriction sites, respectively. The cDNA was cloned into the mammalian expression vector pCDNA4. The short myristylation sequence from the N-terminal domain of Src (a.a. 1-17) was introduced 5' of the DEP-1 sequence to target the protein to the plasma membrane. The resulting Myr-DEP-1 cDNA expression vector encodes a fusion protein with an amino-terminal myristylation signal and amino acids 997-1337 of DEP-1 followed by a Myc-tag and a His-tag. DEP-1 point mutants (C1239S and D1205A) were generated by site-directed mutagenesis using the QuikChange site-directed mutagenesis kit according to the manufacturer's protocol (Stratagene, La Jolla, CA) using the following mutagenic primers (Invitrogen, Burlington, ON, Canada): 5'-CGATTCTGGTGCATTCCAGTGCTGGGGTCGG-3' (C/S mutant - sense orientation) and 5'-CACCTCCTGGCCAGCCCACGGTGTTC~~CC~~GAC-3' (D/A mutant – sense orientation). Mutations were confirmed by DNA sequencing.

**Generation of the CSF-VEGFR2 chimeric receptor mutants.** The CSF-VEGFR2 chimeric receptor encoding the human CSF-1 receptor extracellular domain fused to the transmembrane and intracellular domain of human VEGFR2 (in the pShuttle-CMV adenoviral vector; Qbiogene, MP Biomedicals, Montreal, Qc, Canada) was generated as described before (194). The human CSF-1R (pSM-CSF-1R) and VEGFR2 (pCR3-hFlk1) vectors were kind gifts of Martine Roussel (St-Jude Children's Research Hospital, Memphis, TN) and Cam Patterson (University of North Carolina, Chapel Hill,

NC), respectively. All of the CSF-VEGFR2 mutations were generated using the QuikChange XL site-directed mutagenesis kit (Stratagene). The mutagenic primers (Invitrogen) used to generate the various mutants were the following: 5'-AACTGAAGACAGGCTTCTTGTCCATCGTCATGGATCC-3' (Y801F), 5'-GTCAAGGGAAAGACTTCGTTGGAGCAATCCCTGTGGAT-3' (Y951F), 5'-GAAGCTCCTGAAGATCTGTTTAAGGACTTCCTGACC-3' (Y996F), 5'-CTGTGACTTTGGCTTGGCCCGGGATATTTTTAAAGATCCAG-3' (Y1054F), 5'-GATATTTATAAAGATCCAGATTTTGTTCAGAAAAGGAGATGC-TCGC-3' (Y1059F), 5'-TGCTCAGCAGGATGGCAAAGACTTCATTGTTCTTCC-GA-3' (Y1175F), 5'-GACCCCAAATTCCATTTTGACAACACAGCAGGAA-TCAGTC-3' (Y1214F). The Y1054F/Y1059F mutant was made on the CSF-VEGFR2 Y1059F mutant using the Y1054F mutagenic primer. The 5F mutant (Y801F/Y951F/Y996F/Y1175F/Y1214F) was sequentially made by using the corresponding mutagenic primers described above.

**Substrate-trapping experiments.** HEK 293 cells were seeded at  $1.2 \times 10^6$  cells/10-cm dish and transfected 24 h later using the standard calcium phosphate method with 20  $\mu$ g of VEGFR2 cDNA construct (pCR3-hFlk1), 15  $\mu$ g of CSF-VEGFR2, or the corresponding pCR3 or pShuttle-CMV empty vectors. Twenty-four hours post-transfection, cells were serum-starved in DMEM overnight. Prior to lysis, cells were incubated with freshly made pervanadate (100  $\mu$ M) for 20 min at 37°C (pervanadate mixture (10 mM): 1.0 ml of 10 mM sodium orthovanadate mixed with 1.2  $\mu$ l of 30 %  $H_2O_2$ ). Cells were rinsed with PBS and lysed in a 50 mM HEPES pH 7.5 buffer containing 0.5 % Nonidet P-40, 0.5% Triton X-100, 10 % glycerol, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 10  $\mu$ g/ml aprotinin, and 10  $\mu$ g/ml leupeptin. The lysis buffer also contained 5 mM iodoacetic acid to inhibit cellular PTPs irreversibly. After incubation on ice for 20 min, dithiothreitol was added to a final concentration of 10 mM to inactivate unreacted iodoacetic acid. Cell lysates (4 mg and 2 mg of VEGFR2 and CSF-VEGFR2 transfected cells, respectively) were mixed with DEP-1 previously collected on beads. DEP-1 was immunoprecipitated 1.5 h at 4 °C using the 9E10 Myc antibody from independent lysates (250  $\mu$ g, or 1 mg for Figure 1A experiment) of HEK



293 cells transfected with 10 µg of Myr-DEP-1 cDNA constructs per 10-cm dish. Protein G-Sepharose beads were added for 1.5 h at 4 °C and then washed 3 times with lysis buffer (w/o iodoacetic acid) before incubation for 3 more hours with lysates of HEK 293 cells transfected with VEGFR2, CSF-VEGFR2, or empty vectors prepared as described above. Beads were washed 3 times with lysis buffer and trapped proteins were subjected to SDS-PAGE, transferred onto Hybond-C Extra membranes (Amersham Biosciences/GE Healthcare), and revealed by Western blotting and ECL detection according to the manufacturer's recommendations (Amersham Biosciences/GE Healthcare). HEK 293 cells expressing the CSF-VEGFR2 mutants were in addition stimulated at 37 °C for 5 min with CSF-1 (50 ng/ml) at the end of the pervanadate treatment. For in vivo association, HEK293 cells in 10-cm dishes were transfected with 10 µg of DEP-1 D/A plasmid (obtained from Nicholas Tonks, Cold Spring Harbor Laboratories), or with 10 µg of VEGFR2 plasmid (pCR3-hFlk1) in combination with 10 µg of pMT2 empty vector or 10 µg of DEP-1 D/A. Twenty-four hours post-transfection, cells were serum-starved overnight, rinsed with PBS containing 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, and lysed with the 50 mM HEPES pH 7.5 lysis buffer described above (containing 5 mM NaF and 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>). VEGFR2 was immunoprecipitated overnight and further incubated for 1 h with Protein A-Sepharose beads.

**In vitro dephosphorylation of VEGFR2.** HEK293 cells were transfected with 20 µg of VEGFR2 cDNA construct (pCR3-hFlk1). Twenty-four hours post-transfection, cells were serum-starved overnight, stimulated with VEGF (50 ng/ml) at 37°C for 5 min, and lysed as for the in vivo association experiment described above. VEGFR2 immunoprecipitates were washed twice with PBS and once with PTPase assay buffer (306) before incubating with 5 µg of GST or GST-DEP-1<sub>IC</sub> fusion proteins (WT or C/S) for 1 h at 37 °C in 500 µl of PTPase buffer. GST-DEP-1<sub>IC</sub> was generated by subcloning the intracellular domain of WT and C/S DEP-1 into pGEX4T2, and proteins were produced as described (254). VEGFR2 immunoprecipitates were washed 3 times with PTPase buffer before performing SDS-PAGE and Western blotting analysis.

**Dephosphorylation of VEGFR2 by Myr-DEP-1 in HEK 293 cells.** HEK 293 cells were transfected with 20  $\mu\text{g}$  of VEGFR2 plasmid (pCR3-hFlk1) in combination with increasing amounts of WT Myr-DEP-1 plasmid (0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, and 1.0  $\mu\text{g}$ ) per 10-cm dish. The total amount of DNA in each plate was normalized using empty vector pCDNA4. Twenty-four hours post-transfection, the cells were serum-starved overnight and stimulated or not with VEGF (50 ng/ml) for 2 min at 37 °C. Cells were rinsed with 5 ml of PBS containing 250  $\mu\text{M}$   $\text{Na}_2\text{VO}_3$  and lysed in the 50 mM HEPES pH 7.5 lysis buffer containing 5 mM NaF and 250  $\mu\text{M}$   $\text{Na}_3\text{VO}_4$ . VEGFR2 was immunoprecipitated overnight at 4 °C and further incubated for 1.5-2 h at 4 °C with Protein A-Sepharose beads. VEGFR2 immunoprecipitates were washed 3 times with lysis buffer, subjected to SDS-PAGE and Western blotting analysis.

**Transfection and protein analysis in HUVECs.** HUVECs (passage 3 or 4) were seeded at a density of  $1 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup> one day before transfection. Pools of 4 specific DEP-1 (PTPRJ) siRNAs (siGENOME SMARTpool cat no. M-008476-01) and standard siCONTROL #2 or RISC-Free siRNAs (from Upstate/Dharmacon/Millipore) were transfected at a final concentration of 200 nM in DMEM high glucose using Targefect reagents according to the manufacturer's recommendations (Targeting Systems Inc., Santee, CA). Similar results were obtained with either RISC-free control siRNA pool or with the standard control #2 siRNA pool. The DEP-1 #3 (Hs\_PTPRJ\_3\_HP) and AllStars control siRNAs from QIAGEN were also used for some of the experiments. After a 2 h-incubation, cells were rinsed twice in PBS and cultured for 48 h in MCDB-131 medium (Sigma) supplemented with 2.0% FBS, 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  hydrocortisone (Sigma), 10 ng/ml EGF, 15  $\mu\text{g}/\text{ml}$  endothelial cell growth supplement (ECGS) (Upstate/Millipore), 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  heparin sodium salt (Sigma) and 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  gentamycin. HUVECs were next starved for 6 h in MCDB-131 medium containing 1% BSA and 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  gentamycin, with a medium change for the last hour. Cells were then incubated with VEGF (80 ng/ml) or other growth factors at 37°C for the indicated times, washed with PBS and lysed on ice with the 50 mM HEPES pH 7.5 lysis buffer containing 5 mM NaF and 2 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ . Immunoprecipitated proteins or total protein extracts (40-50

µg) were resolved by SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose Hybond-C Extra membranes. Western blotting and ECL detection were then performed according to the manufacturer's recommendations. The Visualizer reagent (Upstate/Millipore) was sometimes used instead of ECL for detection of weak signals such as that of DEP-1. For cDNAs transfections,  $5 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> were plated in 6-cm dishes and transfected the next day with lipofectin according to the manufacturer's recommendations (Invitrogen). Five µg of empty vector (pMT2) or DEP-1 C/S plasmid, or combinations of 5 µg of DEP-1 C/S plasmid and 2 µg of either c-Src or c-Src<sup>Y529F</sup> plasmids were transfected overnight in EBM medium. The transfection medium was then replaced with EGM-2 medium and the cells were stimulated 24 h later at 37 °C with 50 ng/ml of VEGF after a 6 h starvation period in EBM. The full-length DEP-1 C/S human cDNA construct and pMT2 vector, and the WT human Src and Src Y529F constructs (in pCDNA3) were generously provided by Nicholas Tonks (Cold Spring Harbor Laboratories) and Stéphane Laporte (McGill University), respectively.

**In vitro Src kinase assay.** Src immunoprecipitates were washed 3 times with the 50 mM HEPES pH 7.5 lysis buffer containing 5 mM NaF and 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, and once with PBS, before adding the Src peptide substrate with [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP in a Src kinase reaction buffer (Src kinase assay kit from Upstate/Millipore, catalogue no. 17-131). After a 10 min incubation at 30 °C, the phosphorylated peptide was precipitated with 40% TCA, separated from the residual [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP using P81 phosphocellulose paper, and quantified with a scintillation counter.

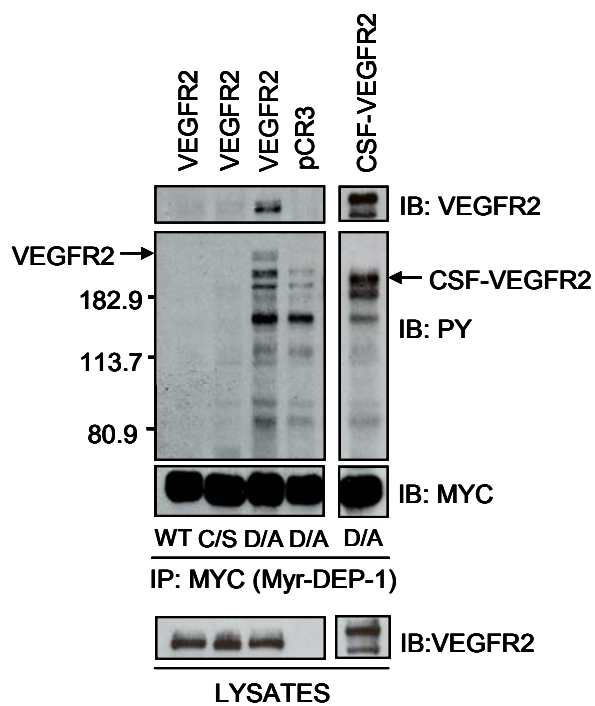
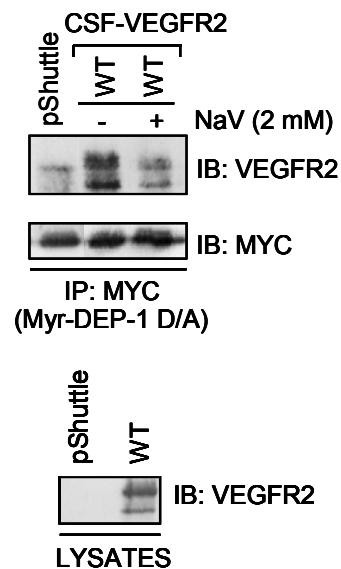
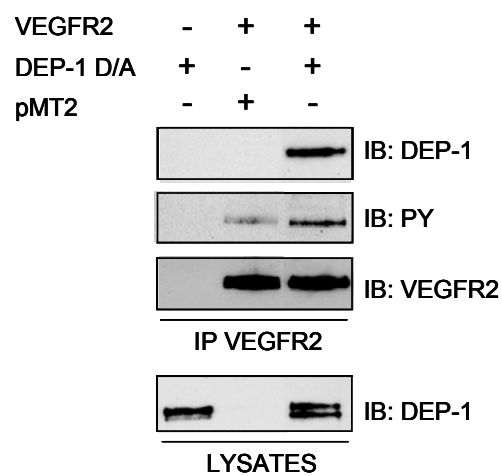
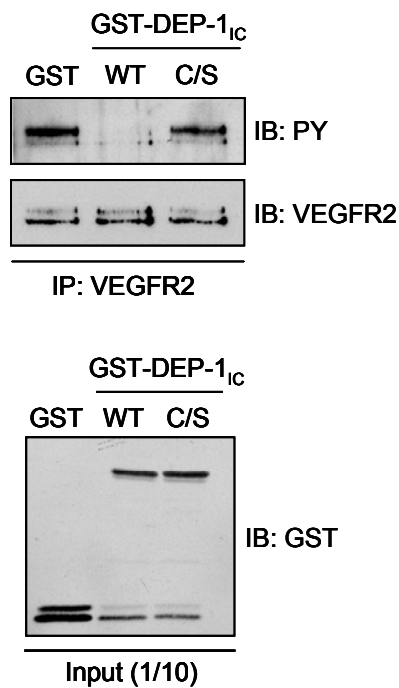
**Cell death evaluation.** HUVECs were transfected with siRNAs as described above. Following treatment, cells were trypsinized and plated at a density of  $3 \times 10^4$ /cm<sup>2</sup> in complemented MCDB131 medium and allowed to adhere for 18 h. The cells were then washed with PBS and incubated for 33 h in EBM containing 2% FBS alone, with VEGF (80 ng/ml), or VEGF (80 ng/ml) with FGF (80 ng/ml) and heparin (5 µg/ml). At the end of this incubation period, floating and trypsin-detached HUVECs were collected and washed once with cold PBS and fixed in 70% cold ethanol (overnight at -20 °C). After fixation, cells were stained for 30 min in PBS with RNase A (200 µg/ml) and

propidium iodide (50  $\mu\text{g/ml}$ ). DNA content was analyzed by fluorescence-activated cell sorting. At least 10 000 events were analyzed. Dead cells were defined as sub-2N DNA-containing cells (sub-G1 peak).

## Results

**DEP-1 targets Y1054/Y1059 in the VEGFR2 kinase activation loop.** Depletion of DEP-1 in VEGF-stimulated confluent endothelial cells results in increased VEGFR2 phosphorylation, suggesting that VEGFR2 is a substrate of DEP-1 (193). However, the specific VEGFR2 tyrosine residues targeted for dephosphorylation, as well as the general consequences on VEGF-induced signaling remain ill-defined. To first confirm that VEGFR2 is a bona fide DEP-1 substrate, we initially investigated the ability of the substrate trapping mutant DEP-1 D1205A (D/A) to interact with VEGFR2. For this purpose, the myristylated and Myc-tagged intracellular portion of DEP-1 D/A (Myr-DEP-1 D/A) was immunoprecipitated from transfected HEK 293 cells and immobilized on protein G-coupled Sepharose beads. The intracellular portions of WT and C1239S (C/S) catalytically inactive mutant were also purified. Lysates of pervanadate-treated HEK 293 cells transfected with vector alone (pCR3) or expressing either full length VEGFR2 or a CSF-VEGFR2 chimera, which encompasses the CSF-1 receptor extracellular domain fused to the transmembrane and intracellular domains of VEGFR2, were then incubated with Myr-DEP-1 D/A-, WT- and C/S-coupled beads. As shown in Figure 1A, VEGFR2 or the CSF-VEGFR2 chimera formed stable complexes with the D/A mutant, but as expected, VEGFR2 did not stably associate with the WT Myr-DEP-1. In identical conditions, the catalytically inactive C/S mutant was unable to trap VEGFR2 or other tyrosine-phosphorylated proteins. The association of CSF-VEGFR2 with the Myr-DEP-1 D/A was blocked by sodium vanadate, a competitive inhibitor of PTPs which interacts with the catalytic site and blocks recognition of substrates, suggesting that VEGFR2 can associate with the active site of DEP-1 (Figure 1B) (149). VEGFR2 could also co-immunoprecipitate with full-length DEP-1 D/A in transfected HEK 293 cells (Figure 1C). This association led to the increased phosphorylation of VEGFR2 when compared to VEGFR2 expressed alone, demonstrating that VEGFR2 was protected from dephosphorylation by this interaction with the D/A substrate trapping mutant. Lastly, in agreement with VEGFR2 being a DEP-1 substrate, incubation of immunoprecipitated VEGFR2 with the intracellular portion of DEP-1 fused to GST (GST-DEP-1<sub>IC</sub>) led to its dephosphorylation, while its phosphorylation

was maintained when incubated with the catalytically inactive C/S mutant (Figure 1D). Thus, altogether, these results demonstrate the functional interaction between VEGFR2 and DEP-1, and together with previous siRNA studies, further validate VEGFR2 as a DEP-1 substrate (193).

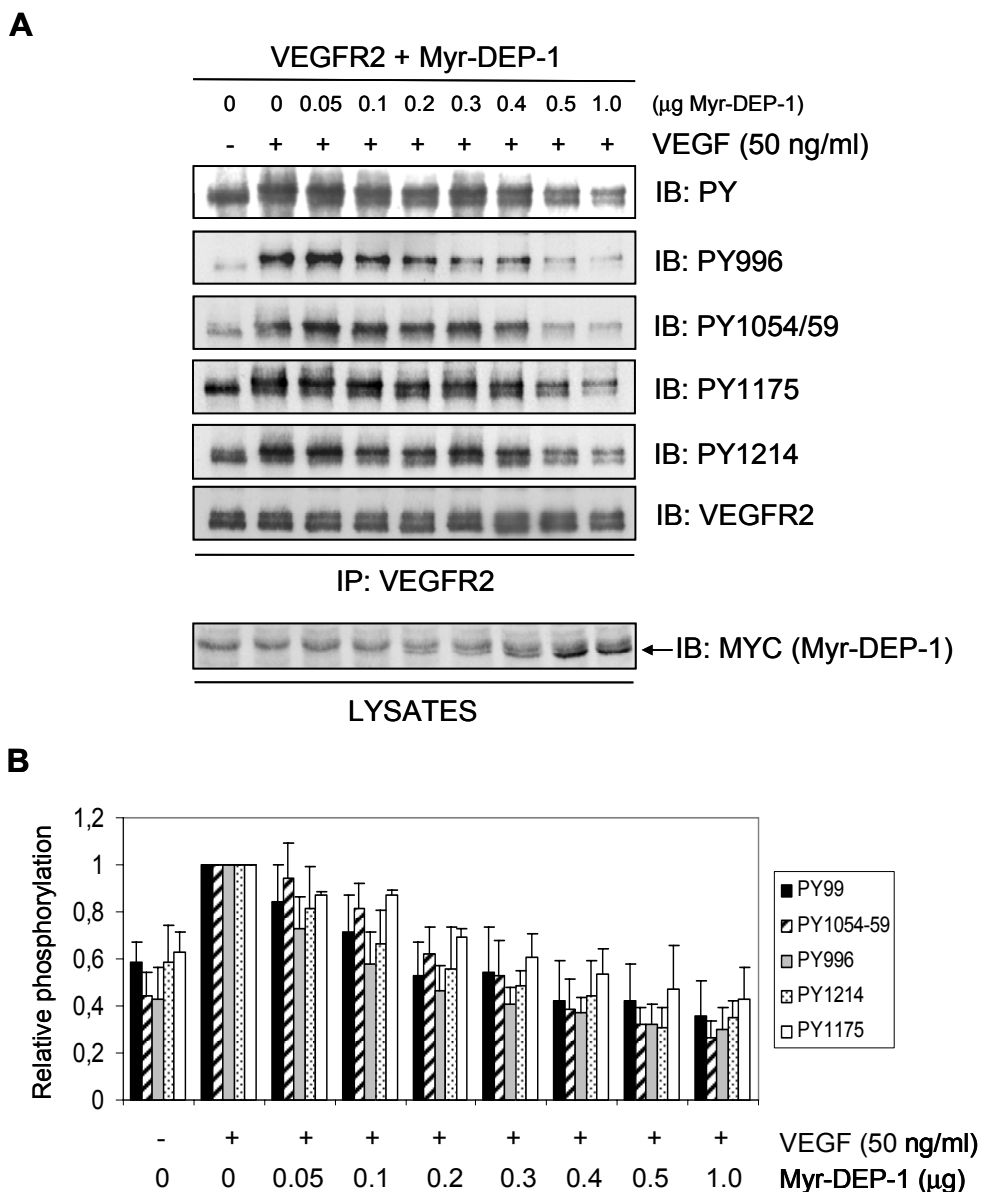
**A****B****C****D**

**Figure 1. VEGFR2 and the CSF-VEGFR2 chimera are substrates of DEP-1.** (A) Lysates of pervanadate-treated HEK 293 cells transfected with vector alone (pCR3), VEGFR2, or the CSF-VEGFR2 chimera were incubated with the Myc-tagged, myristylated intracellular domain of WT DEP-1 (Myr-DEP-1) or the C/S and D/A mutants previously immobilized on protein G-coupled Sepharose beads using the Myc antibody (clone 9E10). Interacting receptors were detected using the VEGFR2 monoclonal antibody (A-3). Immunoblotting (IB) with the Myc antibody revealed similar levels of immunoprecipitated (IP) DEP-1. The upper membrane was stripped and reprobed with the phosphotyrosine monoclonal antibody PY99 (PY) to visualize the complete spectrum of tyrosine-phosphorylated proteins that interacted with DEP- D/A but not with the WT or C/S mutant. Immunodetection of VEGFR2 and CSF-VEGFR2 in lysates (40  $\mu$ g) of pervanadate-treated transfected HEK 293 cells confirmed their similar level of expression in all conditions. (B) Addition of the PTP competitive inhibitor sodium vanadate (NaV; 2 mM) to the substrate trapping reaction blocks the interaction of CSF-VEGFR2 with the Myr-DEP-1 D/A mutant. (*pShuttle*; empty vector) (C) VEGFR2 was immunoprecipitated from lysates of HEK 293 cells transfected with full-length DEP-1 D/A alone, or with VEGFR2 co-transfected with either vector alone (pMT2) or DEP-1 D/A. The co-precipitation of DEP-1 D/A with VEGFR2 was detected by Western blotting using the DEP-1 antibody, while the tyrosine phosphorylation of VEGFR2 was revealed using the phosphotyrosine antibody PY99 (PY). Immunodetection of immunoprecipitated VEGFR2 and of DEP-1 D/A in total cell lysates confirmed their similar levels of expression. (D) VEGFR2 was immunoprecipitated from transfected HEK 293 cells stimulated with VEGF (50 ng/ml) for 5 min. Immunoprecipitates were incubated with GST or GST-DEP-1<sub>IC</sub> fusion proteins encompassing the intracellular domain of WT DEP-1 or C/S mutant. The VEGFR2 tyrosine phosphorylation level was detected using the phosphotyrosine antibody PY99 (PY). Immunoblotting with VEGFR2 and GST antibodies shows equal levels of immunoprecipitated VEGFR2 and GST fusion proteins added to the dephosphorylation reaction.

The PDGF- $\beta$  and Met/HGF receptors have been identified as DEP-1 substrates (183, 237). In these particular cases, DEP-1 dephosphorylates specific tyrosine residues previously recognized as mediators of proliferation and morphogenesis, respectively. To define the impact of DEP-1 on VEGFR2 function, we initially investigated if DEP-1 had specificity towards any major VEGFR2 autophosphorylation sites. For this, HEK 293 cells were co-transfected with VEGFR2 (20  $\mu$ g) and increasing amounts of WT Myr-DEP-1 (0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, and 1  $\mu$ g), similarly to what had been done for Met (237). Figure 2 shows that in contrast to the PDGF- $\beta$  and Met/HGF receptors, VEGFR2 tyrosine phosphorylation was globally attenuated by DEP-1. Thus, a gradual and simultaneous decrease in the level of phosphorylation of all major



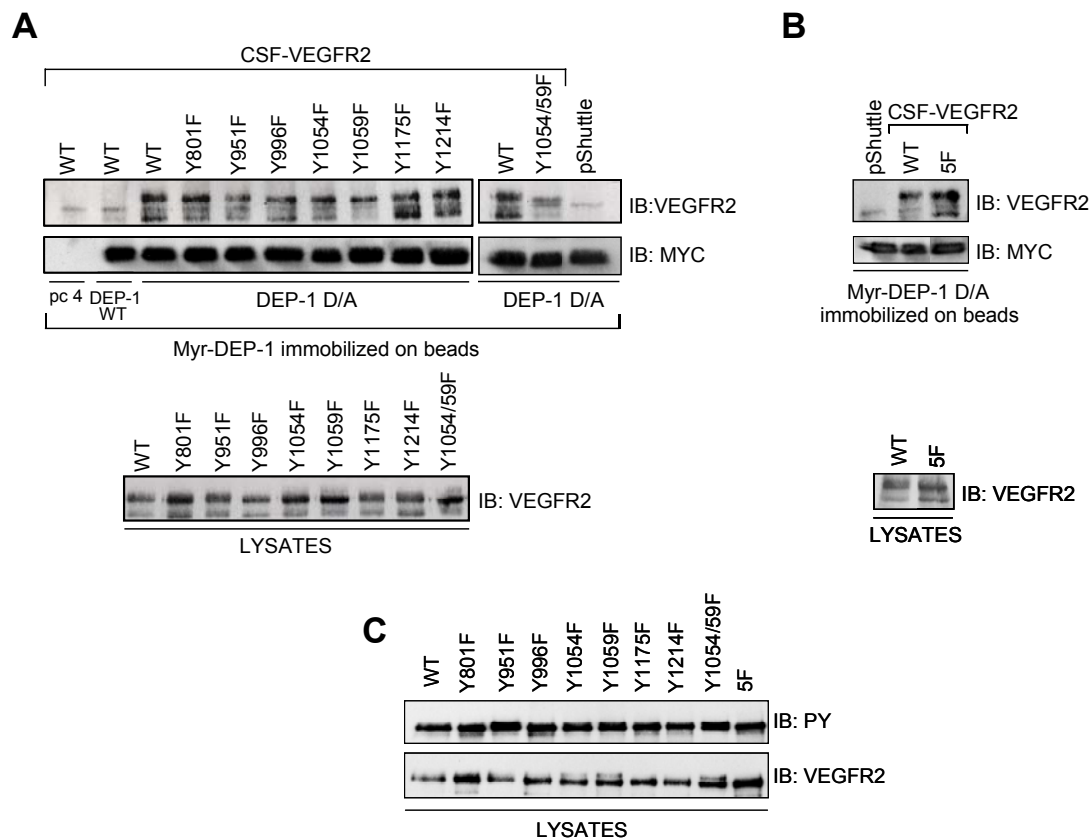
autophosphorylation sites tested was observed as the expression of Myr-DEP-1 increased, including that of Y996 in the kinase insert domain (Y951 was not phosphorylated in HEK 293 cells), Y1054/Y1059 in the kinase activation loop, and Y1175 and Y1214 in the C-terminus tail. Quantification of the results from 5 independent experiments confirmed this interpretation (Figure 2B). It further reveals that as the phosphorylation level of Y1054/Y1059 progressively decreases, the phosphorylation of Y996, Y1214 and Y1175 decreases proportionally, while maintaining the same differential phosphorylation ratios that are also similarly observed in unstimulated quiescent cells. These results therefore suggest that the autoactivation residues Y1054 and Y1059 are targeted by DEP-1, and that this results in the inhibition of kinase activity and the consequent general dephosphorylation of VEGFR2.



**Figure 2. DEP-1 leads to the global dephosphorylation of VEGFR2.** (A) HEK 293 cells were transfected with 20  $\mu\text{g}$  of VEGFR2 cDNA and increasing amounts of WT Myr-DEP-1 cDNA. Cells were serum-starved, stimulated with VEGF (50 ng/ml) for 2 min, and lysed. VEGFR2 was immunoprecipitated (IP) (C-1158 antibody) and its global phosphorylation revealed using the phosphotyrosine antibody PY99 (PY). The phosphorylation level of Y996, Y1054/1059, Y1175 and Y1214 was detected by immunoblotting (IB) with phosphospecific VEGFR2 antibodies. Membranes were stripped and immunoblotted with the VEGFR2 antibody (A-3) to show constant level of immunoprecipitated VEGFR2 (one representative blot shown). Lysates of transfected HEK 293 cells (40  $\mu\text{g}$ ) were immunoblotted with the Myc antibody (9E10 clone) to detect increasing Myr-DEP-1 expression levels. (B) Results obtained from 5

independent experiments were quantified using the Bio-Rad Quantity One analysis software. The relative phosphorylation intensity of each VEGFR2 phosphotyrosine residue was determined and normalized according to the amount of VEGFR2 immunoprecipitated in each condition.

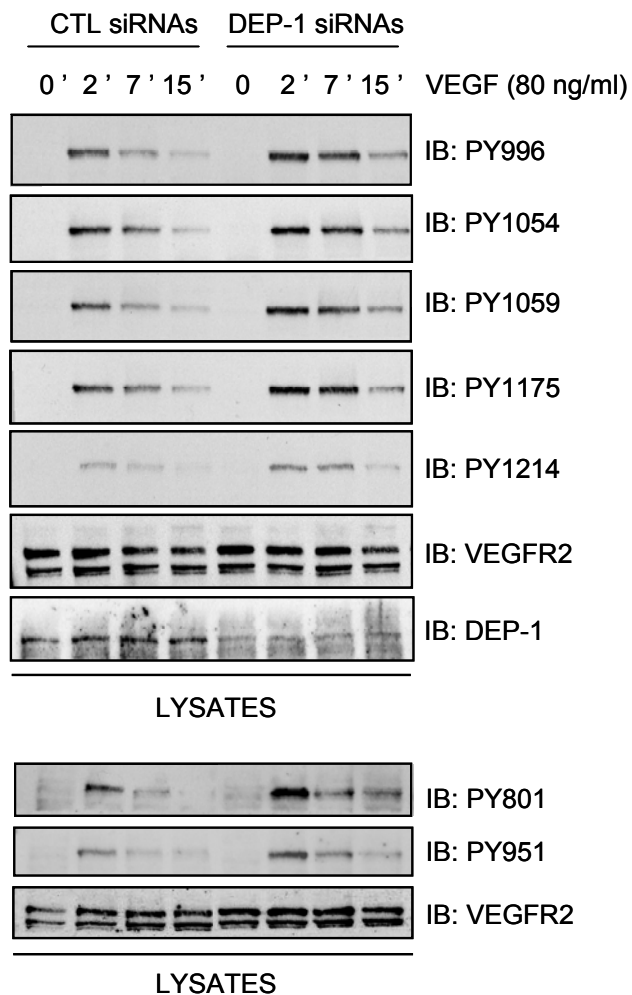
To validate this hypothesis, we next evaluated the ability of Myr-DEP-1 D/A to trap various CSF-VEGFR2 mutants encompassing either single Y/F mutations of every major autophosphorylation sites, the double Y1054F/Y1059F mutation, or 5 Y/F mutations corresponding to all major autophosphorylation sites except Y1054 and Y1059 (5F mutant; Y801F, Y951F, Y996F, Y1175F, Y1214F) (Figure 3). Lysates of pervanadate-treated and CSF-1 stimulated HEK 293 cells transfected with vector alone (pShuttle) or expressing CSF-VEGFR2 WT and mutants were incubated with Myr-DEP-1 D/A previously immobilized on beads. Lysates of cells expressing WT CSF-VEGFR2 were also incubated with beads coupled or not to WT DEP-1 as negative controls. Results show that Myr-DEP-1 D/A retained the ability to trap all single Y/F mutants; slight variations in recovery observed between some of the single mutants were not considered significant. However, Myr-DEP-1 D/A clearly failed to efficiently trap the Y1054/1059F double mutant, suggesting that the autoactivation loop tyrosines were recognized by the DEP-1 catalytic site (Figure 3A). Conversely, Myr-DEP-1 D/A could still trap the 5F mutant which retains the Y1054 and Y1059, but not any of the other major autophosphorylation sites (Figure 3B). Importantly, the phosphorylation levels of all mutants were similar in these experiments, confirming that the decreased association of the VEGFR2 Y1054F/Y1059F mutant with Myr-DEP-1 D/A was due to the loss of these tyrosine residues, and not because it was less phosphorylated overall compared to other mutants (Figure 3C). Collectively, these data thus support a model where the VEGFR2 autoactivation residues are targeted by DEP-1, resulting in the simultaneous dephosphorylation of all autophosphorylation sites.



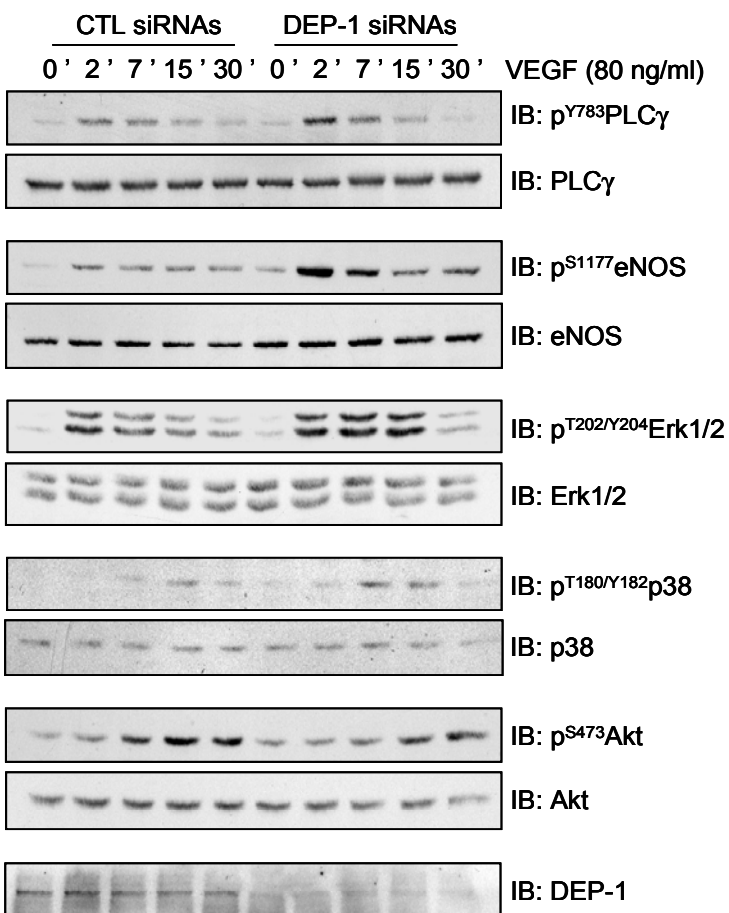
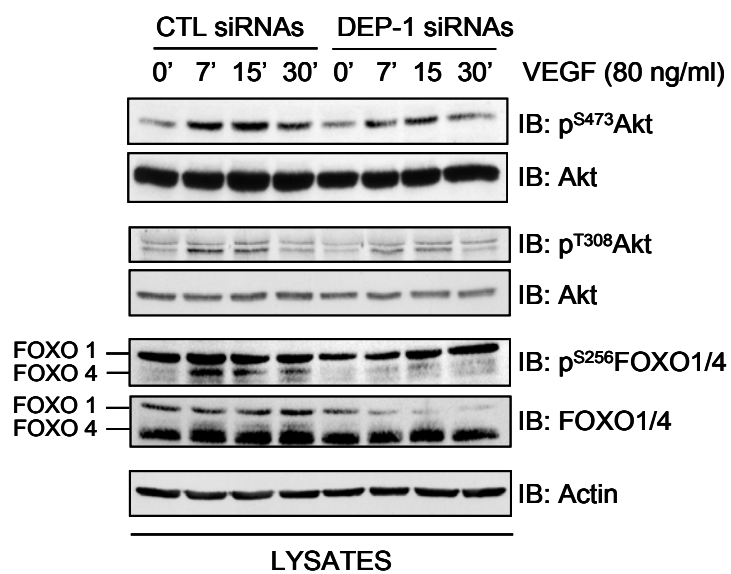
**Figure 3. DEP-1 D/A traps VEGFR2 via tyrosine residues in the activation loop.**

(A) HEK 293 cells were transfected with empty vector (pShuttle) or cDNA constructs encoding the WT CSF-VEGFR2, single Y/F mutants of every major VEGFR2 autophosphorylation sites, and the double Y1054/1059F mutant. Following treatment of the cells with pervanadate and stimulation with CSF-1 (50 ng/ml) for 5 min, cells were lysed and incubated with Myr-DEP-1 D/A immobilized on protein G-coupled Sepharose beads as described in Materials and Methods. As negative controls, cell lysates expressing WT CSF-VEGFR2 were also incubated with beads alone (*pc4*; pCDNA4 transfected cells), or with WT Myr-DEP-1 coupled beads. The trapped receptors were immunodetected with VEGFR2 (A3) antibody on the upper part of the membrane while equal amounts of immunoprecipitated (IP) Myr-DEP-1 were detected with the Myc (9E10 clone) antibody. The lower panel shows similar amounts of WT and mutant CSF-VEGFR2 expressed in HEK 293 cell lysates (40  $\mu$ g). (B) The same substrate trapping experiment was performed using the CSF-VEGFR2 5F mutant, harboring the Y801F, Y951F, Y996F, Y1175F and Y1214F mutations. (C) The phosphorylation status of the CSF-VEGFR2 mutants under the experimental conditions used for the trapping experiments was determined. Note the similar levels of tyrosine phosphorylation of the various mutants.

**Silencing of DEP-1 in confluent endothelial cells leads to the increased phosphorylation of all major VEGFR2 autophosphorylation sites, but differentially affects VEGF-induced signaling pathways.** If DEP-1 is involved in the global dephosphorylation of VEGFR2, the depletion of DEP-1 should then lead to the overall increase of VEGFR2 phosphorylation and activation of downstream signaling cascades. To test this hypothesis, the phosphorylation of VEGFR2 was investigated in DEP-1-depleted endothelial cells. Confluent HUVECs were transfected with control or DEP-1 siRNA pools and the VEGF-induced phosphorylation of all major autophosphorylation sites evaluated at the indicated times using phospho-specific antibodies (Figure 4). As postulated, the phosphorylation of every tyrosine residue tested (Y801, Y951, Y996, Y1054, Y1059, Y1175, Y1214) was similarly increased in DEP-1-depleted cells, as early as 2 min and up to 15 min post-stimulation. Our results thus show that DEP-1 regulates global VEGFR2 phosphorylation, suggesting that DEP-1 could regulate a broad range of VEGFR2-dependent signaling pathways. To investigate this, lysates of HUVECs treated as above were probed with phospho-specific antibodies recognizing the active forms of major enzymes known to be stimulated in response to VEGF. Consistently, with kinetics similar to those observed for the increased phosphorylation of VEGFR2, the phosphorylation of PLC $\gamma$ , eNOS, ERK1/2 and p38 was upregulated in DEP-1-depleted cells compared to control cells (Figure 5A). Surprisingly however, the phosphorylation of Akt (on S473 and T308) was consistently impaired in DEP-1-depleted cells (Figure 5A, 5B). Moreover, the phosphorylation of the Akt substrates FOXO1/4, which are involved in the regulation of cell survival, was also reduced by the depletion of DEP-1 (Figure 5B). Thus, although VEGFR2 autophosphorylation sites known to be involved in the activation of all of these pathways were upregulated in DEP-1-depleted cells (32, 233), this did not translate into the enhancement of VEGF-dependent Akt activation.



**Figure 4. Depletion of DEP-1 leads to the global increase in tyrosine phosphorylation of VEGFR2.** HUVECs transfected with control (CTL) or DEP-1 siRNAs were incubated in full medium for 48 h, after which time, cells were starved for 6 h and then stimulated with VEGF (80 ng/ml) for the indicated times. Cell lysates (50  $\mu$ g) were immunoblotted (IB) on different membranes with VEGFR2 (clone A3) or phosphospecific VEGFR2 antibodies. The depletion of DEP-1 was confirmed by immunoblotting the cell lysates with the DEP-1 antibody. The last 3 panels are from an independent experiment.

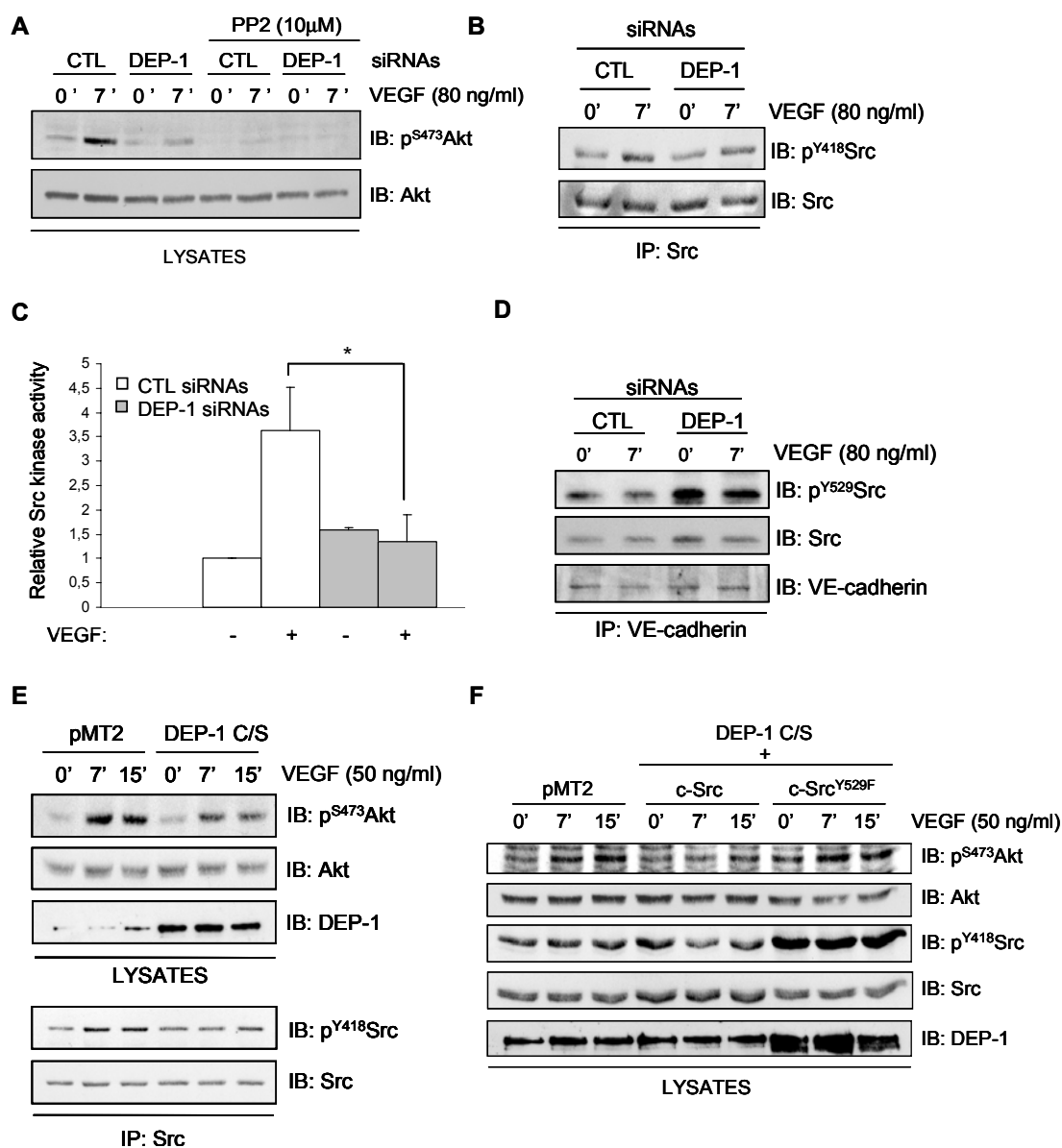
**A****B**

**Figure 5. Depletion of DEP-1 does not lead to the general enhancement of VEGF-dependent signaling.** (A and B) Confluent HUVECs were transfected and treated as in Figure 4. Phosphorylation of PLC $\gamma$ , eNOS, ERK1/2, p38, Akt (S473 and T308 phosphorylation), and FOXO1/4 was evaluated by immunoblotting (IB) cell lysates (40  $\mu$ g) with phosphospecific antibodies. The membrane sections were stripped and blotted with the corresponding antibodies to show equal protein loadings. The depletion of DEP-1 was confirmed by immunoblotting the cell lysates with the DEP-1 antibody. Blots shown in A and B are from independent experiments.

**DEP-1 mediates VEGF-dependent Akt activation through the Src-dependent tyrosine phosphorylation of Gab1 and associated PI3K.** The phosphorylation of the scaffolding adapter Gab1 by Src kinases and its association with PI3K has been reported to mediate Akt activation in VEGF-stimulated microvascular endothelial cells and HUVECs (69, 194). Since DEP-1 is able to dephosphorylate the inhibitory Y529 and activate Src (195), we hypothesized that the inhibition of Akt in the absence of DEP-1 could be a direct consequence of reduced Src activation and Gab1 phosphorylation. As initial support for this hypothesis, we found that incubation of HUVECs with the Src family kinase inhibitor PP2 led to the complete block of Akt phosphorylation on S473 in response to VEGF stimulation, demonstrating that in VEGF-stimulated HUVECs, Akt activation is Src kinase-dependent (Figure 6A). To then determine if Src activity was regulated by DEP-1, total cellular Src was immunoprecipitated from control and DEP-1-depleted cells stimulated or not with VEGF. Immunoblot analysis using the p<sup>Y418</sup>Src antibody revealed that Src was less phosphorylated in DEP-1-depleted cells (Figure 6B). Consistently, the ability of immunoprecipitated Src to phosphorylate a Src-specific peptide substrate was decreased in VEGF-stimulated DEP-1-depleted cells, demonstrating that the reduced phosphorylation of Y418 correlated with a strong inhibition of Src kinase activity (1.3 fold-induction over unstimulated control cells compared to a 3.6-fold induction in VEGF-stimulated control cells) (Figure 6C). However, we were not able to see modulations of the phosphorylation of Y529 on total Src between control and DEP-1-depleted cells. Since DEP-1 localizes at cell-cell junctions in endothelial cells, and that the VE-cadherin-associated pool of Src represents an important fraction of activated Src in response to VEGF (128, 142, 237, 283), we investigated the phosphorylation of Y529



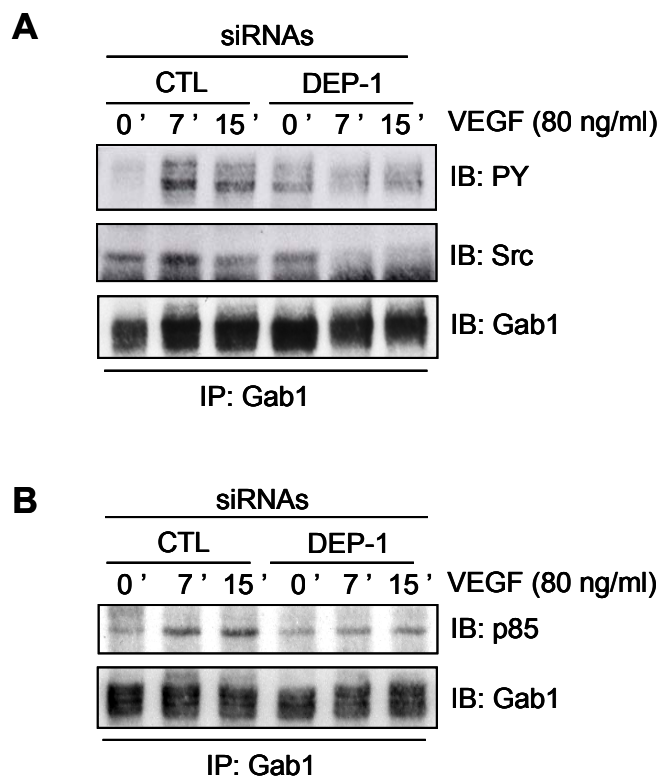
of VE-cadherin-associated Src. Figure 6D shows that the depletion of DEP-1 greatly enhanced Y529 phosphorylation of this pool of Src, consistent with the observed reduction of Src kinase activity in VEGF-stimulated DEP-1-depleted cells. These data demonstrate that DEP-1 contributes to the activation of Src in endothelial cells, presumably by dephosphorylating the Y529 inhibitory residue of Src associated with VE-cadherin complexes. Moreover, these results also strongly suggest that reduced Src activity, resulting from the depletion of DEP-1, is responsible for the decreased Akt activation in response to VEGF stimulation. To further prove the role of DEP-1 and Src in VEGF-mediated Akt activation, the DEP-1 C/S catalytically inactive mutant was expressed in HUVECs. Results from Figure 6E show that Src and Akt were concomitantly inhibited upon VEGF-stimulation of these cells, compared to their activation in control cells transfected with empty vector (pMT2). Importantly, co-expression of the constitutively active Src Y529F mutant with DEP-1 C/S was able to rescue Akt activation upon VEGF stimulation (Figure 6F). These data therefore convincingly demonstrate that DEP-1 is required for full Src activation in VEGF-stimulated cells, and that this is essential for the optimal activation of Akt.



**Figure 6. Src activity is required for VEGF-dependent Akt activation and is impaired in DEP-1-depleted cells.** (A) Control (CTL) and DEP-1-depleted HUVECs were pre-incubated with DMSO or PP2 (10  $\mu$ M) for 1 h and then stimulated or not with VEGF (80 ng/ml) for 7 min. Phosphorylation of Akt was determined by immunoblotting (IB) cell lysates (40  $\mu$ g) with the p<sup>S473</sup>Akt antibody. (B) Src was immunoprecipitated (IP) from lysates of control and DEP-1-depleted HUVECs stimulated or not with VEGF (80 ng/ml) for the indicated times. Activation of Src was detected by immunoblotting with the phosphospecific antibody recognizing p<sup>Y418</sup>Src. (C) The kinase activity of Src immunoprecipitated from control and DEP-1-depleted cells, stimulated or not with VEGF (80 ng/ml), was evaluated by an in vitro assay.

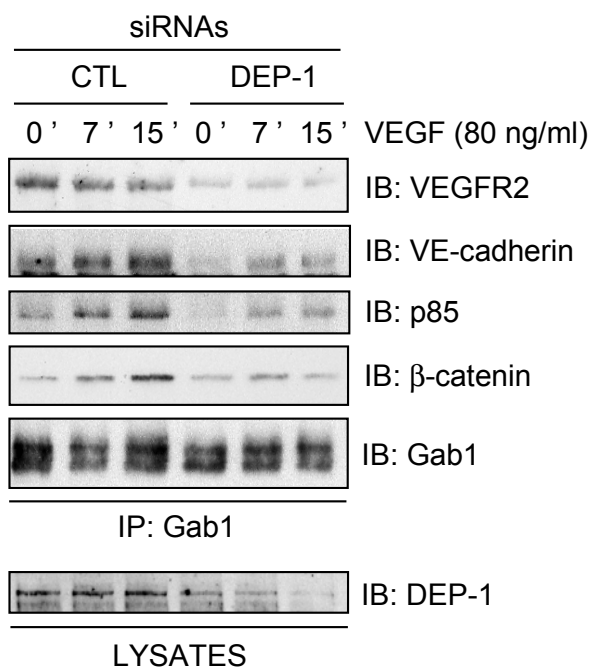
Results are representative of 3 independent experiments and are expressed as ratios of activity ( $\pm$ SD) relative to the unstimulated control cells. (\* $p < 0,05$ ) (D) The phosphorylation of Y529 of Src co-precipitating with VE-cadherin was determined in control and DEP-1-depleted cells stimulated or not with VEGF (80 ng/ml). (E) The VEGF-induced activation of Akt (pS473) and Src (pY418) in HUVECs transfected with empty vector (pMT2) or catalytically inactive DEP-1 C/S was determined on total cell lysates and immunoprecipitated Src, respectively. (F) WT or constitutively active Src (Y529F) were co-transfected with DEP-1 C/S in HUVECs. The activation of Akt (pS473) in response to VEGF stimulation (50 ng/ml) was detected on total cell lysates.

Based on this, we next investigated if the Src-dependent phosphorylation of Gab1 was also defective in DEP-1-depleted cells, thus explaining Akt inhibition. The level of Gab1 tyrosine phosphorylation and its ability to associate with signaling proteins were therefore evaluated in VEGF-stimulated DEP-1-depleted cells (Figure 7). Significantly, the tyrosine phosphorylation of immunoprecipitated Gab1 was inhibited in DEP-1-depleted cells (Figure 7A). The ability of Gab1 to associate with Src in response to VEGF was also reduced, suggesting that in addition to the inhibition of Src activity in VEGF-stimulated DEP-1-depleted cells, this impaired ability of Src to associate with Gab1 may also contribute to the decreased Gab1 tyrosine phosphorylation (Figure 7A). Importantly, the ability of hypophosphorylated Gab1 to associate with the p85 subunit of PI3K was greatly reduced in these cells (Figure 7B). Overall, these experiments show that the depletion of DEP-1 results in the suboptimal Src activation in response to VEGF stimulation, the ensuing reduced Gab1 phosphorylation and association with Src and PI3K, and the consequent downregulation of Akt activation.



**Figure 7. Depletion of DEP-1 interferes with the Src-sensitive tyrosine phosphorylation of Gab1 and its association with Src and PI3K in response to VEGF stimulation.** (A) HUVECs were treated as in Figure 4. The phosphorylation of immunoprecipitated (IP) Gab1 and its association with Src were assessed by immunoblotting (IB) with the phosphotyrosine PY99 and Src antibodies. The level of immunoprecipitated Gab1 was shown after membrane stripping and re-blotting with the Gab1 antibody. (B) The association of immunoprecipitated Gab1 with the p85 subunit of PI3K as well as the level of Gab1 were determined by immunoblotting with the p85 and Gab1 antibodies, respectively.

Carmeliet et al. reported that the formation of a complex between VEGFR2, VE-cadherin,  $\beta$ -catenin and PI3K is required for Akt activation and the survival of endothelial cells (54). Since Gab1 associates with PI3K, VEGFR2, and mediates VEGF-induced Akt activation (194), we investigated if Gab1 was also part of this complex in HUVECs. Figure 8 shows that immunoprecipitated Gab1 associates with PI3K,  $\beta$ -catenin, VE-cadherin and VEGFR2, strongly suggesting that Gab1 mediates the association of PI3K to the VEGFR2/VE-cadherin complex in response to VEGF stimulation. However, the association of Gab1 with all of these proteins was impaired by the depletion of DEP-1. Collectively, these experiments reveal an essential and unsuspected role for DEP-1 as a mediator of VEGF-induced Gab1 tyrosine phosphorylation and downstream Akt activation in endothelial cells. In addition, our observations also underscore the ability of Gab1 to associate with the VEGFR2/VE-cadherin complex, and show that this event is positively regulated by DEP-1.



**Figure 8. Gab1 associates with VEGFR2/VE-cadherin complexes and this is impaired in DEP-1-depleted HUVECs.** Control (CTL) and DEP-1-depleted HUVECs were stimulated with VEGF (80 ng/ml) for the indicated times. Gab1 was immunoprecipitated (IP) from the cell lysates and its association with p85,  $\beta$ -catenin, VE-cadherin and VEGFR2 detected by immunoblotting (IB) with the corresponding antibodies. Equal immunoprecipitated Gab1 levels were detected using the Gab1 antibody. The depletion of DEP-1 was confirmed by immunoblotting the cell lysates with the DEP-1 antibody (Lower panel).

**Depletion of DEP-1 impairs endothelial cell survival promoted by VEGF.** Akt is essential for VEGF-mediated cell survival (54, 107, 118). The decrease of Akt activation observed in VEGF-stimulated DEP-1-depleted cells suggests that VEGF will not be as efficient in protecting these cells from cell death under starvation conditions. To test this, control and DEP-1-depleted HUVECs seeded on gelatin-coated plates were incubated in EBM supplemented with FBS 2% only, in the absence or presence of VEGF for 33 h. At the end of this incubation, cells were collected, stained with propidium iodide, and the DNA content was analyzed by fluorescence-activated cell sorting (FACS). Cell death was quantified by the percentage of hypodiploid cells



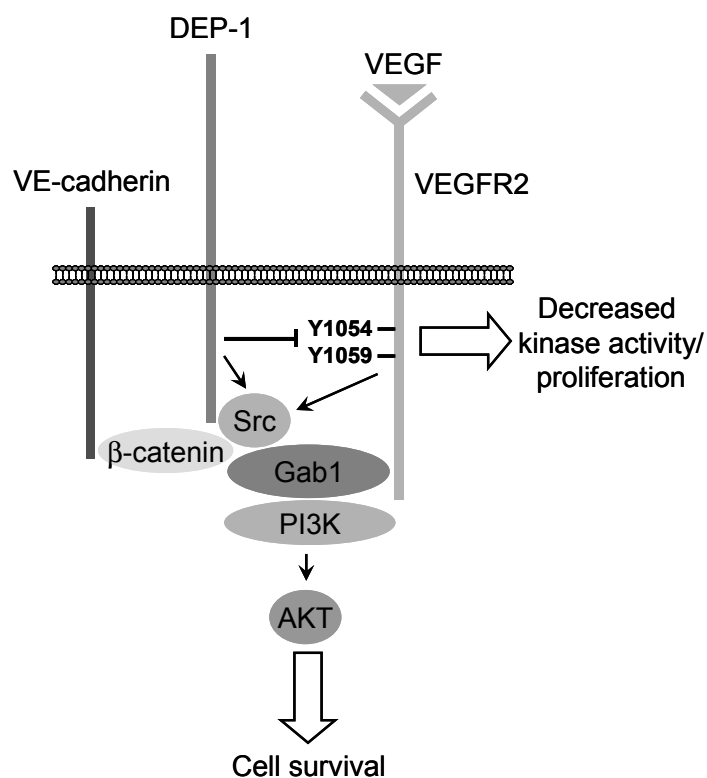
**Figure 9. The depletion of DEP-1 promotes endothelial cell death in response to VEGF and FGF.** (A) Control (CTL) and DEP-1-depleted HUVECs were incubated for 33 h in EBM containing 2% FBS alone (-), with VEGF (80 ng/ml), or VEGF (80 ng/ml) with FGF (80 ng/ml) and heparin (5  $\mu$ g/ml) (VEGF+FGF), as described in Materials and Methods. Collected cells were stained with propidium iodide and prepared for FACS analysis to determine the percentage of dead cells (sub-G1 peak) in the various conditions. Results representative of 5 independent experiments are expressed as ratios of cell death ( $\pm$ SD) observed in control or DEP-1-depleted cells grown with survival factors, relative to their corresponding starved cell population. (\* $p < 0,0005$ ; \*\* $p < 0,005$ ) (B) DEP-1 is involved in Src and Akt activation in response to FGF. Src was immunoprecipitated (IP) from lysates of control and DEP-1-depleted HUVECs stimulated with VEGF (80 ng/ml) or FGF (50 ng/ml) plus heparin (5  $\mu$ g/ml) (Upper panels). Src activation was determined by immunoblotting (IB) with the p<sup>Y418</sup>Src antibody. Akt activation was determined by immunoblotting lysates of control and DEP-1-depleted cells with p<sup>S473</sup>Akt antibodies (Lower panels).

## Discussion

The *in vivo* functional inactivation of DEP-1 following the substitution of its intracellular catalytic domain with GFP leads to impaired vascularization characterized by increased proliferation of endothelial cells and defective remodelling and branching. (285). Since VEGFR2-dependent pathways are essential for proper vascular development, these studies suggested that part of the observed phenotype was due to their defective regulation in the absence of functional DEP-1. An elegant study by Lampugnani et al. supported this interpretation and further proposed that DEP-1, which co-localizes with cell-cell junctions, was involved in the VE-cadherin-mediated cell contact inhibition, via the dephosphorylation of VEGFR2 and inhibition of the proliferative ERK1/2 pathway in confluent endothelial cells (193). However, despite the connection made, no direct interaction between VEGFR2 and DEP-1 was described, and the broad consequences of DEP-1 expression on VEGF-stimulated endothelial cells remained undefined. In this paper, we show that VEGFR2 and DEP-1 physically associate via the catalytic site of DEP-1. Our findings support the view that VEGFR2 tyrosine residues in the activation loop are targeted by DEP-1, and that this results in reduced kinase activation and the consequent general decrease of VEGFR2 autophosphorylation. Conversely, the depletion of DEP-1 leads to the overall increased



phosphorylation of VEGFR2, as early as 2 min post-VEGF stimulation, but unexpectedly, not to the overall stimulation of VEGF-dependent signaling. Our major finding is that DEP-1 is a positive regulator of VEGF-induced Src and Akt activation, as well as of endothelial cell survival. We show that this is most likely due to the essential function of DEP-1 in allowing the Src kinase-dependent phosphorylation of the Gab1 adapter, which was previously shown to mediate Akt activation in VEGF-stimulated endothelial cells, through its ability to associate with PI3K (See model, Figure 10) (69, 194).



**Figure 10. Model.** Expression of DEP-1 at cell-cell adhesions of endothelial cells attenuates VEGFR2 kinase activity and VEGF-mediated endothelial cell proliferation, but positively contributes to the recruitment of Gab1 to the VEGFR2/VE-cadherin complex, and to the activation of Src and the ensuing phosphorylation of Gab1. This results in the induced association of PI3K to Gab1, and the optimal activation of Akt and endothelial cell survival in response to VEGF.

Consistently, in DEP-1-depleted cells, hypophosphorylated Gab1 no longer associates with PI3K, Src and other components of the VE-cadherin complex. Our work thus importantly reveals that through DEP-1-mediated Src activation, phosphorylated Gab1 recruits PI3K to the VE-cadherin,  $\beta$ -catenin and VEGFR2 complex previously shown to allow Akt activation and endothelial cell survival (54).

Previous work by Lampugnani and colleagues suggested that VE-cadherin-dependent inhibition of cell growth was mediated via the dephosphorylation of VEGFR2 by DEP-1 at cell-cell junctions where both have been reported to associate (35, 54, 193). Since VE-cadherin function has also been associated with the ability of VEGF to promote endothelial cell survival (54), this led to the idea that as cells reached confluence, DEP-1 might specifically dephosphorylate VEGFR2 autophosphorylation sites involved in ERK1/2 activation and proliferation, but not those involved in Akt activation and survival. Thus, in a manner analogous to the targeted dephosphorylation of the PDGF- $\beta$  and Met/HGF receptors by DEP-1 (183, 237), specific dephosphorylation of VEGFR2 would explain the opposite regulation of VE-cadherin on cell proliferation and survival. What our study has shown is that there is indeed a differential regulation of ERK1/2 and Akt activation by DEP-1 in endothelial cells. DEP-1 down-regulates VEGF-mediated ERK1/2 activation, as well as that of PLC $\gamma$ , p38, and eNOS, but surprisingly, positively regulates Akt activation. However, this is not dictated by a differential dephosphorylation of VEGFR2 by DEP-1. Our experiments involving DEP-1 overexpression, the trapping of VEGFR2 Y/F mutants, or the impact of DEP-1 siRNAs on VEGFR2 phosphorylation collectively suggest that DEP-1 induces global VEGFR2 dephosphorylation via the preferential dephosphorylation of Y1054 and Y1059 in the activation loop. In fact, an in-depth analysis of VEGF-dependent signaling in DEP-1-depleted cells rather reveal that inhibition of Src, which has also been identified as a DEP-1 substrate (195), is more likely responsible for the inhibition of Akt. First, we found that the direct inhibition of Src kinases by PP2 was sufficient to block Akt activation in response to VEGF. In addition, the phosphorylation of Src on Y418 and its dephosphorylation on inhibitory Y529 were both found to be impaired in DEP-1-depleted cells, consistent with the observed inhibition of its kinase activity at times when Akt activation was also reduced.

Lastly, expression of the catalytically inactive DEP-1 C/S mutant in VEGF-stimulated HUVECs was also shown to lead to the concomitant inhibition of Src and Akt phosphorylation on Y418 and S473, respectively, and co-expression of the constitutively active Src mutant (Y529F) was shown to rescue Akt phosphorylation. These results are therefore consistent with the reported ability of DEP-1 to activate Src kinases via dephosphorylation of the inhibitory C-terminal Y529 (195, 348), and hence, strongly support Src as a DEP-1 substrate in endothelial cells. We further showed that the phosphorylation of the Gab1 adapter, which is PP2-sensitive and required for the optimal VEGF-dependent activation of Akt (69, 194), was also blocked in DEP-1-depleted cells. Altogether, these data thus reveal a new role for DEP-1 as an important mediator of VEGF-induced activation of Src, Gab1, PI3K, Akt, and consequently, of endothelial cell survival. Given that Src is upstream of Akt activation in many cell systems, DEP-1 could represent a major mediator of cell survival in various cellular contexts. Consistent with this idea, we have shown that DEP-1 is also required for the optimal FGF-mediated activation of Src, Akt and endothelial cell survival.

Activation of other Src-dependent signaling pathways involved in survival might also be affected in DEP-1-depleted cells and contribute to the promotion of cell death. The activation of Src by DEP-1 was actually reported to increase cell adhesion and FAK tyrosine phosphorylation (195), and the Src-dependent phosphorylation of FAK has been associated with a VEGF-induced survival response (1). In this context, the depletion of DEP-1 in HUVECs could then also lead to weaker cell-substratum adhesion and FAK phosphorylation, and therefore contribute to the defective Akt activation and survival of these cells upon starvation (1, 104, 147). Since Gab1 is a major mediator of the PI3K/Akt pathway that is also phosphorylated by Src kinases in VEGF-stimulated HUVECs (69), our results nevertheless strongly support Gab1 as a key contributor to the activation of this essential survival pathway. Importantly, we show for the first time that Gab1 associates with VE-cadherin and  $\beta$ -catenin complexes, which have been shown to associate with VEGFR2 and mediate Akt activation and endothelial cell survival in response to VEGF (54). Moreover, our work reveals that DEP-1 may also modulate activation of this pathway by regulating the ability of Gab1 to associate with these complexes. Thus, the correlation between activation of Akt, cell

survival, and the ability of Gab1 to associate with PI3K, Src,  $\beta$ -catenin, VE-cadherin, and VEGFR2 strongly argues in favour of a role for the Gab1 adapter in allowing the recruitment of PI3K to these VE-cadherin/VEGFR2 complexes. The underlying mechanism involved in the formation and regulation of these complexes however remains to be defined. Since the regulation of cell-cell adhesion is mediated via the Src-dependent phosphorylation of proteins such as  $\beta$ -catenin and p120catenin, which are potential DEP-1 substrates, and that DEP-1 associates with  $\beta$ -catenin and co-localizes to these junctions, it is interesting to consider that the depletion of DEP-1 in endothelial cells might also result in their altered phosphorylation and function (35, 142, 237). Future work will be required to determine if such events contribute to the impaired formation of this important signaling complex in DEP-1-depleted cells, which altogether would further amplify the block of Akt activation and survival in response to VEGF.

Interestingly, the phosphorylation of the Akt substrate eNOS on S1177 was found to be increased in DEP-1-depleted cells, even though Akt activation was impaired, as demonstrated by the decreased phosphorylation of both S473 and T308, and the decreased phosphorylation of other Akt substrates, FOXO1/4 (110, 211, 221). However, calcium, PKA, and PKC have also been reported to phosphorylate eNOS on S1177 in response to various stimuli (81, 111, 223). Similarly, we have found that a PKC inhibitor, Rottlerin, leads to the inhibition of eNOS phosphorylation without affecting that of Akt (data not shown), demonstrating that this mechanism of eNOS phosphorylation is also active in VEGF-stimulated HUVECs. The role of alternate pathways in allowing the phosphorylation of eNOS may therefore explain how VEGF and hyperactivated VEGFR2 can induce increased phosphorylation of eNOS in DEP-1-depleted cells, in which Akt activation is sub-optimal.

This is the first time that a pro-survival function is attributed to DEP-1, and this may be related to the fact that primary cell cultures instead of immortalized endothelial cells or transformed cancer cells were used for our study. Some of the previous *in vitro* work was performed on mouse endothelial cells immortalized with Polyoma middle T (PymT) oncogene (193). PymT associates with and activates Src kinases, and has been reported to constitutively phosphorylate Gab1 and activate Akt (152, 234, 282). Thus,

the depletion of DEP-1 in these cells should have no impact on the activation of the Src-Gab1-Akt pathway or cell survival. Moreover, under the experimental conditions for FACS analysis, we have not been able to observe an enhancement of DNA synthesis in DEP-1-depleted cells as previously reported (193). However, this result is consistent with the reduced proliferation of Akt1<sup>-/-</sup> endothelial cells (59). The *in vivo* functional inactivation of DEP-1 was reported not to yield any differences in the apoptosis rate of endothelial cells compared to control animals (285). A possible explanation may be that the essential role of Akt in VEGF-mediated survival and angiogenesis is only apparent during post-natal or pathological angiogenesis, but not during developmental angiogenesis (2, 59). Thus, too little expression or activation of DEP-1 during neo-angiogenesis could presumably allow increased VEGFR2 phosphorylation and activation of proliferative pathways at a time when cells should become quiescent and establish new cellular contacts, and this would be detrimental to the proper formation and stabilization of new blood vessels. In this context, the increased death of endothelial cells could represent a means of controlling this anarchic proliferation. Conversely, the presence of DEP-1 at cell-cell adhesions of endothelial cells would contribute to the enhanced activation of the Src-Gab1-Akt signaling pathway and to the increased survival of cells as they form new cellular contacts, while downregulating the proliferative signals emanating from VEGFR2. DEP-1 could therefore be involved in the coordinate regulation of Src and VEGFR2 to ensure the proper formation of new capillaries.

DEP-1 is best known for its anti-proliferative roles and tumor suppressor functions, suggesting that stimulating DEP-1 function might represent an interesting therapeutic strategy. Our results however demonstrate that in addition to these functions, DEP-1 is also required for the promotion of optimal VEGF-dependent cell survival. In this context, it is tempting to speculate that inhibition of DEP-1 function during pathological angiogenesis could also represent an alternative therapeutic avenue to explore.

## **Acknowledgments**

We thank our colleague Estelle Schmitt for her help with the FACS experiments, and Cam Patterson, Martine Roussel, Nicholas Tonks, and Stéphane Laporte for their generous gifts of plasmids. We also want to thank Nicole Beauchemin, Richard Bertrand and Michel Tremblay for their helpful comments on the manuscript.

This work was initially supported by the Cancer Research Society Inc., and completed with funds from the Canadian Institutes of Health Research (to I. R.). C. C. was supported by studentships from Université de Montréal (Molecular Biology Programs and the Faculty of Graduate Studies) and the Montreal Cancer Institute (Fondation Marc-Bourgie and Fonds Robert-Bourassa). K. S. was supported by the Montreal Cancer Institute (Fondation Marc-Bourgie).

**TYROSINE 1320 FROM THE CARBOXY-TERMINAL TAIL OF THE  
PROTEIN TYROSINE PHOSPHATASE DEP-1 IS REQUIRED FOR VEGF-  
INDUCED SRC AND AKT ACTIVATION IN ENDOTHELIAL CELLS**

Catherine Chabot<sup>1,\*</sup>, Kathleen Spring<sup>1,\*</sup>, Thu N.Trinh<sup>1</sup>, Mounib Elchebly<sup>2,3</sup>, and Isabelle  
Royal<sup>1,4,\*</sup>

<sup>1</sup>Centre de recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM) and  
Institut du Cancer de Montréal, Montréal, Québec, Canada, H2L 4M1, <sup>2</sup>Centre de  
recherche de l'Hôpital Sainte-Justine, Montréal, Québec, Canada, H3T 1C5.  
Departments of <sup>3</sup>Biochemistry and <sup>4</sup>Medicine, Université de Montréal, Montréal,  
Québec, Canada.

**Article non publié au moment du dépôt final de la thèse**

\*La contribution actuelle de Catherine Chabot aux travaux de recherche présentés ici est d'environ 60% et celle de Kathleen Spring de 40%. Thu N.Trinh a généré de nouveaux outils de recherche en tant que stagiaire d'été sous la supervision de Catherine Chabot. Le manuscrit a été rédigé par Catherine Chabot. Isabelle Royal a supervisé l'ensemble des travaux et contribué à la rédaction du manuscrit. Mounib Elchebly a collaboré à cette étude en fournissant certains réactifs et en apportant ses commentaires au manuscrit.

**Abstract**

DEP-1 is a receptor-type protein tyrosine phosphatase (PTP) with well-known anti-proliferative and tumor suppressive functions. Accordingly, DEP-1 has been reported to dephosphorylate several receptor tyrosine kinases, including the VEGF receptor-2 (VEGFR2). However, in contrast to these negative regulatory roles, we have previously shown that DEP-1 can activate VE-cadherin-associated Src and Akt, and promote endothelial cell survival in response to VEGF stimulation. Similarly, knockout studies also demonstrated that DEP-1 contributes to the activation of another Src family kinase, Lyn, and overexpression of DEP-1 in a malignant rat thyroid cell line was shown to lead to Src activation, by dephosphorylating the inhibitory Src Y529. However, the molecular mechanism underlying the ability of DEP-1 to promote Src activation remained ill-defined. We show here that a catalytically inactive DEP-1 mutant is phosphorylated in a Src-dependent manner on Y1311 and Y1320, which are located in the carboxy-terminal tail of the phosphatase. *In vitro* binding studies and co-immunoprecipitation experiments revealed that these two residues bind to the SH2 domain of Src, suggesting that DEP-1 could contribute to Src activation via a phosphotyrosine displacement mechanism. Expression of DEP-1 Y1320F in endothelial cells, but not of the Y1311F mutant, resulted in the loss of VE-cadherin-associated Src dephosphorylated on Y529. Consistent with this, activation of Src, and of downstream Akt, was decreased in VEGF-stimulated cells, while VEGFR2 phosphorylation and activation of the PLC $\gamma$ -ERK1/2 pathway remained constant in cells expressing either WT DEP-1 or the Y1320F mutant. These results thus support a model where DEP-1 phosphorylated on Y1320 associates with the SH2 domain of VE-cadherin-associated Src, thereby releasing the phosphorylated Y529, and allowing its dephosphorylation and consequent activation upon VEGF stimulation. This work reveals for the first time the critical role played by the DEP-1 C-terminal Y1320 in allowing substrate specificity and dephosphorylation.



## Introduction

Src family kinases (SFKs) are essential protein tyrosine kinases (PTKs) involved in the promotion of a multitude of cellular events including adhesion, migration, survival, proliferation and differentiation (239, 295). Protein tyrosine phosphatases (PTPs) are prime regulators of tyrosine-kinase activities, and there is now compelling evidence that the efficient activation of SFKs and downstream signaling involves the targeted action of specific PTPs.

In the inactive state, SFKs have been reported to adopt a closed conformation, where the SH2 domain is linked to a phosphorylated C-terminal tyrosine residue (Y527 in chicken and Y529 in human Src), while the SH3 domain binds to a Proline-rich sequence in the linker region (263, 267, 325, 326, 333). Phosphorylation of the C-terminal Y residue is critical for the inhibition of SFKs, and is catalyzed by the C-terminal Src kinase (Csk) or the Csk-homologous kinase (CHK) (65). For SFKs to become active, their SH3 and/or SH2 domains must become engaged with high affinity binding sites on others molecules. This then triggers the opening of the protein and allows the dephosphorylation of the C-terminal tyrosine residue by PTPs, leading to the induction of SFK activity by trans-phosphorylation of the catalytic tyrosine residue (Y416 in chicken and Y418 in human Src) (33, 213). A growing number of PTPs including PTP $\alpha$ , PTP $\epsilon$ , PTP1B, CD45 and DEP-1, have been found to positively regulate physiological and pathological processes by dephosphorylating the C-terminal Y residue of SFKs (12, 29, 61, 121, 201, 279, 308, 338, 343, 345-347, 349). Although the molecular mechanism underlying the ability of most PTPs to activate Src remains ill-defined, phosphorylation of Y789 and Y695 in the C-terminal tail of PTP $\alpha$  and PTP $\epsilon$ , respectively, has been demonstrated to enable Src Y529 dephosphorylation and activation, by allowing the binding of the Src SH2 domain and the displacement of the Y529 (25, 345).

DEP-1 is a receptor-type PTP of about 180-220 kDa, which is expressed in several cell types including epithelial, endothelial and hematopoietic cells (35, 71, 143, 236). It encompasses an extracellular domain containing 8 fibronectin type III motifs, a transmembrane domain, and a single intracellular catalytic domain (236). Initial studies

with DEP-1 demonstrated that its expression increased with cell density, suggesting a function in cell contact-mediated growth inhibition (236). DEP-1 was also reported to promote breast cancer cell differentiation and the inhibition of cancer cell proliferation, indicative of a role as a tumor suppressor (172, 303, 304, 339). Accordingly, DEP-1 was identified as the gene associated with the mouse colon cancer susceptibility locus (*Sccl*), and is frequently deleted and mutated in human cancers (257). These growth inhibitory functions are consistent with the nature of some of its reported substrates, which include several receptor tyrosine kinases (RTKs), including the PDGF- $\beta$ , HGF (Met), EGF, Ret, and VEGF (VEGFR2) receptors, as well as p120catenin, a protein involved in the regulation of cell-cell adhesion (57, 142, 153, 183, 193, 237). Our recent work in endothelial cells has revealed that DEP-1 expression is not only a negative regulator of cellular functions, but that it can positively regulate VE-cadherin-associated Src and Akt activation, and promote VEGF-mediated endothelial cell survival (57). Thus, in confluent endothelial cells stimulated with VEGF, DEP-1 promotes the association of the scaffolding adapter Gab1 with VE-cadherin complexes and the local activation of Src, allowing Gab1 tyrosine phosphorylation, its association with PI3K, and the ensuing activation of Akt and cell survival (57). A similar role for DEP-1 in SFK activation was recently reported downstream of immunoreceptors in B cells and macrophages in vivo, where ablation of the DEP-1 gene was shown to reduce Lyn kinase activation (348). In addition, the overexpression of DEP-1 in a rat thyroid cancer cell line was also shown to result in Src activation, by inducing its dephosphorylation on Y529 (240).

Although Src plays a critical role in the activation of several angiogenic responses induced by VEGF, including survival, migration and permeability, the molecular mechanism involved in its activation remains ill-defined (85, 202, 274). We demonstrate here that catalytically inactive DEP-1 is strongly phosphorylated by Src on two carboxy-terminal tyrosine residues, Y1311 and Y1320. These two phosphorylated residues can bind to the Src SH2 domain, and Y1320 is required for VEGF-induced Y529 dephosphorylation of the VE-cadherin-associated Src and the ensuing activation of Akt. These results thus reveal that, as for PTP $\alpha$  and PTP $\epsilon$ , a phosphotyrosine displacement mechanism could be involved in DEP-1-mediated Src activation.

## Materials and Methods

**Cell culture.** HEK 293 cells were grown in DMEM high glucose (Invitrogen) containing 10% FBS (Invitrogen) and 50 µg/ml gentamycin (Wisent). Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) (from Cascade Biologics, purchased from Cedarlane Laboratories Ltd., Burlington, ON, Canada) were cultured (passages 1 to 4) on 0.2% gelatin-coated tissue culture dishes and maintained in EBM-2 supplemented with 2% FBS, EGF, VEGF, FGF, heparin, IGF-1, hydrocortisone and ascorbic acid (EGM-2 bullet kit; Clonetics/Lonza).

**Antibodies and reagents.** Antibodies against phosphotyrosine (PY99), Myc (clone 9E10), VEGFR2 (clone A-3), were purchased from Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA). Antibodies against Src (clone GD11), VEGFR2 pY1054 and VEGFR2 pY1059 were obtained from Upstate/Millipore. Phosphospecific antibody against Src pY418 was obtained from BioSource Inc. (Invitrogen, Burlington, ON, Canada). Src (clone36D10), Akt pS473, Akt, ERK1/2 pT202/pY204, ERK1/2, Src-NON-pY529 antibody was from Cell Signaling Technology Inc., New England Biolabs (Pickering, ON, Canada). Horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-mouse or -rabbit IgG from Cell Signaling Technology Inc. were used for immunodetection. PP2 was purchased from Calbiochem. VEGF was purchased from R&D Systems (distributed by Cedarlane Laboratories).

**Generation of Myr-DEP-1 D/A and DEP-1 Y to F mutants.** The Myr-DEP-1 cDNA expression vector encoding the intracellular domain of human DEP-1 (amino acids 997 to 1337) fused with an amino-terminal myristylation signal and a carboxy-terminal Myc-tag was generated as described before (57). DEP-1 point mutant (D1205A) was also described in (57). All of the Myr-DEP-1 Y to F mutations were generated using the QuikChange XL site-directed mutagenesis kit (Stratagene). The mutagenic primers (Invitrogen) used to generate the various Y to F mutants were the following: 5'-CAACTGTGGGTTTCGCAGAGGAATTCGAAGATCTGAAGCTTGTGG-3' (Y1045F), 5'-GACCCATTCAACGGATGACTTCATTAATGCCAACTACATGCC-3'

(Y1094F), 5'-CCCTCCAAGCAGGCTCAGGACTTTGGAGATATCACTGTG-GCAATG-3' (Y1161F), 5'-GAGAACACCGTGGATGTGTTTGGGATTGTGTAT-GACCTTC-3' (Y1268F), 5'-CAGACAGAGGACCAGTTTGTCTTCCTCAATC-AGTGTG-3'(Y1288F), 5'-CCCAGAAAGACTCAAAAGTAGATCTTATCTTCC-AGAACAACAAGT-3'(Y1311F), 5'-GCAATGACAATCTTTGAAAACCTTGCG-CCCGTGACC-3' (Y1320F). The Y1311F/20F mutant was made on the Y1311F mutant using the Y1320F mutagenic primer. Y1311F, Y1320F and Y1311F/20F mutations were also generated on the full-length WT DEP-1 expressing vector provided by Nicholas Tonks.

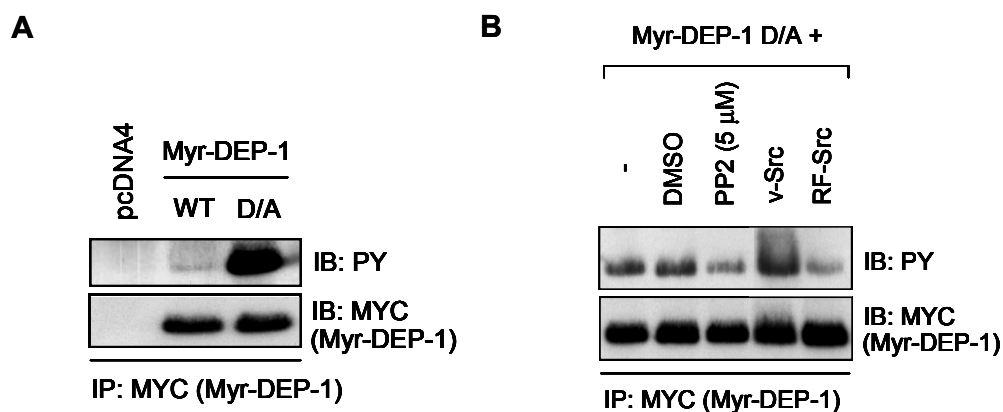
**Analysis of DEP-1 tyrosine-phosphorylation and its association with Src.** HEK 293 cells were seeded at  $0.8-1.2 \times 10^6$  cells/10-cm dish and transfected 24 h later using the standard calcium phosphate method with Myr-DEP-1 cDNA constructs (Myr-DEP-1 WT, Myr-DEP-1 D/A, and the Myr-DEP-1 D/A Y to F mutants) or the corresponding pcDNA4 empty vector. In one experiment, v-Src and RF-Src were also transfected with Myr-DEP-1 D/A cDNA constructs. For PP2 treatment, HEK293 cells were treated for 30 minutes at 37 °C before cell lysis. 48 hours post-transfection, cells were rinsed with PBS containing 1 mM  $\text{Na}_2\text{VO}_3$  and lysed in a 50 mM HEPES pH 7.5 buffer containing 0.5 % Nonidet P-40, 0.5% Triton X-100, 10 % glycerol, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  aprotinin, 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  leupeptin, 5 mM NaF, and 1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ . Myr-DEP-1 and Src were immunoprecipitated from cell lysate (200-500  $\mu\text{g}$ ) 1.5 h at 4 °C using the 9E10 MYC antibody or the Src antibody (clone GD11), and further incubated for 1.5 h at 4 °C with Protein G-Sepharose beads. Beads were then washed 3X with lysis buffer and Myr-DEP-1 immunoprecipitates, or total protein extracts (40-50  $\mu\text{g}$ ), were subjected to SDS-PAGE, transferred onto Hybond-C Extra membranes (Amersham Biosciences/GE Healthcare), and revealed by Western blotting and ECL detection according to the manufacturer's recommendations (Amersham Biosciences/GE Healthcare).

**GST pull-down assay.** GST fusion proteins were purified from E.coli as described previously (200). 5 µg of GST, GST-Src-SH2 or GST-Src-SH3 fusion proteins were incubated for 30 minutes at 4 °C with 30 µl of Glutathione Sepharose beads in 400 µl of lysis buffer. After three washes with lysis buffer, GST proteins coupled to beads were incubated for 1.5 h at 4 °C with cell lysate (500 µg) of HEK293 expressing Myr-DEP-1 WT, Myr-DEP-1 D/A or the Myr-DEP-1 D/A Y to F mutants. Immunoprecipitates were then washed 3X with lysis buffer and resolved by Western blotting and ECL detection.

**Transfection of WT DEP-1 and mutants in HUVECs.** HUVECs were seeded at 50 000 cells/cm<sup>2</sup> and transfected 24 h later using lipofectine (Invitrogen) with DEP-1 cDNA constructs (DEP-1 WT and DEP-1 WT Y to F mutants) or the corresponding pMT2 empty vector (transfection ratio: 1µg DNA for 3 µl lipofectine). Twenty-four hours post transfection medium was changed with EBM-2 supplemented with EGM-2 bullet Kit (Clonetics/Lonza). Thirty-six hours post transfection cells were starved for 6 hours with EBM without supplement, stimulated for 7 minutes with VEGF (50 ng/ml), and then rinsed with PBS containing 1 mM sodium vanadate (NaV). Cells were lysed in a 50 mM HEPES pH 7.5 buffer as described above. VE-cadherin (CD 144) was immunoprecipitated from cell lysates (300 µg) for 1.5 h at 4 °C using the CD144 antibody (BD Pharmingen), and further incubated for 1.5 h at 4 °C with Protein G-Sepharose beads. Beads were then washed 3X with lysis buffer and VE-cadherin immunoprecipitates, or total protein extracts (25-30 µg), were subjected to SDS-PAGE and Western blotting.

## Results

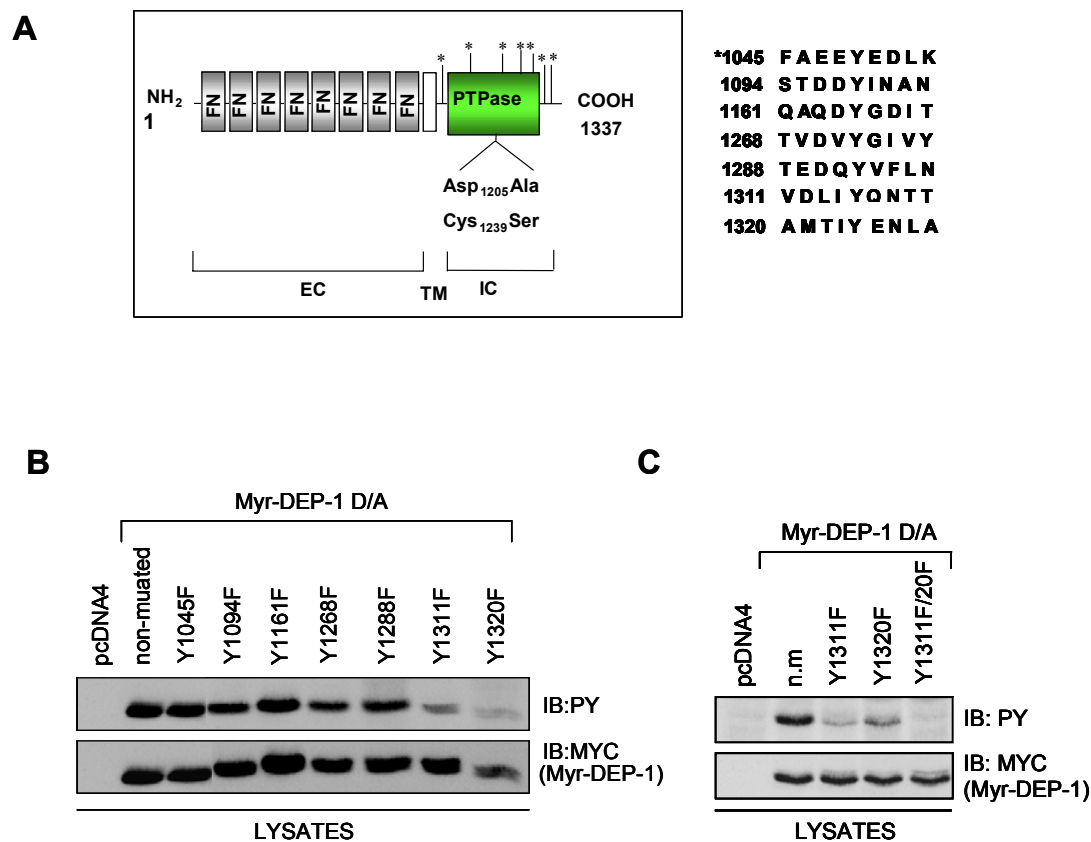
**DEP-1 is phosphorylated on tyrosine residues by Src.** We have previously shown that VEGF-dependent activation of Src is impaired in DEP-1-depleted endothelial cells (57). This result is therefore consistent with the reported ability of DEP-1 to activate SFKs via dephosphorylation of the inhibitory C-terminal Y529 (240, 348). Similarly to PTP $\alpha$  and PTP $\epsilon$  which are also involved in Src activation (25, 78, 278, 297), DEP-1 is phosphorylated on tyrosine residues (Figure 1A). The catalytically inactive DEP-1 D/A mutant is however more phosphorylated, indicating that DEP-1 is subject to strong auto-dephosphorylation. To first determine if Src is implicated in this phosphorylation event, Myr-DEP-1 D/A expressing cells were treated with a pharmacological SFKs inhibitor (PP2) or co-transfected with either a constitutively active (v-Src) or a dominant negative (RF-Src) form of Src. As shown in figure 1B, co-transfection of v-Src leads to an increase, while inhibition of SFKs or co-transfection of RF-Src lead to a decrease in tyrosine phosphorylation of DEP-1. Thus, these results demonstrate that DEP-1 is tyrosine-phosphorylated in a Src-dependent manner in these cells, and suggest that this event could play a role in the activation of Src by DEP-1, as it was shown for PTP $\alpha$  and PTP $\epsilon$ .



**Figure 1. DEP-1 is phosphorylated on tyrosine residues by Src.** (A) Myr-DEP-1 WT and the inactive Myr-DEP-1 D/A mutant were expressed in HEK293 cells and the tyrosine phosphorylation level of immunoprecipitated DEP-1 analyzed by

immunoblotting with the PY99 phosphotyrosine antibody (PY). **(B)** Tyrosine phosphorylation of Myr-DEP-1 D/A is impaired by PP2 or by a Src dominant negative mutant (RF-Src), while it is promoted by v-Src.

**Y1311 and Y1320 of DEP-1 are the major sites of tyrosine phosphorylation on DEP-1.** We have analyzed the amino acid sequence of DEP-1 to find Src family consensus phosphorylation sites or potential Src family SH2-domain binding sites, and identified seven tyrosine residues corresponding to these criterias (Figure 2A). To determine if some of these residues were phosphorylated on DEP-1, we performed site-directed mutagenesis and generated the corresponding Y/F mutants in Myr-DEP-1 D/A. The resulting mutants were expressed in HEK293 and their phosphorylation level relative to the non-mutated Myr-DEP-1 D/A was evaluated by immunoblotting total cell lysates with the anti-phosphotyrosine antibody PY99. Figure 2B shows that the Myr-DEP-1 D/A Y1311F and Y1320F mutants are less phosphorylated. We next generated a double Y1311F/Y20F mutant and showed that its tyrosine phosphorylation is completely abrogated (Figure 2C). A mass spectrometry analysis was also performed on Myr-DEP-1 D/A purified from transfected HEK293 cells, and confirmed that these two tyrosine residues were indeed phosphorylation sites (data not shown).

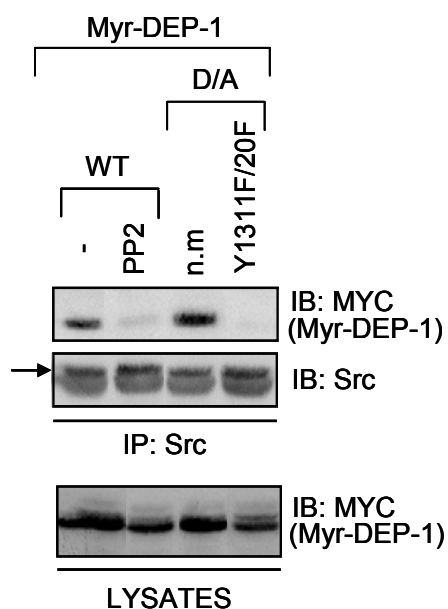


**Figure 2. Y1311 and Y1320 of DEP-1 are the major sites of tyrosine phosphorylation on DEP-1.** (A) Potential sites of tyrosine phosphorylation in the intracellular domain of DEP-1 according to published consensus sequences or Scan sites prediction. (B and C) Western blot analysis shows the tyrosine phosphorylation levels (PY) of the Y/F Myr-DEP-1 D/A mutants generated and expressed in HEK293 cells.

**DEP-1 associates with Src via its phosphorylated Y1311 and Y1320 residues.** DEP-1 was previously shown to interact with Src (10, 240) but residues that mediate this interaction were not identified on DEP-1. To determine if the phosphorylated Y1311 and Y1320 of DEP-1 are implicated in binding to Src, Myr-DEP-1 WT, non-mutated (n.m.) Myr-DEP-1 D/A and Myr-DEP-1 D/A Y1311F/20F were expressed in HEK293 cells, and their ability to interact with Src was investigated following Src



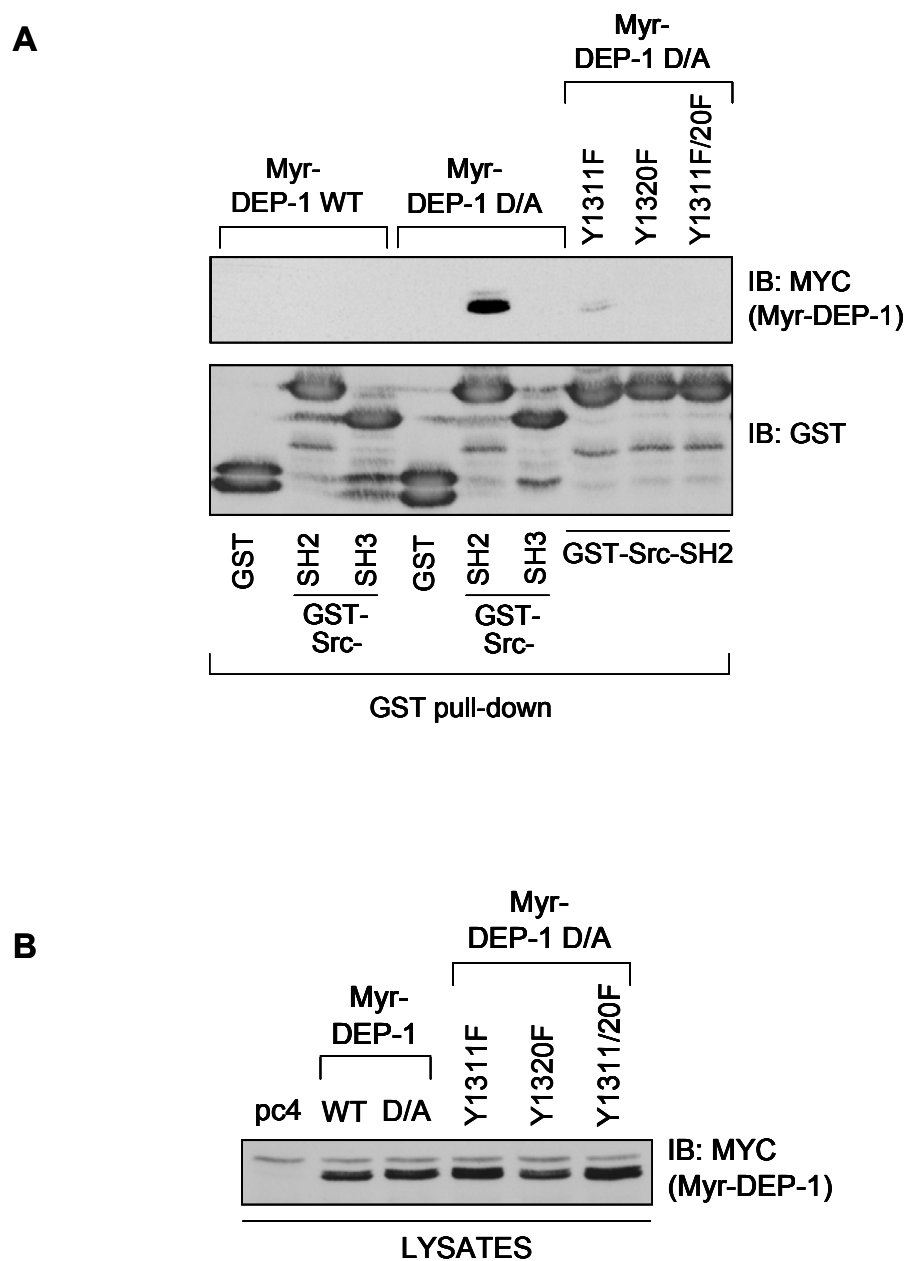
immunoprecipitation. Figure 3 shows that Myr-DEP-1 WT and non-mutated Myr-DEP-1 D/A are both co-immunoprecipitated with Src. Since stronger association of Src with Myr-DEP-1 D/A correlates with a higher level of tyrosine phosphorylation of Myr-DEP-1 D/A compared to Myr-DEP-1 WT (see figure 1A), this suggest that the interaction between Src and DEP-1 is mediated by phosphotyrosine residues on DEP-1. Consistently, mutation of Y1311 and Y1320 completely blocked their association. Altogether, these results reveal that DEP-1 phosphorylated Y1311 and Y1320 are involved in Src binding.



**Figure 3. DEP-1 associates with Src via Y1311 and Y1320.** The association of Myr-DEP-1 WT, Myr-DEP-1 D/A, and Myr-DEP-1 D/A Y1311F/20F to endogenous Src immunoprecipitated from HEK293 cells lysates was detected by Western blotting using the MYC antibody.

**DEP-1 Y1311 and Y1320 bind Src via its SH2 domain.** Since the phosphorylation of DEP-1 Y1311 and Y1320 is required for its interaction with Src, this suggests that Src binds DEP-1 via its SH2 domain. To confirm this, we performed *in vitro* association experiments and investigated the ability of GST alone, GST-Src-SH2 or GST-Src-SH3

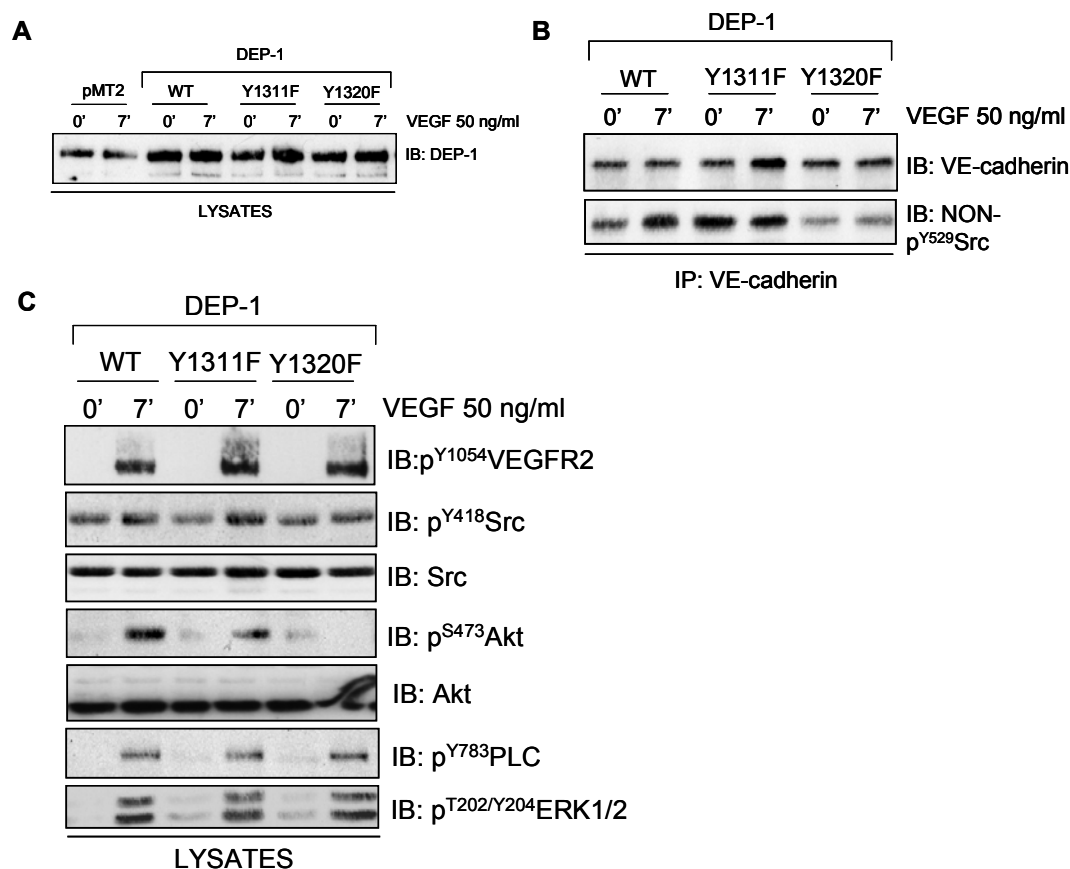
fusion proteins coupled to Glutathione-Sepharose beads to associate with Myr-DEP-1 WT, Myr-DEP-1 D/A or the Myr-DEP-1 Y/F mutants from transfected HEK 293 cell lysates. As expected, the highly tyrosine-phosphorylated Myr-DEP-1 D/A associated with the GST-Src-SH2 fusion protein with a strong affinity, and mutation of Y1311 and Y1320 residues abolished this interaction (Figure 4A). The tyrosine phosphorylation level of WT DEP-1 was seemingly too low to allow an interaction with the GST-Src-SH2 fusion protein in these conditions. Although we can not exclude that DEP-1 could also interact, in a much weaker manner, with the SH3 domain of Src, we were not able to detect any interaction, and we therefore concluded that the association of Src with DEP-1 is mostly mediated by the binding of its SH2 domain to the phosphorylated Y1311 and Y1320 of DEP-1.



**Figure 4. DEP-1 Y1311 and Y1320 bind Src via its SH2 domain. (A)** Lysates of HEK293 cells transfected with Myr-DEP-1 WT, non-mutated Myr-DEP-1 D/A, Myr-DEP-1 D/A Y1311F, Myr-DEP-1 D/A Y1320F, and Myr-DEP-1 D/A Y1311F/20F were incubated with GST-Src-SH2, GST-Src-SH3 or with GST alone. Association of DEP-1 with Src domains was detected by immunoblotting using the MYC antibody. **(B)** Lysates of transfected HEK293 cells were immunoblotted with the MYC antibody to show the similar level of expression of Myr-DEP-1 WT, Myr-DEP-1 D/A and the Y/F Myr-DEP-1 D/A mutants.

**DEP-1 Y1320 is required for VEGF-dependent Src and Akt activation in endothelial cells.** It has previously been shown that PTP $\alpha$  and PTP $\epsilon$  activate Src via a phosphotyrosine displacement mechanism (25, 345). According to this model, specific tyrosine residues in the C-terminus of these phosphatases interact with the Src SH2 domain, thereby displacing Src pY529 from Src's SH2 domain, and thus allowing the dephosphorylation of pY529 by these phosphatases. To determine if this mechanism could contribute to the activation of Src by DEP-1, we investigated the impact of the expression of the full-length, catalytically active WT DEP-1 or the corresponding Y1311F and Y1320F mutants on VEGF-induced Src activation in endothelial cells. In these cells, the VE-cadherin-associated pool of Src represents an important fraction of activated Src in response to VEGF (57, 128). DEP-1 is also localized to cell-cell junctions and we have previously demonstrated that DEP-1 is required to VEGF-induced activation of Src, presumably by dephosphorylating the Y529 residue of Src associated with VE-cadherin complexes (142, 236, 283). Based on this, we decided to analyze the phosphorylation status of the Y529 of this pool of Src in HUVECs transfected with WT DEP-1 or the Y1311F and Y1320F mutants (Figure 5). For this purpose, VE-cadherins were immunoprecipitated from these cells and the level of co-precipitating Src dephosphorylated on Y529 evaluated with an antibody that exclusively recognizes the activated form of Src dephosphorylated on Y529 (NON-p<sup>Y529</sup>-Src antibody). As seen in figure 5A, the levels of WT DEP-1 or the Y1311F and Y1320F mutants expressed in HUVECs are similar. We thus proceeded to VE-cadherin immunoprecipitation from these cell lysates. As expected, a strong dephosphorylation of associated Src on Y529 is detected following VEGF stimulation in cells that overexpressed WT DEP-1 (Figure 5B; lower panel, second column), consistent with the decreased PY529 previously detected (57, 128). In contrast, no Src dephosphorylated on Y529 is detected in association with VE-cadherin upon the stimulation of cells expressing the Y1320F DEP-1 mutant with VEGF. Curiously, Src is dephosphorylated on Y529 before VEGF stimulation in DEP-1 Y1311F expressed cells. However, this dephosphorylation of Src is maintained following VEGF stimulation. Thus, this reveals that phosphorylation of DEP-1 on Y1320, but not on Y1311, is required for VE-

cadherin to associate with Src dephosphorylated on Y529. We then determined the consequences of this inhibition of Src Y529 dephosphorylation on signalling emanating from VEGFR2. As seen in figure 5C, VEGFR2 autophosphorylation (p<sup>Y1054</sup>VEGFR2) or PLC $\gamma$ -ERK1/2 activation (pY<sup>783</sup>PLC $\gamma$  and p<sup>T202/Y204</sup>ERK1/2) are not affected by the expression of the Y1311F or Y1320F mutants in these conditions. However, VEGF-induced Akt activation (p<sup>S473</sup>Akt) is importantly reduced in the presence of the Y1320F mutant. Furthermore, immunoblot analysis using the Src p<sup>Y418</sup> antibody that also recognizes the activated form of Src confirms that expression of the Y1320F, but not the Y1311F mutant, decreases VEGF-induced Src activation. These results strongly support our previous study revealing a new role for DEP-1 in Src-dependent Akt activation and endothelial cell survival (57). Since the transfected WT DEP-1 and mutants have similar effects on VEGFR2 phosphorylation and PLC $\gamma$ -ERK1/2 activation in these conditions, our work also suggests that phosphorylation of DEP-1 on Y1320 does not globally affect the catalytic activity of the phosphatase but is required to direct DEP-1 activity toward Src.



**Figure 5. DEP-1 Y1320 is required for Src activation. (A)** HUVECs were transfected with empty vector (pMT2), WT DEP-1, Y1311F or Y1320F mutants. **(B)** VE-cadherin was immunoprecipitated and the level of associated Src dephosphorylated at Y529 was detected by immunoblotting with an antibody recognizing non-phosphorylated Y529. **(C)** Immunoblotting the corresponding cell lysates with phospho-specific antibodies reveals the inhibition of Src and Akt activation, but not of PLC $\gamma$ , ERK1/2 and VEGFR2, which are not targeted by DEP-1 at this level of cell confluency.

## Discussion

We have previously shown that DEP-1 positively regulates activation of Src, Akt and endothelial cell survival upon VEGF stimulation (57). This was shown to correlate with the ability of DEP-1 to allow dephosphorylation of VE-cadherin-associated Src on Y529 (57). However, the molecular mechanism underlying these events remained unknown. In this paper, we show that catalytically inactive DEP-1 is phosphorylated in a Src-dependent manner on C-terminal Y1311 and Y1320, and that these residues bind to the Src SH2 domain. We further show that expression of the Y1320F DEP-1 mutant in endothelial cells leads to a decrease in VE-cadherin-associated Src dephosphorylated on Y529. These data thus suggest that a phosphotyrosine displacement mechanism engaging Y1320 is involved in DEP-1-mediated Src activation, similarly to what is observed for PTP $\alpha$  and PTP $\epsilon$ .

Phosphorylation of PTPs on tyrosine residues is increasingly revealed as an exquisite molecular mechanism by which PTP substrate specificity could be modulated. In the particular case of PTP $\alpha$  and PTP $\epsilon$ , phosphorylated carboxy-terminal Y789 and Y695, respectively, were shown to be essential for the specific dephosphorylation of Src Y529 (25, 345). However, mutation of these residues did not impair the ability of these PTPs to dephosphorylate other substrates. Indeed, mutation of PTP $\alpha$  on C-terminal Y789 was reported to abrogate its activity toward Src, but increased its activity toward Pyk2 (210). Likewise, mutation of PTP $\epsilon$  on Y695 impaired Src dephosphorylation, but not dephosphorylation of its other substrate Kv2.1 (25). These data are consistent with the fact that similar levels of VEGFR2, PLC $\gamma$  and ERK1/2 phosphorylation are observed in cells overexpressing either WT DEP-1 or the Y1320F mutant. Phosphorylation of DEP-1 on Y1320 may thus represent a mechanism whereby its substrate specificity could be regulated. In addition, our results showing that DEP-1 phosphorylation is Src-dependent further suggest that Src itself promotes its specific dephosphorylation and auto-activation.

The amino acid sequence downstream of Y1311 and Y1320 fit the consensus binding site for the adaptor protein Grb2 (YXNX), as it is the case for Y789 and Y695 of PTP $\alpha$  and PTP $\epsilon$  (272). Interestingly, in the case of PTP $\alpha$ , the binding of Grb2 has

been shown to regulate the binding of Src during cell cycle progression (78, 344-346). The mechanism underlying this regulation is not well-defined, but the PKC-mediated phosphorylation of juxtamembrane serine residues in PTP $\alpha$  is required to modulate the affinity of Y789 for the Src and Grb2 SH2 domains (344). Although the tyrosine phosphorylation of Y789 remains constant, this represents another mechanism allowing the regulation of substrate specificity. In addition to blocking Src association, the binding of Grb2 could also promote the activation of downstream signaling pathways, as reported for the Low molecular weight-protein tyrosine phosphatase (120). It will be interesting to determine if Grb2 can bind to either Y1311 or Y1320 of DEP-1, and the consequences on Src and/or downstream signaling.

Mutation of Y1311 in Myr-DEP-1 D/A also leads to an important decrease in DEP-1 tyrosine phosphorylation in HEK 293, and fails to bind to the Src SH2 domain *in vitro*. However, expression of the DEP-1 Y1311F mutant in HUVECs does not significantly affect the VEGF-induced dephosphorylation of VE-cadherin-associated Src on Y529. The conformation of the Myr-DEP-1 D/A mutant is different than the full-length, catalytically active WT DEP-1 expressed in endothelial cells. This could thus explain the different requirement observed for Y1311 in the binding of Src on Myr-DEP-1 D/A versus the full-length WT protein. Alternatively, Y1311 might not be efficiently phosphorylated in endothelial cells.

In endothelial cells, the main fraction of Src activated by VEGF is associated with VE-cadherin (57, 128). In this complex, Src was shown to be maintained inactive by Csk-mediated phosphorylation of its Y529 (128). To be activated, Src engages its SH2 and/or SH3 domain with a high affinity site in another signaling molecule, and/or be dephosphorylated by a PTP (33). It was suggested that the greater importance of PTP $\alpha$  in EGF- as opposed to PDGF-induced Src activation might reside in a lower *in vivo* affinity of the Src SH2 domain for phosphorylated EGF-receptor than for phosphorylated PDGF-receptor (308). The importance of DEP-1 for VEGF-mediated Src activation at VE-cadherin complexes may thus reflect the inability of Src to bind VEGFR2 via its SH2 domain. This might also explain why DEP-1 does not contribute to Src activation in response to PDGF stimulation (159).



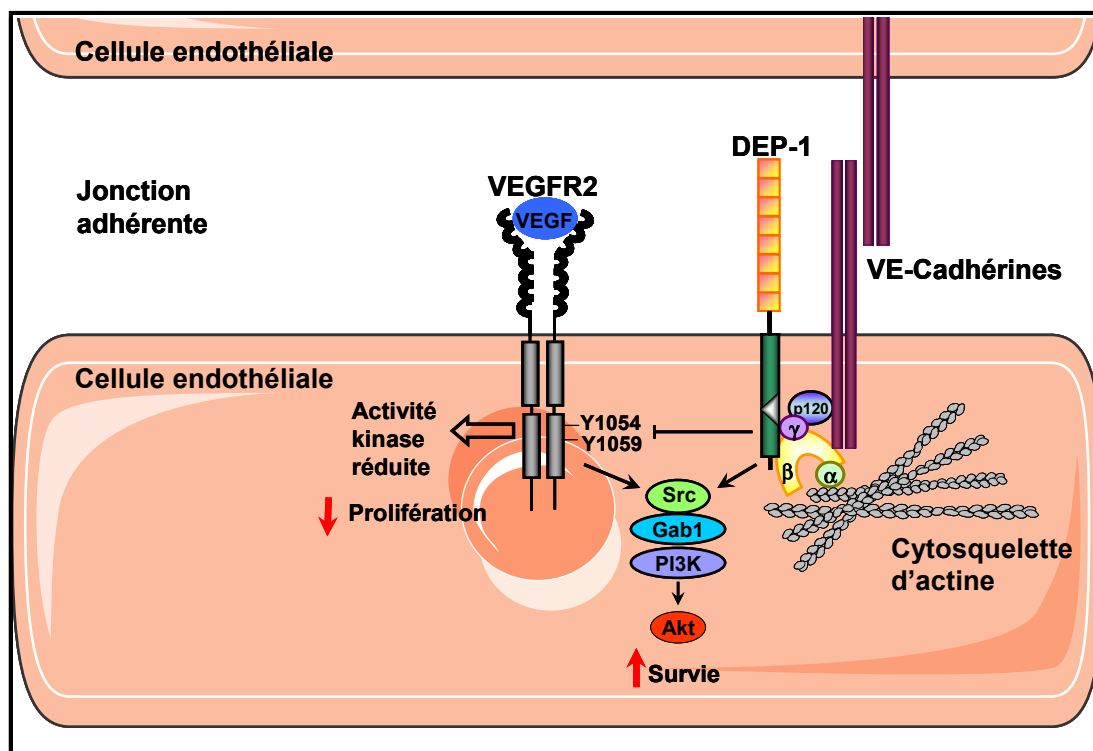
Although Src plays a critical role in the activation of several angiogenic responses including survival, migration and permeability in response to VEGF (85, 202, 274), the molecular mechanism involved in its activation remained ill-defined. Phosphorylation of DEP-1 on Y1320 is required to VEGF-induced Y529 dephosphorylation and activation of Src associated with VE-cadherin in endothelial cells. Since this pool of Src is also involved in the promotion of vascular permeability via phosphorylation of cell-cell adhesion proteins such as  $\beta$ -catenin, it is tempting to speculate that this physiological process could also be regulated by the phosphorylation of DEP-1 on Y1320. Further investigation of the function of DEP-1 Y1320 in VEGF-mediated Src and downstream signaling should therefore provide a better understanding of the molecular mechanisms regulating the angiogenic responses.

### **Acknowledgments**

This work was supported by the Cancer Research Society Inc., and the Canadian Institutes of Health Research (to I. R.). C. C. was supported by studentships from Université de Montréal (Molecular Biology Programs and the Faculty of Graduate Studies) and the Montreal Cancer Institute (Fondation Marc-Bourgie and Fonds Robert-Bourassa). K. S. was supported by the Montreal Cancer Institute (Fondation Marc-Bourgie).

#### 4. Discussion

Le but de nos travaux de recherche était de mieux définir le rôle de DEP-1 dans la régulation du programme angiogénique induit par le VEGF. Pour ce faire, nous avons investigué dans un premier temps de quelle manière DEP-1 contribuait aux activités du récepteur VEGFR2. Nos travaux démontrent que DEP-1 et le récepteur VEGFR2 interagissent ensemble via le site catalytique de DEP-1, et supportent un modèle selon lequel DEP-1 cible les résidus tyrosine Y1054/59 de la boucle d'activation de VEGFR2. Cette déphosphorylation conduit à une réduction de l'activité kinase du récepteur et par conséquent, à une diminution globale de son autophosphorylation en présence de la phosphatase. À l'inverse, l'inhibition de l'expression de DEP-1 dans les cellules endothéliales entraîne une augmentation générale de la phosphorylation de VEGFR2 mais étonnement, elle ne conduit pas à une stimulation accrue de toutes les voies de signalisation en aval du récepteur. En effet, la découverte majeure de nos travaux est que l'activation de Src et de la voie Src-Gab1-Akt est inhibée en absence de DEP-1, de même que la survie des cellules endothéliales en réponse au VEGF. Notre étude est donc la première à attribuer à DEP-1 un rôle positif dans la régulation de la réponse angiogénique élaborée par le récepteur VEGFR2. Ainsi, contrairement à ce qui avait été suggéré par Lampugnani et al., les effets opposés du complexe VE-cadhérine/ $\beta$ -caténine/DEP-1 sur la voie PLC $\gamma$ -ERK1/2 et PI3K-Akt ne seraient pas dictés par une déphosphorylation limitée de VEGFR2 par DEP-1 (193) puisque la déphosphorylation des résidus Y1054/59 de VEGFR2 par DEP-1 affecte globalement la phosphorylation de tous les résidus tyrosine du récepteur. Nos travaux suggèrent plutôt que c'est en combinant la déphosphorylation des résidus Y1054/59 de VEGFR2 à la déphosphorylation de la Y529 de Src que DEP-1 peut promouvoir, en parallèle, l'inhibition de contact et la survie des cellules endothéliales au niveau de ce complexe. Notre étude a donc permis d'établir un nouveau modèle de régulation des propriétés signalitiques du récepteur VEGFR2 par le complexe VE-cadhérine/ $\beta$ -caténine/DEP-1 au niveau des jonctions cellules-cellules (Figure 10).



**Figure 10. Nouveau modèle de régulation des propriétés signalitiques du récepteur VEGFR2 par le complexe VE-cadhérine/β-caténine/DEP-1.** Lorsque les cellules endothéliales sont à confluence, DEP-1 réduit l'activité kinase de VEGFR2 et la prolifération cellulaire induite par le VEGF en déphosphorylant les résidus Y1054/59 de VEGFR2 mais contribue positivement à la promotion de la voie Src-Gab1-Akt et la survie des cellules endothéliales en activant Src.

Ainsi, à mesure que les cellules endothéliales établissent de nouveaux contacts cellulaires, l'association de VEGFR2 avec DEP-1 permettrait au récepteur de promouvoir la survie des cellules endothéliales par l'entremise de la voie Src-Gab1-Akt et ce, malgré une diminution progressive de son activité kinase nécessaire à la stabilité des nouveaux vaisseaux sanguins. L'activation de la PI3K en aval des récepteurs aux facteurs de croissance tel que le PDGF ou l'EGF est généralement médiée par une liaison directe de la sous-unité régulatrice de la PI3K (p85) à ces récepteurs (323). Contrairement à ces récepteurs, le récepteur VEGFR2 ne possède pas de séquence de liaison pour la p85 (271). Nos travaux supportent toutefois les études précédentes

démontrant qu'en réponse au VEGF, l'activation d'Akt est médiée par l'association de la PI3K à la protéine adaptatrice Gab1 (69, 194). La phosphorylation sur résidus tyrosine de la p85 peut aussi contribuer à son activation en réponse à différents stimuli mais la nécessité de cette phosphorylation n'est pas clairement établie (58, 67). Il a par ailleurs été rapporté que DEP-1 peut déphosphoryler la p85 et qu'en absence de DEP-1, l'activité de la PI3K est augmentée en présence de sérum (305). Ces données semblent donc, à priori, en désaccord avec nos résultats. Cependant, puisque la p85 ne lie pas directement le récepteur VEGFR2, sa phosphorylation par le VEGFR2 pourrait ne pas être requise pour son activation en réponse au VEGF. Ceci pourrait donc expliquer pourquoi l'absence de DEP-1 n'entraîne pas d'augmentation de la phosphorylation/activation de la PI3K dans les cellules endothéliales stimulées au VEGF alors que la p85 est un substrat potentiel de DEP-1.

Nos résultats révèlent également pour la première fois que la protéine adaptatrice Gab1 fait partie du complexe VE-cadherine/ $\beta$ -caténine/VEGFR2 et suggèrent fortement que c'est elle, une fois phosphorylée par Src, qui permet le recrutement de la PI3K au niveau de ce complexe. En réponse à diverses cytokines et facteurs de croissance, la protéine Gab1 phosphorylée sur différents résidus tyrosine permet l'échaffaudage de complexes multiprotéiques aux fonctions signalitiques variées et adaptées au contexte cellulaire (125). Au niveau des cellules endothéliales, Gab1 est essentielle à la survie mais aussi à la migration et la formation de capillaires en réponse au VEGF (56, 194). Nos travaux indiquent par ailleurs que DEP-1 est requise pour l'association de Gab1 avec le complexe VE-cadherine/ $\beta$ -caténine/VEGFR2 mais les mécanismes moléculaires impliqués restent cependant à être élucidés. En général, Gab1 s'associe aux RTKs via Grb2 (125). Puisque Gab1 est constitutivement associée à Grb2 dans les cellules endothéliales et que Grb2 peut aussi lier le récepteur VEGFR2, Gab1 pourrait être recrutée au niveau du complexe VE-cadherine/ $\beta$ -caténine/VEGFR2 via Grb2 (185, 194). Il a par ailleurs été rapporté que Gab1 forme un complexe stable avec le mutant DEP-1 D/A mais pas avec la phosphatase de type sauvage (237). Ces résultats suggèrent donc que Gab1 est un substrat de DEP-1 ou alors que Gab1 est capable d'interagir avec les Y1311 et/ou Y1320 phosphorylés de DEP-1 puisque ces résidus sont fortement phosphorylés au niveau du mutant DEP-1 D/A et peu au niveau de la

protéine de type sauvage. Fait intéressant, les séquences en acides aminés qui suivent les Y1311 (YQNT) et Y1320 (YENL) correspondent à la séquence consensus de liaison de Grb2 (YXNX). Par conséquent, les résidus Y1311 et/ou Y1320 phosphorylés de DEP-1 pourraient peut-être aussi, via leur liaison à Grb2, participer au recrutement de Gab1 au niveau du complexe VE-cadherine/ $\beta$ -caténine/VEGFR2.

En réponse au VEGF, l'interaction de DEP-1 avec le récepteur VEGFR2 au niveau des VE-cadhérines se ferait vraisemblablement via la  $\beta$ -caténine qui a été rapportée comme pouvant lier DEP-1 (193, 237). Puisque la phosphorylation par Src des protéines des complexes jonctionnels telle que la  $\beta$ -caténine est associée à une augmentation de la perméabilité vasculaire en réponse au VEGF, et que DEP-1 régule l'activité de Src au niveau de ces complexes, DEP-1 pourrait vraisemblablement être aussi impliquée dans l'induction de la perméabilité vasculaire médiée par le VEGF (74, 85, 89, 114, 189, 202, 241, 253, 318). À ce sujet, des résultats préliminaires obtenus dans le laboratoire tendent à démontrer que la phosphorylation sur résidus tyrosine de la  $\beta$ -caténine n'est plus induite par le VEGF dans les cellules endothéliales en absence de DEP-1 (Chabot et Royal, résultats non publiés). Il reste toutefois à déterminer si cette perte de phosphorylation de la  $\beta$ -caténine se traduit fonctionnellement par une diminution de la perméabilité vasculaire en réponse au VEGF.

Les PTP1B et VE-PTP peuvent aussi interagir avec les VE-cadhérines au niveau des jonctions adhérentes (219, 226, 227) et l'inhibition de ces PTPs entraîne également une augmentation de la phosphorylation de VEGFR2 et de la prolifération des cellules endothéliales en réponse au VEGF (219, 226). Il est donc concevable de penser que l'interaction de VEGFR2 avec le complexe des VE-cadherine/ $\beta$ -caténine dont fait partie DEP-1, la PTP-1B et la VE-PTP, permet l'élaboration d'un module de signalisation multimoléculaire dont la fonction première est de promouvoir l'inhibition de contact et la survie des cellules endothéliales. Au sein de ce module ces PTPs pourraient, comme DEP-1, procéder directement à la déphosphorylation de VEGFR2 (219, 226). D'un autre côté, la PTP1B et la VE-PTP pourraient aussi faciliter l'inactivation de VEGFR2 par DEP-1 en stabilisant les contacts cellules-cellules puisque ces PTPs peuvent, respectivement, déphosphoryler les VE-cadhérines et la plakoglobine (226, 231). Il est à noter que DEP-1 pourrait aussi contribuer au renforcement des jonctions intercellulaires

en déphosphorylant la p120<sup>caténine</sup> (142). L'inhibition de la PTP1B dans les cellules endothéliales entraîne une augmentation de la voie mitogénique PLC $\gamma$ -Erk1/2 en aval du récepteur VEGFR2 mais elle n'affecte pas l'activation d'Akt, ni la survie des cellules endothéliales (226). Ainsi, même si la PTP1B peut activer Src dans d'autres systèmes (12, 29, 61, 201, 349), cette dernière ne contribuerait pas de façon importante à son activation, ni à celle de la voie Src-Gab1-Akt, dans les cellules endothéliales. L'inhibition de la VE-PTP n'altère pas non plus la survie des cellules endothéliales en réponse au VEGF (219). DEP-1 demeure donc, jusqu'à présent, la seule phosphatase capable à la fois d'inhiber les activités mitogéniques du récepteur VEGFR2 et de promouvoir la survie des cellules endothéliales en réponse à l'adhésion intercellulaire.

Notre étude s'est davantage concentrée sur les fonctions régulatrices de DEP-1 rattachées au complexe VE-cadhérine/ $\beta$ -caténine/VEGFR2. Il a cependant été rapporté que la surexpression de DEP-1, en plus d'activer Src, mène à une augmentation de l'adhésion au substrat et de la phosphorylation de FAK (195). En accord avec ces résultats, la phosphorylation sur résidus tyrosine de FAK semble diminuée en réponse au VEGF dans les cellules endothéliales déplétées en DEP-1 (Chabot et Royal, résultats non publiés). Afin d'investiguer davantage le rôle de DEP-1 dans la régulation des complexes d'adhérence focale, nous pourrions procéder à une immunoprécipitation de FAK dans les HUVECs stimulées au VEGF et traitées avec les siRNA de DEP-1 ou les siRNA CTL, et comparer la phosphorylation de FAK, les niveaux de Src liés à FAK, ainsi que l'état de phosphorylation de la Y529 de cette fraction de Src associée spécifiquement à FAK. De plus, afin d'appuyer nos résultats actuels attestant que la phosphorylation de la Y1320 de DEP-1 peut contribuer à l'activation de Src, l'effet de la surexpression du mutant Y1320F sur la phosphorylation de FAK pourrait de même être étudié. Ces expériences permettraient donc d'évaluer la contribution spécifique de DEP-1 à l'activation d'une autre fraction importante de Src, celle associée aux complexes d'adhérence focale. Cette contribution pourrait par ailleurs être évaluée en réponse à l'adhésion des cellules endothéliales à différentes matrices extracellulaires.

Comme notre première étude révèle que l'activation de Src médiée par DEP-1 est critique pour la survie des cellules endothéliales en réponse au VEGF, et que Src est un régulateur majeur de la perméabilité vasculaire et de la migration des cellules

endothéliales, une meilleure définition des déterminants moléculaires de l'activation de Src pourrait permettre, dans des conditions d'angiogenèse pathologique par exemple, de contrôler d'une manière plus spécifique la formation de nouveaux vaisseaux sanguins. Par conséquent, dans notre seconde étude, nous avons tenté de définir avec plus de précisions les mécanismes moléculaires impliqués dans la régulation de cette activation de Src par DEP-1.

Au cours de notre première étude, nous avons pu observer que Myr-DEP-1 D/A est phosphorylée sur résidus tyrosine. En investiguant davantage le phénomène, nous avons découvert que cette phosphorylation est modulée par Src. Conséquemment, à l'aide du logiciel d'analyse Scansite et des séquences consensus publiées, nous avons pu identifier sept sites potentiels de phosphorylation par Src ou de liaison de domaines SH2. Par mutagenèse dirigée, nous avons ensuite déterminé que les deux principaux sites de phosphorylation de DEP-1 sont les résidus Y1311 et Y1320 situés dans la queue carboxy-terminale de la phosphatase. La phosphorylation de ces résidus a de plus été confirmée par spectrométrie de masse. Nous avons montré que ces deux résidus tyrosine peuvent lier le domaine SH2 de Src *in vitro*. Nos résultats indiquent toutefois que la phosphorylation de la Y1320 serait principalement requise pour permettre la déphosphorylation de la Y529 de la fraction de Src associée au complexe des VE-cadhérines. Ainsi, comme il a été démontré pour la PTP $\alpha$  et la PTPe (25, 345), la phosphorylation d'un résidu carboxy-terminal de DEP-1 serait impliquée dans l'activation de Src, possiblement via un mécanisme de phospho-déplacement de son domaine SH2.

Bien qu'une certaine activation de Src soit toujours observable en réponse au VEGF dans les lysats totaux des cellules endothéliales qui expriment le mutant Y1320F de DEP-1, la diminution considérable de Src activé (déphosphorylé en Y529) au niveau des VE-cadhérines abolit complètement l'activation d'Akt. Ces résultats appuient donc les résultats de notre première étude et confirment l'importance de cette fraction particulière de Src dans l'activation d'Akt en réponse au VEGF. Ces résultats sont par ailleurs en accord avec ceux de Ha et al., qui ont démontré que les VE-cadhérines sont requises pour l'activation de Src et d'Akt en réponse au VEGF (128).

En conditions basales, la tyrosine inhibitrice Y529 de cette fraction de Src associée aux VE-cadhérines est phosphorylée par Csk (128). En réponse au VEGF, Csk se dissocie de ce complexe en raison de la déphosphorylation de son site de liaison par SHP2. Cependant, pour être activé, Src phosphorylé en Y529 doit engager son domaine SH2 et/ou SH3 avec un site de haute affinité présenté par une autre molécule de signalisation et/ou être déphosphorylé par une PTP (33). Comme aucune interaction directe entre le domaine SH2 de Src et le récepteur VEGFR2 phosphorylé n'a été rapporté jusqu'à maintenant, la liaison du domaine SH2 de Src à la pY1320 de DEP-1 pourrait donc s'avérer fort importante pour l'activation de Src en réponse au VEGF. Il a d'ailleurs été suggéré que l'affinité réduite que présente le domaine SH2 des SFKs pour le récepteur à l'EGF phosphorylé *in vivo*, en comparaison de l'affinité qu'il démontre pour le récepteur au PDGF, pourrait expliquer pourquoi la PTP $\alpha$  est davantage requise pour l'activation des SFKs en réponse à l'EGF qu'en réponse au PDGF (308). Ainsi, ce n'est que suite à une stimulation au VEGF que DEP-1 pourrait procéder à l'activation de Src via le mécanisme de phospho-déplacement de son domaine SH2. Il est à noter que d'autres PTPs pourraient potentiellement aussi déphosphoryler la Y529 de Src suite au phospho-déplacement de son domaine SH2 par la pY1320 de DEP-1.

Par ailleurs, puisque les niveaux d'autophosphorylation de VEGFR2, de même que l'activation de la voie PLC $\gamma$ -ERK1/2, sont sensiblement les mêmes en présence de DEP-1 WT, Y1311F ou Y1320F, nos résultats ne suggèrent pas que ces mutations puissent affecter globalement l'activité de DEP-1 envers tous ces substrats. Néanmoins, pour pouvoir conclure quant à l'effet de la phosphorylation de ces résidus sur l'activité catalytique intrinsèque de la phosphatase, il faudrait mesurer l'activité catalytique de ces mutants *in vitro* et la comparer à celle de la phosphatase de type sauvage. À cet effet, les travaux de Arena et al., rapportent que l'activité catalytique de DEP-1 est stimulée suite à sa phosphorylation par Src (10). Pour arriver à cette conclusion, les auteurs ont comparé l'activité catalytique de la phosphatase immunoprécipitée de cellules qui surexpriment une version sauvage (WT), constitutivement active (CA) ou un mutant dominant négatif (DN) de Src. L'activité phosphatase que présentent ces différents immunocomplexes a été mesurée par spectrophotométrie à l'aide d'un substrat synthétique non spécifique, le para-nitrophényl phosphate (pNPP). Lorsqu'elle



est phosphorylée par Src, nos résultats indiquent que DEP-1 est en mesure de lier des protéines qui contiennent des domaines SH2. Il est donc fort probable que les immunocomplexes de DEP-1 issus des cellules qui surexpriment Src (WT ou CA) contiennent d'autres protéines associées aux tyrosines phosphorylées de DEP-1. Par conséquent, l'activité catalytique de ces immunocomplexes pourrait s'avérer plus élevée dû à la co-immunoprécipitation de d'autres protéines possédant une activité phosphatase. Pour démontrer d'une manière plus spécifique que l'activité catalytique de DEP-1 augmente lorsque cette dernière est phosphorylée sur résidus tyrosine, il faudrait donc mesurer l'activité d'une protéine recombinante de DEP-1 suite à sa phosphorylation par Src *in vitro* et la comparer à celle de DEP-1 qui n'a pas été incubée avec Src ou qui est non-phosphorylable (DEP-1 Y1311F et/ou Y1320F). Obtenir une phosphorylation sur résidu tyrosine de DEP-1 WT *in vitro* s'avère néanmoins difficile, voire impossible, en raison de la forte activité d'autodéphosphorylation que présente DEP-1, tout comme il a été rapporté pour la PTP $\epsilon$  (25). Dans le cas de la PTP $\epsilon$ , les auteurs ont donc utilisé une stratégie alternative pour évaluer si la phosphorylation en carboxy-terminale affecte l'activité catalytique de l'enzyme. En effet, les auteurs ont procédé à la mutation de la Y695 de la PTP $\epsilon$  pour un acide glutamique, une modification souvent utilisée pour mimer la phosphorylation sur résidus tyrosine des protéines. Comme la PTP $\epsilon$  WT présente la même activité catalytique que la PTP $\epsilon$  Y695E *in vitro*, leurs résultats suggèrent fortement que la phosphorylation de la PTP $\epsilon$  au niveau de la Y695 dirige l'activité catalytique de la phosphatase vers Src sans affecter globalement son activité catalytique. Une telle stratégie pourrait donc être utilisée afin d'évaluer directement l'effet possible de la phosphorylation des résidus Y1311 et Y1320 sur l'activité catalytique de DEP-1.

La phosphorylation des résidus Y1311 et/ou Y1320 pourrait par ailleurs affecter la capacité de DEP-1 à dimériser. En effet, la phosphorylation de la Y695 de la PTP $\epsilon$  réduirait sa capacité à dimériser (25). Afin d'investiguer cette hypothèse, nous pourrions évaluer la capacité des mutants Y1311F et Y1320F de DEP-1 à former des homodimères dans les cellules endothéliales en effectuant des essais de co-immunoprécipitation avec des constructions de DEP-1 qui présentent deux épitopes différents (HA et FLAG par exemple) comme l'on fait les auteurs de l'étude sur la

PTP $\epsilon$  (25). Un traitement préalable des cellules avec un agent de liaison comme le bis[sulfosuccinimidyl]subérate (BS<sup>3</sup>) pourrait aussi être envisagé pour stabiliser les homodimères avant de procéder aux immunoprécipitations (154).

Ainsi, comme c'est aussi le cas pour la PTP $\alpha$  et la PTP $\epsilon$  (25, 345), nos résultats révèlent que la phosphorylation d'un résidu tyrosine de la queue carboxy-terminale de DEP-1 (Y1320) permettrait l'activation de Src dans les cellules endothéliales stimulées avec le VEGF. De plus, puisque nos résultats indiquent que ce résidu peut être phosphorylé par Src lui-même, nos résultats suggèrent un puissant mécanisme d'auto-activation de Src en réponse au VEGF. Si tel est le cas, la phosphorylation de ce résidu devrait être induite en réponse au VEGF et corrélée avec l'activation de Src. Pour vérifier cette hypothèse, des anticorps phospho-spécifiques dirigés contre les résidus Y1311 et Y1320 seront générés (via Pacific Immunologicals). Ces anticorps pourront par la suite nous permettre de tester de multiples facteurs de croissance ou matrices extracellulaires, afin d'identifier les différents stimuli qui conduisent à la phosphorylation de DEP-1 dans les cellules endothéliales. Cette dernière expérience pourrait par le fait même mettre en évidence d'une manière élégante la participation de DEP-1 à la régulation d'événements de signalisation dans lesquels DEP-1 n'était pas connue jusqu'alors pour jouer un rôle.

En plus de confirmer la phosphorylation des résidus Y1311 et Y1320 au niveau de la protéine Myr-DEP-1 D/A, l'étude de spectrométrie de masse a permis de découvrir qu'un autre résidu, soit la thréonine 1318 (T1318), est aussi phosphorylé au niveau de la queue carboxy-terminale de DEP-1. Cette information est fort intéressante car elle suggère que la phosphorylation de ce résidu pourrait réguler les fonctions de la Y1320, comme c'est le cas pour les résidus S180/S204 de la PTP $\alpha$  qui peuvent réguler les fonctions de la Y789. Lors de l'interphase, la majorité de la PTP $\alpha$  phosphorylée en Y789 est liée au domaine SH2 de Grb2 et cette interaction bloque la liaison du domaine SH2 de Src et son activation par la PTP $\alpha$  (78, 345). Toutefois, lors de la mitose, l'activité catalytique intrinsèque de la PTP $\alpha$  augmente et son affinité pour le domaine SH2 de Grb2 diminue, permettant ainsi l'association de Src à la pY789 et son activation (346). Les mécanismes moléculaires impliqués dans cette augmentation de la spécificité de la PTP $\alpha$  pour le domaine SH2 de Src ne sont toutefois pas connus. Celle-ci se

produit sans que le niveau de phosphorylation de la Y789 ne soit altéré, mais la phosphorylation par la PKC de deux résidus juxtamembranaires, S180 et S204, est nécessaire (344). Il a été suggéré que c'est en induisant un changement de conformation de la PTP $\alpha$  que la phosphorylation des résidus S180 et S204 peut différenciellement réguler l'affinité de liaison de Grb2 et de Src (344). Au niveau de DEP-1, la séquence en carboxy-terminal de la T1318 de DEP-1 correspond exactement au site consensus de phosphorylation par la caséine kinase-2 (casein kinase 2 [CK2]) (S/TXXE/D) (203, 218). La CK2 est une sérine/thréonine kinase ubiquitaire impliquée dans une panoplie de processus biologiques (203). Fait intrigant, la CK2 joue un rôle positif dans l'angiogenèse pathologique (4, 184). Comme il a été rapporté que la phosphorylation par la CK2 peut affecter la conformation tridimensionnelle d'une protéine et sa capacité à interagir avec ses partenaires cellulaires (179, 265), il est tentant de croire que la phosphorylation de la T1318 pourrait modifier l'affinité de liaison du domaine SH2 de Src au niveau de la pY1320.

Finalement, il est important de mentionner que les fonctions vasculaires de DEP-1, de même que celles des autres PTPs reconnues pour déphosphoryler le récepteur VEGFR2, pourraient être davantage reliées à l'angiogenèse survenant chez l'adulte qu'à celle associée au développement embryonnaire. En effet, la délétion complète de DEP-1, contrairement à son inactivation fonctionnelle, n'affecte pas le développement du système vasculaire de la souris. Le développement du système vasculaire des souris déficientes en PTP1B, qui peut aussi déphosphoryler le récepteur VEGFR2 au niveau du complexe des VE-cadhérines, semble aussi a priori normal (84, 181, 332). Il existe certaines molécules, comme par exemple le PLGF (un facteur de croissance spécifique au VEGFR1), TSAd ou encore Akt, pour lesquelles une déficience chez la souris n'affecte pas la formation des vaisseaux sanguins au niveau de l'embryon mais diminue considérablement l'angiogenèse en situation d'ischémie ou de progression tumorale chez l'adulte (2, 55, 214). Fait encore plus intéressant, l'utilisation d'un anticorps dirigé contre le PLGF peut inhiber l'angiogenèse tumorale chez la souris sans nuire aux vaisseaux sanguins normaux (97). Afin d'évaluer si les fonctions de DEP-1 sont davantage sollicitées lors de l'angiogenèse déclenchée chez l'adulte, nous pourrions comparer la réponse angiogénique de souris déficientes en DEP-1 à celle de

souris WT et ce, suite à une ligature de l'artère fémorale de ces souris (modèle d'ischémie) ou l'implantation sous-cutanée de cellules de mélanomes (modèle de progression tumorale). La capacité des cellules endothéliales de ces souris adultes à répondre spécifiquement au VEGF pourrait aussi être comparée à l'aide d'implants de matrigel sous-cutanés dans lesquels le VEGF est injecté. Les souris déficientes en DEP-1 pourraient également être croisées avec des souris prédisposées au développement de certains cancers, de l'arthrite rhumatoïde ou encore de l'athérosclérose puisqu'il a été rapporté que l'angiogenèse contribue au développement de ces maladies (49, 207). C'est entre autre à l'aide de ces modèles de souris que l'on a pu démontrer que le récepteur VEGFR1 jouait un rôle positif dans l'angiogenèse pathologique (207). Advenant le cas où un rôle prépondérant est attribué à DEP-1 dans l'angiogenèse pathologique, les résultats de notre étude pourraient éventuellement mener à l'élaboration de nouvelles stratégies thérapeutiques.

#### **4.1 Conclusions et perspectives thérapeutiques**

Le traitement des patients atteints de cancers colorectaux avec un anticorps neutralisant dirigé contre le VEGF (Avastin/Bevacizumab), en combinaison avec la chimiothérapie, augmente significativement leur survie (156). Ces données encourageantes indiquent donc qu'une meilleure connaissance des mécanismes moléculaires qui régulent la réponse des cellules endothéliales au VEGF pourrait permettre de raffiner les approches anti-angiogéniques et par conséquent, d'optimiser les thérapies anti-cancéreuses. Selon le plus récent modèle d'angiogenèse élaboré par le groupe de Carmeliet, le récepteur VEGFR2 est exprimé à la surface des trois types de cellules endothéliales impliquées dans la formation d'un nouveau rameau vasculaire mais les activités biologiques qui résultent de l'activation du récepteur dans chacune de ces cellules sont distinctes (119, 216). Au niveau de la cellule meneuse, le récepteur VEGFR2 induit la migration alors qu'au niveau des cellules de la tige il induit la prolifération (119). Le récepteur VEGFR2 assurerait finalement la survie des cellules endothéliales de type Phalanx au sein du rameau vasculaire nouvellement formé et connecté à la circulation sanguine (216). Puisque les cellules endothéliales de type Phalanx expriment de grandes quantités de VE-cadhérines (216), il est tentant de croire

que l'expression de DEP-1, et sa localisation au niveau des complexes jonctionnels formés par les VE-cadhérines, pourrait aussi être un déterminant moléculaire impliqué dans la spécification des cellules endothéliales de type Phalanx. Dans ce contexte, les fonctions de DEP-1 seraient de prévenir l'émergence des phénotypes motiles et mitogéniques en diminuant l'activité kinase du récepteur VEGFR2 dans les cellules de type Phalanx, mais aussi d'assurer la survie de ces cellules via l'activation de la voie Src-Gab1-Akt. En d'autres mots, le rôle de DEP-1 dans la régulation du programme angiogénique induit par le VEGF serait de promouvoir la quiescence et le maintien de l'intégrité des rameaux vasculaires naissants.

Dans cette optique, inhiber spécifiquement les fonctions de DEP-1 pour contrer l'angiogenèse pathologique pourrait représenter une nouvelle stratégie thérapeutique intéressante à explorer. En effet, une inhibition de son activité pourrait vraisemblablement conduire à une diminution du nombre de cellules de type Phalanx, à une augmentation du nombre de cellules meneuses/tiges, et par conséquent à une inhibition de la formation de nouveaux vaisseaux sanguins matures et fonctionnels. Il est intéressant de remarquer que ce phénotype hypothétique engendré par une diminution du nombre de cellules endothéliales de type Phalanx, et caractérisé par un nombre excessif de cellules endothéliales et une désorganisation des structures vasculaires, s'apparente fortement à celui que l'on observe au niveau embryonnaire lorsque DEP-1 est fonctionnellement inactivée chez la souris (285).

Les capillaires en formation sont beaucoup plus vulnérables à une inhibition de la signalisation paracrine médiée par le VEGF que les vaisseaux sanguins matures (22, 23, 36, 116, 165, 334). Puisque nos résultats suggèrent que DEP-1 est impliquée, potentiellement via sa pY1320, dans la promotion par le VEGF de la survie des cellules endothéliales, il est tentant de croire qu'un outil thérapeutique ciblant directement ce résidu phosphorylé permettrait de contrer d'une manière plus spécifique l'angiogenèse pathologique. On pourrait donc envisager le développement d'anticorps "intracellulaires" qui cibleraient la pY1320 de DEP-1 afin de bloquer spécifiquement l'activation de la voie de survie Src-Gab1-Akt sans compromettre l'effet antiprolifératif de la déphosphorylation de VEGFR2 par DEP-1. Des stratégies thérapeutiques impliquant le transfert d'ADN codant pour des anticorps, qui agissent à l'intérieur

même de la cellule suite à leur expression, ont déjà été élaborées (34, 289, 319, 320) et il est concevable de croire que des anticorps “perméables” pourront un jour être générés afin d’améliorer cette avenue thérapeutique prometteuse (135).

En conclusion, la découverte majeure des études doctorales présentées dans cette thèse est que DEP-1, présumément via sa tyrosine carboxy-terminale Y1320 phosphorylée, régule positivement le programme angiogénique induit par le VEGF en activant Src et la voie de survie Src-Gab1-Akt dans les cellules endothéliales. Cette découverte laisse donc entrevoir une excitante perspective à long terme, celle de contrôler d’une manière plus spécifique l’angiogenèse pathologique en ciblant ce résidu tyrosine de DEP-1.

## 5. Références

1. **Abu-Ghazaleh, R., J. Kabir, H. Jia, M. Lobo, and I. Zachary.** 2001. Src mediates stimulation by vascular endothelial growth factor of the phosphorylation of focal adhesion kinase at tyrosine 861, and migration and anti-apoptosis in endothelial cells. *Biochem. J.* **360**:255-264.
2. **Ackah, E., J. Yu, S. Zoellner, Y. Iwakiri, C. Skurk, R. Shibata, N. Ouchi, R. M. Easton, G. Galasso, M. J. Birnbaum, K. Walsh, and W. C. Sessa.** 2005. Akt1/protein kinase B $\alpha$  is critical for ischemic and VEGF-mediated angiogenesis. *J. Clin. Invest.* **115**:2119-2127.
3. **Adams, R. H., and K. Alitalo.** 2007. Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**:464-78.
4. **Afzal, A., L. C. Shaw, A. V. Ljubimov, M. E. Boulton, M. S. Segal, and M. B. Grant.** 2007. Retinal and choroidal microangiopathies: therapeutic opportunities. *Microvasc Res* **74**:131-44.
5. **Aicher, B., M. M. Lerch, T. Muller, J. Schilling, and A. Ullrich.** 1997. Cellular redistribution of protein tyrosine phosphatases LAR and PTPsigma by inducible proteolytic processing. *J Cell Biol* **138**:681-96.
6. **Al Masri, A., and S. J. Gendler.** 2005. Muc1 affects c-Src signaling in PyV MT-induced mammary tumorigenesis. *Oncogene* **24**:5799-808.
7. **Amin, D. N., K. Hida, D. R. Bielenberg, and M. Klagsbrun.** 2006. Tumor endothelial cells express epidermal growth factor receptor (EGFR) but not ErbB3 and are responsive to EGF and to EGFR kinase inhibitors. *Cancer Res* **66**:2173-80.
8. **Anders, L., P. Mertins, S. Lammich, M. Murgia, D. Hartmann, P. Saftig, C. Haass, and A. Ullrich.** 2006. Furin-, ADAM 10-, and gamma-secretase-mediated cleavage of a receptor tyrosine phosphatase and regulation of beta-catenin's transcriptional activity. *Mol Cell Biol* **26**:3917-34.
9. **Andersen, J. N., O. H. Mortensen, G. H. Peters, P. G. Drake, L. F. Iversen, O. H. Olsen, P. G. Jansen, H. S. Andersen, N. K. Tonks, and N. P. Moller.** 2001. Structural and evolutionary relationships among protein tyrosine phosphatase domains. *Mol Cell Biol* **21**:7117-36.
10. **Arena, S., A. Pattarozzi, A. Massa, J.-P. Esteve, R. Iuliano, A. Fusco, C. Susini, and T. Florio.** 2007. An Intracellular Multi-Effector Complex Mediates Somatostatin Receptor 1 Activation of Phospho-Tyrosine Phosphatase {eta}. *Mol Endocrinol* **21**:229-246.
11. **Aricescu, A. R., C. Siebold, K. Choudhuri, V. T. Chang, W. Lu, S. J. Davis, P. A. van der Merwe, and E. Y. Jones.** 2007. Structure of a tyrosine phosphatase adhesive interaction reveals a spacer-clamp mechanism. *Science* **317**:1217-20.
12. **Arregui, C. O., J. Balsamo, and J. Lilien.** 1998. Impaired integrin-mediated adhesion and signaling in fibroblasts expressing a dominant-negative mutant PTP1B. *J Cell Biol* **143**:861-73.
13. **Ashikari-Hada, S., H. Habuchi, Y. Kariya, and K. Kimata.** 2005. Heparin regulates vascular endothelial growth factor165-dependent mitogenic activity,

- tube formation, and its receptor phosphorylation of human endothelial cells. Comparison of the effects of heparin and modified heparins. *J Biol Chem* **280**:31508-15.
14. **Autero, M., J. Saharinen, T. Pessa-Morikawa, M. Soula-Rothhut, C. Oetken, M. Gassmann, M. Bergman, K. Alitalo, P. Burn, C. G. Gahmberg, and et al.** 1994. Tyrosine phosphorylation of CD45 phosphotyrosine phosphatase by p50csk kinase creates a binding site for p56lck tyrosine kinase and activates the phosphatase. *Mol Cell Biol* **14**:1308-21.
  15. **Banville, D., R. Stocco, and S. H. Shen.** 1995. Human protein tyrosine phosphatase 1C (PTPN6) gene structure: alternate promoter usage and exon skipping generate multiple transcripts. *Genomics* **27**:165-73.
  16. **Barleon, B., S. Sozzani, D. Zhou, H. A. Weich, A. Mantovani, and D. Marme.** 1996. Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor flt-1. *Blood* **87**:3336-43.
  17. **Barr, A. J., E. Ugochukwu, W. H. Lee, O. N. King, P. Filippakopoulos, I. Alfano, P. Savitsky, N. A. Burgess-Brown, S. Muller, and S. Knapp.** 2009. Large-scale structural analysis of the classical human protein tyrosine phosphatome. *Cell* **136**:352-63.
  18. **Bates, D., N. Hillman, T. Pocock, and C. Neal.** 2002. Regulation of microvascular permeability by vascular endothelial growth factors. *J Anat* **200**:529-530.
  19. **Baumer, S., L. Keller, A. Holtmann, R. Funke, B. August, A. Gamp, H. Wolburg, K. Wolburg-Buchholz, U. Deutsch, and D. Vestweber.** 2006. Vascular endothelial cell-specific phosphotyrosine phosphatase (VE-PTP) activity is required for blood vessel development. *Blood* **107**:4754-62.
  20. **Bazzoni, G., and E. Dejana.** 2004. Endothelial cell-to-cell junctions: molecular organization and role in vascular homeostasis. *Physiol Rev* **84**:869-901.
  21. **Benjamin, L.** 2000. The controls of microvascular survival. *Cancer Metastasis Rev.* **19**:75-81.
  22. **Benjamin, L. E., D. Golojanin, A. Itin, D. Pode, and E. Keshet.** 1999. Selective ablation of immature blood vessels in established human tumors follows vascular endothelial growth factor withdrawal. *J. Clin. Invest.* **103**:159-165.
  23. **Benjamin, L. E., I. Hemo, and E. Keshet.** 1998. A plasticity window for blood vessel remodelling is defined by pericyte coverage of the preformed endothelial network and is regulated by PDGF-B and VEGF. *Development* **125**:1591-8.
  24. **Bennett, A. M., T. L. Tang, S. Sugimoto, C. T. Walsh, and B. G. Neel.** 1994. Protein-tyrosine-phosphatase SHPTP2 couples platelet-derived growth factor receptor beta to Ras. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**:7335-9.
  25. **Berman-Golan, D., and A. Elson.** 2007. Neu-mediated phosphorylation of protein tyrosine phosphatase epsilon is critical for activation of Src in mammary tumor cells. *Oncogene* **26**:7028-37.
  26. **Berset, T. A., E. F. Hoier, and A. Hajnal.** 2005. The *C. elegans* homolog of the mammalian tumor suppressor Dep-1/Sccl inhibits EGFR signaling to regulate binary cell fate decisions. *Genes Dev* **19**:1328-40.



27. **Bhandari, V., K. L. Lim, and C. J. Pallen.** 1998. Physical and functional interactions between receptor-like protein-tyrosine phosphatase alpha and p59fyn. *J Biol Chem* **273**:8691-8.
28. **Bilwes, A. M., J. den Hertog, T. Hunter, and J. P. Noel.** 1996. Structural basis for inhibition of receptor protein-tyrosine phosphatase-alpha by dimerization. *Nature* **382**:555-9.
29. **Bjorge, J. D., A. Pang, and D. J. Fujita.** 2000. Identification of protein-tyrosine phosphatase 1B as the major tyrosine phosphatase activity capable of dephosphorylating and activating c-Src in several human breast cancer cell lines. *J Biol Chem* **275**:41439-46.
30. **Blanchetot, C., M. Chagnon, N. Dube, M. Halle, and M. L. Tremblay.** 2005. Substrate-trapping techniques in the identification of cellular PTP targets. *Methods* **35**:44-53.
31. **Blanchetot, C., L. G. Tertoolen, and J. den Hertog.** 2002. Regulation of receptor protein-tyrosine phosphatase alpha by oxidative stress. *EMBO J* **21**:493-503.
32. **Blanes, M. G., M. Oubaha, Y. Rautureau, and J.-P. Gratton.** 2007. Phosphorylation of tyrosine 801 of the VEGFR-2 is necessary for AKT-dependent eNOS activation and nitric oxide release from endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **282**:10660-10669.
33. **Boggon, T. J., and M. J. Eck.** 2004. Structure and regulation of Src family kinases. *Oncogene* **23**:7918-27.
34. **Boldicke, T., H. Weber, P. P. Mueller, B. Barleon, and M. Bernal.** 2005. Novel highly efficient intrabody mediates complete inhibition of cell surface expression of the human vascular endothelial growth factor receptor-2 (VEGFR-2/KDR). *J Immunol Methods* **300**:146-59.
35. **Borges, L. G., R. A. Seifert, F. J. Grant, C. E. Hart, C. M. Disteche, S. Edelhoff, F. F. Solca, M. A. Lieberman, V. Lindner, E. H. Fischer, S. Lok, and D. F. Bowen-Pope.** 1996. Cloning and characterization of rat Density-Enhanced Phosphatase-1, a protein tyrosine phosphatase expressed by vascular cells. *Circ. Res.* **79**:570-580.
36. **Borgstrom, P., M. A. Bourdon, K. J. Hillan, P. Sriramarao, and N. Ferrara.** 1998. Neutralizing anti-vascular endothelial growth factor antibody completely inhibits angiogenesis and growth of human prostate carcinoma micro tumors in vivo. *Prostate* **35**:1-10.
37. **Brady-Kalnay, S. M., A. J. Flint, and N. K. Tonks.** 1993. Homophilic binding of PTP mu, a receptor-type protein tyrosine phosphatase, can mediate cell-cell aggregation. *J Cell Biol* **122**:961-72.
38. **Brady-Kalnay, S. M., D. L. Rimm, and N. K. Tonks.** 1995. Receptor protein tyrosine phosphatase PTPmu associates with cadherins and catenins in vivo. *J Cell Biol* **130**:977-86.
39. **Brooks, P. C., R. A. Clark, and D. A. Cheresh.** 1994. Requirement of vascular integrin alpha v beta 3 for angiogenesis. *Science* **264**:569-71.
40. **Broome, M. A., and T. Hunter.** 1997. The PDGF receptor phosphorylates Tyr 138 in the c-Src SH3 domain in vivo reducing peptide ligand binding. *Oncogene* **14**:17-34.

41. **Brunet, A., A. Bonni, M. J. Zigmund, M. Z. Lin, P. Juo, L. S. Hu, M. J. Anderson, K. C. Arden, J. Blenis, and M. E. Greenberg.** 1999. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* **96**:857-68.
42. **Brunton, V. G., E. Avizienyte, V. J. Fincham, B. Serrels, C. A. Metcalf, 3rd, T. K. Sawyer, and M. C. Frame.** 2005. Identification of Src-specific phosphorylation site on focal adhesion kinase: dissection of the role of Src SH2 and catalytic functions and their consequences for tumor cell behavior. *Cancer Res* **65**:1335-42.
43. **Buist, A., Y. L. Zhang, Y. F. Keng, L. Wu, Z. Y. Zhang, and J. den Hertog.** 1999. Restoration of potent protein-tyrosine phosphatase activity into the membrane-distal domain of receptor protein-tyrosine phosphatase alpha. *Biochemistry* **38**:914-22.
44. **Burridge, K., S. K. Sastry, and J. L. Sallee.** 2006. Regulation of cell adhesion by protein-tyrosine phosphatases. I. Cell-matrix adhesion. *J Biol Chem* **281**:15593-6.
45. **Byth, K. F., L. A. Conroy, S. Howlett, A. J. Smith, J. May, D. R. Alexander, and N. Holmes.** 1996. CD45-null transgenic mice reveal a positive regulatory role for CD45 in early thymocyte development, in the selection of CD4+CD8+ thymocytes, and B cell maturation. *J Exp Med* **183**:1707-18.
46. **Campan, M., M. Yoshizumi, N. G. Seidah, M. E. Lee, C. Bianchi, and E. Haber.** 1996. Increased proteolytic processing of protein tyrosine phosphatase mu in confluent vascular endothelial cells: the role of PC5, a member of the subtilisin family. *Biochemistry* **35**:3797-802.
47. **Cantley, L. C.** 2002. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* **296**:1655-7.
48. **Cardone, M. H., N. Roy, H. R. Stennicke, G. S. Salvesen, T. F. Franke, E. Stanbridge, S. Frisch, and J. C. Reed.** 1998. Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science* **282**:1318-21.
49. **Carmeliet, P.** 2003. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med* **9**:653-60.
50. **Carmeliet, P.** 2005. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* **438**:932-6.
51. **Carmeliet, P., F. De Smet, S. Loges, and M. Mazzone.** 2009. Branching morphogenesis and antiangiogenesis candidates: tip cells lead the way. *Nat Rev Clin Oncol* **6**:315-26.
52. **Carmeliet, P., V. Ferreira, G. Breier, S. Pollefeyt, L. Kieckens, M. Gertsenstein, M. Fahrig, A. Vandenhoeck, K. Harpal, and C. e. a. Eberhardt.** 1996. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* **380**:435-439.
53. **Carmeliet, P., and R. K. Jain.** 2000. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* **407**:249-257.
54. **Carmeliet, P., M. G. Lampugnani, L. Moons, F. Breviario, V. Compernelle, F. Bono, G. Balconi, R. Spagnuolo, B. Oosthuysen, M. Dewerchin, A. Zanetti, A. Angellilo, V. Mattot, D. Nuyens, E. Lutgens, F. Clotman, M. C. de Ruiter, A. Gittenberger-de Groot, R. Poelmann, F. Lupu, J. M. Herbert, D. Collen, and E. Dejana.** 1999. Targeted deficiency or cytosolic truncation of the

- VE-cadherin gene in mice impairs VEGF-mediated endothelial survival and angiogenesis. *Cell* **98**:147-57.
55. **Carmeliet, P., L. Moons, A. Luttun, V. Vincenti, V. Compernelle, M. De Mol, Y. Wu, F. Bono, L. Devy, H. Beck, D. Scholz, T. Acker, T. DiPalma, M. Dewerchin, A. Noel, I. Stalmans, A. Barra, S. Blacher, T. Vandendriessche, A. Ponten, U. Eriksson, K. H. Plate, J. M. Foidart, W. Schaper, D. S. Charnock-Jones, D. J. Hicklin, J. M. Herbert, D. Collen, and M. G. Persico.** 2001. Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. *Nat Med* **7**:575-83.
  56. **Caron, C., K. Spring, M. Laramee, C. Chabot, M. Cloutier, H. Gu, and I. Royal.** 2009. Non-redundant roles of the Gab1 and Gab2 scaffolding adapters in VEGF-mediated signalling, migration, and survival of endothelial cells. *Cell Signal*.
  57. **Chabot, C., K. Spring, J. P. Gratton, M. Elchebly, and I. Royal.** 2009. New role for the protein tyrosine phosphatase DEP-1 in Akt activation and endothelial cell survival. *Mol Cell Biol* **29**:241-53.
  58. **Chan, T. O., U. Rodeck, A. M. Chan, A. C. Kimmelman, S. E. Rittenhouse, G. Panayotou, and P. N. Tsichlis.** 2002. Small GTPases and tyrosine kinases coregulate a molecular switch in the phosphoinositide 3-kinase regulatory subunit. *Cancer Cell* **1**:181-91.
  59. **Chen, J., S. PR, O. Razorenova, W. Chen, N. Hay, P. Bornstein, and T. Byzova.** 2005. Akt1 regulates pathological angiogenesis, vascular maturation and permeability in vivo. *Nature Med.* **11**:1188-1196.
  60. **Chen, W. S., P. Z. Xu, K. Gottlob, M. L. Chen, K. Sokol, T. Shiyanova, I. Roninson, W. Weng, R. Suzuki, K. Tobe, T. Kadowaki, and N. Hay.** 2001. Growth retardation and increased apoptosis in mice with homozygous disruption of the Akt1 gene. *Genes Dev* **15**:2203-8.
  61. **Cheng, A., G. S. Bal, B. P. Kennedy, and M. L. Tremblay.** 2001. Attenuation of adhesion-dependent signaling and cell spreading in transformed fibroblasts lacking protein tyrosine phosphatase-1B. *J Biol Chem* **276**:25848-55.
  62. **Cheng, J., K. Wu, M. Armanini, N. O'Rourke, D. Dowbenko, and L. A. Lasky.** 1997. A novel protein-tyrosine phosphatase related to the homotypically adhering kappa and mu receptors. *J Biol Chem* **272**:7264-77.
  63. **Cho, H., J. Mu, J. K. Kim, J. L. Thorvaldsen, Q. Chu, E. B. Crenshaw, 3rd, K. H. Kaestner, M. S. Bartolomei, G. I. Shulman, and M. J. Birnbaum.** 2001. Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB beta). *Science* **292**:1728-31.
  64. **Cho, H., J. L. Thorvaldsen, Q. Chu, F. Feng, and M. J. Birnbaum.** 2001. Akt1/PKBalpha is required for normal growth but dispensable for maintenance of glucose homeostasis in mice. *J Biol Chem* **276**:38349-52.
  65. **Chong, Y. P., T. D. Mulhern, and H. C. Cheng.** 2005. C-terminal Src kinase (CSK) and CSK-homologous kinase (CHK)--endogenous negative regulators of Src-family protein kinases. *Growth Factors* **23**:233-44.

66. **Compagni, A., P. Wilgenbus, M. A. Impagnatiello, M. Cotten, and G. Christofori.** 2000. Fibroblast growth factors are required for efficient tumor angiogenesis. *Cancer Res* **60**:7163-9.
67. **Cuevas, B. D., Y. Lu, M. Mao, J. Zhang, R. LaPushin, K. Siminovitch, and G. B. Mills.** 2001. Tyrosine phosphorylation of p85 relieves its inhibitory activity on phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem* **276**:27455-61.
68. **Cunningham, S., M. Arrate, T. Brock, and W. MN.** 1997. Interactions of FLT-1 and KDR with Phospholipase C : Identification of the Phosphotyrosine Binding Sites. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **240**:635-639.
69. **Dance, M., A. Montagner, A. Yart, B. Masri, Y. Audigier, B. Perret, J.-P. Salles, and P. Raynal.** 2006. The adaptor protein Gab1 couples the stimulation of vascular endothelial growth factor receptor-2 to the activation of phosphoinositide 3-kinase. *J. Biol. Chem.* **281**:23285-23295.
70. **Datta, S. R., H. Dudek, X. Tao, S. Masters, H. Fu, Y. Gotoh, and M. E. Greenberg.** 1997. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* **91**:231-41.
71. **de la Fuente-Garcia, M. A., J. M. Nicolas, J. H. Freed, E. Palou, A. P. Thomas, R. Vilella, J. Vives, and A. Gaya.** 1998. CD148 is a membrane protein tyrosine phosphatase present in all hematopoietic lineages and is involved in signal transduction on lymphocytes. *Blood* **91**:2800-9.
72. **De Smet, F., I. Segura, K. De Bock, P. J. Hohensinner, and P. Carmeliet.** 2009. Mechanisms of vessel branching: filopodia on endothelial tip cells lead the way. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **29**:639-49.
73. **Dejana, E.** 2004. Endothelial cell-cell junctions: happy together. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**:261-70.
74. **Dejana, E., F. Orsenigo, and M. G. Lampugnani.** 2008. The role of adherens junctions and VE-cadherin in the control of vascular permeability. *J Cell Sci* **121**:2115-22.
75. **Del Vecchio, R. L., and N. K. Tonks.** 2005. The conserved immunoglobulin domain controls the subcellular localization of the homophilic adhesion receptor protein-tyrosine phosphatase mu. *J Biol Chem* **280**:1603-12.
76. **den Hertog, J., A. Ostman, and F. D. Bohmer.** 2008. Protein tyrosine phosphatases: regulatory mechanisms. *FEBS J* **275**:831-47.
77. **den Hertog, J., J. Sap, C. E. Pals, J. Schlessinger, and W. Kruijer.** 1995. Stimulation of receptor protein-tyrosine phosphatase alpha activity and phosphorylation by phorbol ester. *Cell Growth Differ* **6**:303-7.
78. **den Hertog, J., S. Tracy, and T. Hunter.** 1994. Phosphorylation of receptor protein-tyrosine phosphatase alpha on Tyr789, a binding site for the SH3-SH2-SH3 adaptor protein GRB-2 in vivo. *EMBO J* **13**:3020-32.
79. **Desai, D. M., J. Sap, J. Schlessinger, and A. Weiss.** 1993. Ligand-mediated negative regulation of a chimeric transmembrane receptor tyrosine phosphatase. *Cell* **73**:541-54.
80. **Dimmeler, S., I. Fleming, B. Fisslthaler, C. Hermann, R. Busse, and A. M. Zeiher.** 1999. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature (London)* **399**:601-605.

81. **Dixit, M., A. E. Loot, A. Mohamed, B. Fisslthaler, C. M. Boulanger, B. Ceacareanu, A. Hassid, R. Busse, and I. Fleming.** 2005. Gab1, SHP2, and protein kinase A are crucial for the activation of the endothelial NO synthase by fluid shear stress. *Circ. Res.* **97**:1236-1244.
82. **Dominguez, M. G., V. C. Hughes, L. Pan, M. Simmons, C. Daly, K. Anderson, I. Noguera-Troise, A. J. Murphy, D. M. Valenzuela, S. Davis, G. Thurston, G. D. Yancopoulos, and N. W. Gale.** 2007. Vascular endothelial tyrosine phosphatase (VE-PTP)-null mice undergo vasculogenesis but die embryonically because of defects in angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**:3243-8.
83. **Dougher-Vermazen, M., J. D. Humes, P. Böhlen, and B. I. Terman.** 1994. Biological activity and phosphorylation sites of the bacterially expressed cytosolic domain of the KDR VEGF-receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **205**:728-738.
84. **Elchebly, M., P. Payette, E. Michaliszyn, W. Cromlish, S. Collins, A. L. Loy, D. Normandin, A. Cheng, J. Himms-Hagen, C. C. Chan, C. Ramachandran, M. J. Gresser, M. L. Tremblay, and B. P. Kennedy.** 1999. Increased insulin sensitivity and obesity resistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatase-1B gene. *Science* **283**:1544-8.
85. **Eliceiri, B. P., R. Paul, P. L. Schwartzberg, J. D. Hood, J. Leng, and D. A. Cheresh.** 1999. Selective requirement for Src kinases during VEGF-induced angiogenesis and vascular permeability. *Mol. Cell* **4**:915-924.
86. **Elson, A., and P. Leder.** 1995. Identification of a cytoplasmic, phorbol ester-inducible isoform of protein tyrosine phosphatase epsilon. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**:12235-9.
87. **Elson, A., and P. Leder.** 1995. Protein-tyrosine phosphatase epsilon. An isoform specifically expressed in mouse mammary tumors initiated by v-Ha-ras OR neu. *J Biol Chem* **270**:26116-22.
88. **Eremina, V., J. A. Jefferson, J. Kowalewska, H. Hochster, M. Haas, J. Weisstuch, C. Richardson, J. B. Kopp, M. G. Kabir, P. H. Backx, H. P. Gerber, N. Ferrara, L. Barisoni, C. E. Alpers, and S. E. Quaggin.** 2008. VEGF inhibition and renal thrombotic microangiopathy. *N Engl J Med* **358**:1129-36.
89. **Esser, S., M. G. Lampugnani, M. Corada, E. Dejana, and W. Risau.** 1998. Vascular endothelial growth factor induces VE-cadherin tyrosine phosphorylation in endothelial cells. *J. Cell Sci.* **111**:1853-1865.
90. **Estrach, S., J. Legg, and F. M. Watt.** 2007. Syntenin mediates Delta1-induced cohesiveness of epidermal stem cells in culture. *J Cell Sci* **120**:2944-52.
91. **Fachinger, G., U. Deutsch, and W. Risau.** 1999. Functional interaction of vascular endothelial-protein-tyrosine phosphatase with the angiopoietin receptor Tie-2. *Oncogene* **18**:5948-53.
92. **Falet, H., S. Pain, and F. Rendu.** 1998. Tyrosine unphosphorylated platelet SHP-1 is a substrate for calpain. *Biochem Biophys Res Commun* **252**:51-5.
93. **Feng, G. S., C. C. Hui, and T. Pawson.** 1993. SH2-containing phosphotyrosine phosphatase as a target of protein-tyrosine kinases. *Science* **259**:1607-11.

94. **Ferrara, N.** 2005. The role of VEGF in the regulation of physiological and pathological angiogenesis, p. 209-231. *In* M. Clauss and G. Breier (ed.), *EXS.*, vol. 94. Birkhäuser Verlag, Basel.
95. **Ferrara, N., K. Carver-Moore, H. Chen, M. Dowd, L. Lu, K. S. O'Shea, L. Powell-Braxton, K. J. Hillan, and M. W. Moore.** 1996. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* **380**:439-42.
96. **Ferrara, N., H.-P. Gerber, and J. LeCouter.** 2003. The biology of VEGF and its receptors. *Nat. Med.* **9**:669-676.
97. **Fischer, C., B. Jonckx, M. Mazzone, S. Zacchigna, S. Loges, L. Pattarini, E. Chorianopoulos, L. Liesenborghs, M. Koch, M. De Mol, M. Autiero, S. Wyns, S. Plaisance, L. Moons, N. van Rooijen, M. Giacca, J. M. Stassen, M. Dewerchin, D. Collen, and P. Carmeliet.** 2007. Anti-PlGF inhibits growth of VEGF(R)-inhibitor-resistant tumors without affecting healthy vessels. *Cell* **131**:463-75.
98. **Flint, A. J., M. F. Gebbink, B. R. Franza, Jr., D. E. Hill, and N. K. Tonks.** 1993. Multi-site phosphorylation of the protein tyrosine phosphatase, PTP1B: identification of cell cycle regulated and phorbol ester stimulated sites of phosphorylation. *EMBO J* **12**:1937-46.
99. **Flint, A. J., T. Tiganis, D. Barford, and N. K. Tonks.** 1997. Development of "substrate-trapping" mutants to identify physiological substrates of protein tyrosine phosphatases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:1680-5.
100. **Florio, T.** 2008. Somatostatin/somatostatin receptor signalling: Phosphotyrosine phosphatases. *Mol Cell Endocrinol* **286**:40-8.
101. **Folkman, J.** 1995. Angiogenesis in cancer, vasculature, rheumatoid and other diseases. *Nat. Med.* **1**:27-31.
102. **Fong, G.-H., J. Rossant, M. Gertsenstein, and M. L. Breitman.** 1995. Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature (London)* **376**:66-70.
103. **Fong, G. H., L. Zhang, D. M. Bryce, and J. Peng.** 1999. Increased hemangioblast commitment, not vascular disorganization, is the primary defect in flt-1 knock-out mice. *Development* **126**:3015-25.
104. **Frisch, S. M., K. Vuori, E. Ruoslahti, and P. Y. Chan-Hui.** 1996. Control of adhesion-dependent cell survival by focal adhesion kinase. *J. Cell Biol.* **134**:793-799.
105. **Fu, Z., and D. J. Tindall.** 2008. FOXOs, cancer and regulation of apoptosis. *Oncogene* **27**:2312-9.
106. **Fuchs, M., T. Muller, M. M. Lerch, and A. Ullrich.** 1996. Association of human protein-tyrosine phosphatase kappa with members of the armadillo family. *J Biol Chem* **271**:16712-9.
107. **Fujio, Y., and K. Walsh.** 1999. Akt mediates cytoprotection of endothelial cells by vascular endothelial growth factor in an anchorage-dependent manner. *J. Biol. Chem.* **274**:16349-16354.
108. **Fujisawa, H., T. Kitsukawa, A. Kawakami, S. Takagi, M. Shimizu, and T. Hirata.** 1997. Roles of a neuronal cell-surface molecule, neuropilin, in nerve fiber fasciculation and guidance. *Cell Tissue Res* **290**:465-70.

109. **Fukumura, D., T. Gohongi, A. Kadambi, Y. Izumi, J. Ang, C. O. Yun, D. G. Buerk, P. L. Huang, and R. K. Jain.** 2001. Predominant role of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis and vascular permeability. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:2604-9.
110. **Fulton, D., J.-P. Gratton, T. J. McCabe, J. Fontana, Y. Fujio, K. Walsh, T. F. Franke, A. Papapetropoulos, and W. C. Sessa.** 1999. Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature* **399**:597-601.
111. **Fulton, D., J.-P. Gratton, and W. C. Sessa.** 2001. Post-translational control of endothelial nitric oxide synthase: why isn't calcium/calmodulin enough? *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **299**:818-824.
112. **Gaits, F., R. Y. Li, A. Ragab, J. M. Ragab-Thomas, and H. Chap.** 1995. Increase in receptor-like protein tyrosine phosphatase activity and expression level on density-dependent growth arrest of endothelial cells. *Biochem J* **311** ( Pt 1):97-103.
113. **Garton, A. J., and N. K. Tonks.** 1994. PTP-PEST: a protein tyrosine phosphatase regulated by serine phosphorylation. *EMBO J* **13**:3763-71.
114. **Gavard, J.** 2009. Breaking the VE-cadherin bonds. *FEBS Lett* **583**:1-6.
115. **Gerber, H. P., V. Dixit, and N. Ferrara.** 1998. Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells. *J Biol Chem* **273**:13313-6.
116. **Gerber, H. P., K. J. Hillan, A. M. Ryan, J. Kowalski, G. A. Keller, L. Rangell, B. D. Wright, F. Radtke, M. Aguet, and N. Ferrara.** 1999. VEGF is required for growth and survival in neonatal mice. *Development* **126**:1149-59.
117. **Gerber, H. P., A. K. Malik, G. P. Solar, D. Sherman, X. H. Liang, G. Meng, K. Hong, J. C. Marsters, and N. Ferrara.** 2002. VEGF regulates haematopoietic stem cell survival by an internal autocrine loop mechanism. *Nature* **417**:954-8.
118. **Gerber, H. P., A. McMurtrey, J. Kowalski, M. Yan, B. A. Keyt, V. Dixit, and N. Ferrara.** 1998. Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. *J. Biol. Chem.* **273**:30336-30343.
119. **Gerhardt, H., M. Golding, M. Fruttiger, C. Ruhrberg, A. Lundkvist, A. Abramsson, M. Jeltsch, C. Mitchell, K. Alitalo, D. Shima, and C. Betsholtz.** 2003. VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *J Cell Biol* **161**:1163-77.
120. **Giannoni, E., G. Raugei, P. Chiarugi, and G. Ramponi.** 2006. A novel redox-based switch: LMW-PTP oxidation enhances Grb2 binding and leads to ERK activation. *Biochem Biophys Res Commun* **348**:367-73.
121. **Gil-Henn, H., and A. Elson.** 2003. Tyrosine phosphatase-epsilon activates Src and supports the transformed phenotype of Neu-induced mammary tumor cells. *J Biol Chem* **278**:15579-86.
122. **Gille, H., J. Kowalski, B. Li, J. LeCouter, B. Moffat, T. F. Zioncheck, N. Pelletier, and N. Ferrara.** 2001. Analysis of biological effects and signaling properties of Flt-1 (VEGFR-1) and KDR (VEGFR-2). *J. Biol. Chem.* **276**:3222-3230.

123. **Groen, A., J. Overvoorde, T. van der Wijk, and J. den Hertog.** 2008. Redox regulation of dimerization of the receptor protein-tyrosine phosphatases RPTPalpha, LAR, RPTPmu and CD45. *FEBS J* **275**:2597-604.
124. **Gu, F., D. T. Nguyen, M. Stuble, N. Dube, M. L. Tremblay, and E. Chevet.** 2004. Protein-tyrosine phosphatase 1B potentiates IRE1 signaling during endoplasmic reticulum stress. *J Biol Chem* **279**:49689-93.
125. **Gu, H., and B. G. Neel.** 2003. The "Gab" in signal transduction. *Trends Cell Biol* **13**:122-30.
126. **Guo, D., Q. Jia, H.-Y. Song, R. S. Warren, and D. B. Donner.** 1995. Vascular endothelial cell growth factor promotes tyrosine phosphorylation of mediators of signal transduction that contain SH2 domains. *J. Biol. Chem.* **270**:6729-6733.
127. **Guo, D. Q., L. W. Wu, J. D. Dunbar, O. N. Ozes, L. D. Mayo, K. M. Kessler, J. A. Gustin, M. R. Baerwald, E. A. Jaffe, R. S. Warren, and D. B. Donner.** 2000. Tumor necrosis factor employs a protein-tyrosine phosphatase to inhibit activation of KDR and vascular endothelial cell growth factor-induced endothelial cell proliferation. *J Biol Chem* **275**:11216-21.
128. **Ha, C. H., A. M. Bennett, and Z. G. Jin.** 2008. A novel role of vascular endothelial cadherin in modulating c-Src activation and downstream signaling of vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* **283**:7261-70.
129. **Haj, F. G., P. J. Verveer, A. Squire, B. G. Neel, and P. I. Bastiaens.** 2002. Imaging sites of receptor dephosphorylation by PTP1B on the surface of the endoplasmic reticulum. *Science* **295**:1708-11.
130. **Halle, M., Y. C. Liu, S. Hardy, J. F. Theberge, C. Blanchetot, A. Bourdeau, T. C. Meng, and M. L. Tremblay.** 2007. Caspase-3 regulates catalytic activity and scaffolding functions of the protein tyrosine phosphatase PEST, a novel modulator of the apoptotic response. *Mol Cell Biol* **27**:1172-90.
131. **Harder, K. W., N. P. Moller, J. W. Peacock, and F. R. Jirik.** 1998. Protein-tyrosine phosphatase alpha regulates Src family kinases and alters cell-substratum adhesion. *J Biol Chem* **273**:31890-900.
132. **Hattori, K., B. Heissig, Y. Wu, S. Dias, R. Tejada, B. Ferris, D. J. Hicklin, Z. Zhu, P. Bohlen, L. Witte, J. Hendrikx, N. R. Hackett, R. G. Crystal, M. A. Moore, Z. Werb, D. Lyden, and S. Rafii.** 2002. Placental growth factor reconstitutes hematopoiesis by recruiting VEGFR1(+) stem cells from bone-marrow microenvironment. *Nat Med* **8**:841-9.
133. **He, H., V. J. Venema, X. Gu, R. C. Venema, and M. B. Marrero.** 1999. Vascular endothelial growth factor signals endothelial cell production of nitric oxide and prostacyclin through Flk/KDR activation of c-Src. *J. Biol. Chem.* **274**:25130-25135.
134. **Hellstrom, M., L. K. Phng, J. J. Hofmann, E. Wallgard, L. Coultas, P. Lindblom, J. Alva, A. K. Nilsson, L. Karlsson, N. Gaiano, K. Yoon, J. Rossant, M. L. Iruela-Arispe, M. Kalen, H. Gerhardt, and C. Betsholtz.** 2007. Dll4 signalling through Notch1 regulates formation of tip cells during angiogenesis. *Nature* **445**:776-80.
135. **Heng, B. C., and T. Cao.** 2005. Making cell-permeable antibodies (Transbody) through fusion of protein transduction domains (PTD) with single chain variable



- fragment (scFv) antibodies: potential advantages over antibodies expressed within the intracellular environment (Intrabody). *Med Hypotheses* **64**:1105-8.
136. **Hermiston, M. L., Z. Xu, and A. Weiss.** 2003. CD45: a critical regulator of signaling thresholds in immune cells. *Annu Rev Immunol* **21**:107-37.
  137. **Hernandez, M. V., M. G. Sala, J. Balsamo, J. Lilien, and C. O. Arregui.** 2006. ER-bound PTP1B is targeted to newly forming cell-matrix adhesions. *J Cell Sci* **119**:1233-43.
  138. **Hiratsuka, S., Y. Maru, A. Okada, M. Seiki, T. Noda, and M. Shibuya.** 2001. Involvement of Flt-1 tyrosine kinase (vascular endothelial growth factor receptor-1) in pathological angiogenesis. *Cancer Res* **61**:1207-13.
  139. **Hiratsuka, S., O. Minowa, J. Kuno, T. Noda, and M. Shibuya.** 1998. Flt-1 lacking the tyrosine kinase domain is sufficient for normal development and angiogenesis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:9349-54.
  140. **Holmes, K., O. L. Roberts, A. M. Thomas, and M. J. Cross.** 2007. Vascular endothelial growth factor receptor-2: Structure, function, intracellular signalling and therapeutic inhibition. *Cell. Signal.* **19**:2003-2012.
  141. **Holmqvist, K., M. J. Cross, C. Rolny, R. Hagerkvist, N. Rahimi, T. Matsumoto, L. Claesson-Welsh, and M. Welsh.** 2004. The adaptor protein Shb binds to tyrosine 1175 in the VEGFR-2 and regulates VEGF-dependent cellular migration. *J. Biol. Chem.* **279**:22267-22275.
  142. **Holsinger, L. J., K. Ward, B. Duffield, J. Zachwieja, and B. Jallal.** 2002. The transmembrane receptor protein tyrosine phosphatase DEP1 interacts with p120(ctn). *Oncogene* **21**:7067-76.
  143. **Honda, H., J. Inazawa, J. Nishida, Y. Yazaki, and H. Hirai.** 1994. Molecular cloning, characterization, and chromosomal localization of a novel protein-tyrosine phosphatase, HPTP eta. *Blood* **84**:4186-4194.
  144. **Hornig, C., and H. A. Weich.** 1999. Soluble VEGF receptors. *Angiogenesis* **3**:33-9.
  145. **Horowitz, A., and M. Simons.** 2008. Branching Morphogenesis. *Circ Res* **103**:784-795.
  146. **Houck, K. A., D. W. Leung, A. M. Rowland, J. Winer, and N. Ferrara.** 1992. Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms. *J Biol Chem* **267**:26031-7.
  147. **Hungerford, J. E., M. T. Compton, M. L. Matter, B. G. Hoffstrom, and C. A. Otey.** 1996. Inhibition of pp125FAK in cultured fibroblasts results in apoptosis. *J. Cell Biol.* **135**:1383-1390.
  148. **Huntington, N. D., and D. M. Tarlinton.** 2004. CD45: direct and indirect government of immune regulation. *Immunol Lett* **94**:167-74.
  149. **Huyer, G., S. Liu, J. Kelly, J. Moffat, P. Payette, B. Kennedy, G. Tsapralis, M. J. Gresser, and C. Ramachandran.** 1997. Mechanism of inhibition of protein-tyrosine phosphatases by vanadate and pervanadate. *J. Biol. Chem.* **272**:843-851.
  150. **Ibarra-Sanchez, M. J., P. D. Simoncic, F. R. Nestel, P. Duplay, W. S. Lapp, and M. L. Tremblay.** 2000. The T-cell protein tyrosine phosphatase. *Semin Immunol* **12**:379-86.

151. **Ibrahimi, O. A., F. Zhang, S. C. Hrstka, M. Mohammadi, and R. J. Linhardt.** 2004. Kinetic model for FGF, FGFR, and proteoglycan signal transduction complex assembly. *Biochemistry* **43**:4724-30.
152. **Ichaso, N., and S. M. Dilworth.** 2001. Cell transformation by the middle T-antigen of polyoma virus. *Oncogene* **20**:7908-7916.
153. **Iervolino, A., R. Iuliano, F. Trapasso, G. Viglietto, R. M. Melillo, F. Carlomagno, M. Santoro, and A. Fusco.** 2006. The receptor-type protein tyrosine phosphatase J antagonizes the biochemical and biological effects of RET-derived oncoproteins. *Cancer Res* **66**:6280-7.
154. **Iuliano, R., C. Raso, A. Quintiero, I. L. Pera, F. Pichiorri, T. Palumbo, D. Palmieri, A. Pattarozzi, T. Florio, G. Viglietto, F. Trapasso, C. M. Croce, and A. Fusco.** 2009. The eighth fibronectin type III domain of Protein Tyrosine Phosphatase Receptor J influences the formation of protein complexes and cell localization. *J Biochem.*
155. **Iwashima, M., B. A. Irving, N. S. van Oers, A. C. Chan, and A. Weiss.** 1994. Sequential interactions of the TCR with two distinct cytoplasmic tyrosine kinases. *Science* **263**:1136-9.
156. **Jain, R. K., D. G. Duda, J. W. Clark, and J. S. Loeffler.** 2006. Lessons from phase III clinical trials on anti-VEGF therapy for cancer. *Nat Clin Pract Oncol* **3**:24-40.
157. **Jakobsson, L., J. Kreuger, K. Holmborn, L. Lundin, I. Eriksson, L. Kjellen, and L. Claesson-Welsh.** 2006. Heparan sulfate in trans potentiates VEGFR-mediated angiogenesis. *Dev Cell* **10**:625-34.
158. **Jallal, B., K. Mossie, G. Vasiloudis, P. Knyazev, J. Zachwieja, F. Clairvoyant, J. Schilling, and A. Ullrich.** 1997. The Receptor-like Protein-tyrosine Phosphatase DEP-1 Is Constitutively Associated with a 64-kDa Protein Serine/ Threonine Kinase. *J. Biol. Chem.* **272**:12158-12163.
159. **Jandt, E., K. Denner, M. Kovalenko, A. Ostman, and F. D. Bohmer.** 2003. The protein-tyrosine phosphatase DEP-1 modulates growth factor-stimulated cell migration and cell-matrix adhesion. *Oncogene* **22**:4175-85.
160. **Jia, Z., D. Barford, A. J. Flint, and N. K. Tonks.** 1995. Structural basis for phosphotyrosine peptide recognition by protein tyrosine phosphatase 1B. *Science* **268**:1754-8.
161. **Jiang, G., J. den Hertog, and T. Hunter.** 2000. Receptor-like protein tyrosine phosphatase alpha homodimerizes on the cell surface. *Mol Cell Biol* **20**:5917-29.
162. **Jiang, G., J. den Hertog, J. Su, J. Noel, J. Sap, and T. Hunter.** 1999. Dimerization inhibits the activity of receptor-like protein-tyrosine phosphatase-alpha. *Nature* **401**:606-10.
163. **Johnson, K. G., A. P. Tenney, A. Ghose, A. M. Duckworth, M. E. Higashi, K. Parfitt, O. Marcu, T. R. Heslip, J. L. Marsh, T. L. Schwarz, J. G. Flanagan, and D. Van Vactor.** 2006. The HSPGs Syndecan and Dallylike bind the receptor phosphatase LAR and exert distinct effects on synaptic development. *Neuron* **49**:517-31.
164. **Julien, S. G., N. Dube, M. Read, J. Penney, M. Paquet, Y. Han, B. P. Kennedy, W. J. Muller, and M. L. Tremblay.** 2007. Protein tyrosine

- phosphatase 1B deficiency or inhibition delays ErbB2-induced mammary tumorigenesis and protects from lung metastasis. *Nat Genet* **39**:338-46.
165. **Kamba, T., B. Y. Tam, H. Hashizume, A. Haskell, B. Sennino, M. R. Mancuso, S. M. Norberg, S. M. O'Brien, R. B. Davis, L. C. Gowen, K. D. Anderson, G. Thurston, S. Joho, M. L. Springer, C. J. Kuo, and D. M. McDonald.** 2006. VEGF-dependent plasticity of fenestrated capillaries in the normal adult microvasculature. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **290**:H560-76.
  166. **Kaminski, R., R. Zagozdzon, Y. Fu, P. Mroz, W. Fu, S. Seng, S. Avraham, and H. K. Avraham.** 2006. Role of SRC kinases in Neu-induced tumorigenesis: challenging the paradigm using Csk homologous kinase transgenic mice. *Cancer Res* **66**:5757-62.
  167. **Kanno, S., N. Oda, M. Abe, Y. Terai, M. Ito, K. Shitara, K. Tabayashi, M. Shibuya, and Y. Sato.** 2000. Roles of two VEGF receptors, Flt-1 and KDR, in the signal transduction of VEGF effects in human vascular endothelial cells. *Oncogene* **19**:2138-2146.
  168. **Kappert, K., K. G. Peters, F. D. Bohmer, and A. Ostman.** 2005. Tyrosine phosphatases in vessel wall signaling. *Cardiovasc Res* **65**:587-98.
  169. **Kawabuchi, M., Y. Satomi, T. Takao, Y. Shimonishi, S. Nada, K. Nagai, A. Tarakhovsky, and M. Okada.** 2000. Transmembrane phosphoprotein Cbp regulates the activities of Src-family tyrosine kinases. *Nature* **404**:999-1003.
  170. **Kawamura, H., X. Li, K. Goishi, L. A. van Meeteren, L. Jakobsson, S. Cebe-Suarez, A. Shimizu, D. Edholm, K. Ballmer-Hofer, L. Kjellen, M. Klagsbrun, and L. Claesson-Welsh.** 2008. Neuropilin-1 in regulation of VEGF-induced activation of p38MAPK and endothelial cell organization. *Blood* **112**:3638-49.
  171. **Kawasaki, T., T. Kitsukawa, Y. Bekku, Y. Matsuda, M. Sanbo, T. Yagi, and H. Fujisawa.** 1999. A requirement for neuropilin-1 in embryonic vessel formation. *Development* **126**:4895-902.
  172. **Keane, M., G. Lowrey, S. Ettenberg, M. Dayton, and S. Lipkowitz.** 1996. The protein tyrosine phosphatase DEP-1 is induced during differentiation and inhibits growth of breast cancer cells. *Cancer Res.* **56**:4236-4243.
  173. **Kellie, S., G. Craggs, I. N. Bird, and G. E. Jones.** 2004. The tyrosine phosphatase DEP-1 induces cytoskeletal rearrangements, aberrant cell-substratum interactions and a reduction in cell proliferation. *J Cell Sci* **117**:609-18.
  174. **Kendall, R. L., R. Z. Rutledge, X. Mao, A. J. Tebben, R. W. Hungate, and K. A. Thomas.** 1999. Vascular endothelial growth factor receptor KDR tyrosine kinase activity is increased by autophosphorylation of two activation loop tyrosine residues. *J. Biol. Chem.* **274**:6453-6460.
  175. **Kendall, R. L., and K. A. Thomas.** 1993. Inhibition of vascular endothelial growth factor activity by endogenously encoded soluble receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**:10705-10709.
  176. **Keyt, B. A., H. V. Nguyen, L. T. Berleau, C. M. Duarte, J. Park, H. Chen, and N. Ferrara.** 1996. Identification of vascular endothelial growth factor determinants for binding KDR and FLT-1 receptors. Generation of receptor-

- selective VEGF variants by site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.* **271**:5638-5646.
177. **Khurana, R., M. Simons, J. F. Martin, and I. C. Zachary.** 2005. Role of angiogenesis in cardiovascular disease: a critical appraisal. *Circulation* **112**:1813-1824.
178. **Kim, M. J., E. Kim, S. H. Ryu, and P. G. Suh.** 2000. The mechanism of phospholipase C-gamma1 regulation. *Exp Mol Med* **32**:101-9.
179. **Kim, M. K., M. R. Kang, H. W. Nam, Y. S. Bae, Y. S. Kim, and I. K. Chung.** 2008. Regulation of telomeric repeat binding factor 1 binding to telomeres by casein kinase 2-mediated phosphorylation. *J Biol Chem* **283**:14144-52.
180. **Kishihara, K., J. Penninger, V. A. Wallace, T. M. Kundig, K. Kawai, A. Wakeham, E. Timms, K. Pfeffer, P. S. Ohashi, M. L. Thomas, and et al.** 1993. Normal B lymphocyte development but impaired T cell maturation in CD45-exon6 protein tyrosine phosphatase-deficient mice. *Cell* **74**:143-56.
181. **Klaman, L. D., O. Boss, O. D. Peroni, J. K. Kim, J. L. Martino, J. M. Zabolotny, N. Moghal, M. Lubkin, Y. B. Kim, A. H. Sharpe, A. Stricker-Krongrad, G. I. Shulman, B. G. Neel, and B. B. Kahn.** 2000. Increased energy expenditure, decreased adiposity, and tissue-specific insulin sensitivity in protein-tyrosine phosphatase 1B-deficient mice. *Mol Cell Biol* **20**:5479-89.
182. **Klinghoffer, R. A., C. Sachsenmaier, J. A. Cooper, and P. Soriano.** 1999. Src family kinases are required for integrin but not PDGFR signal transduction. *EMBO J* **18**:2459-71.
183. **Kovalenko, M., K. Denner, J. Sandström, C. Persson, S. Gross, E. Jandt, R. Vilella, F. Böhmer, and A. Ostman.** 2000. Site-selective dephosphorylation of the platelet-derived growth factor beta-receptor by the receptor-like protein-tyrosine phosphatase DEP-1. *J. Biol. Chem.* **275**:16219-16226.
184. **Kramerov, A. A., M. Saghizadeh, S. Caballero, L. C. Shaw, S. Li Calzi, M. Bretner, M. Montenarh, L. A. Pinna, M. B. Grant, and A. V. Ljubimov.** 2008. Inhibition of protein kinase CK2 suppresses angiogenesis and hematopoietic stem cell recruitment to retinal neovascularization sites. *Mol Cell Biochem* **316**:177-86.
185. **Kroll, J., and J. Waltenberger.** 1997. The vascular endothelial growth factor receptor KDR activates multiple signal transduction pathways in porcine aortic endothelial cells. *J Biol Chem* **272**:32521-7.
186. **Kung, C., J. T. Pingel, M. Heikinheimo, T. Klemola, K. Varkila, L. I. Yoo, K. Vuopala, M. Poyhonen, M. Uhari, M. Rogers, S. H. Speck, T. Chatila, and M. L. Thomas.** 2000. Mutations in the tyrosine phosphatase CD45 gene in a child with severe combined immunodeficiency disease. *Nat Med* **6**:343-5.
187. **Lamalice, L., F. Houle, and J. Huot.** 2006. 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.* **281**:34009-34020.
188. **Lamalice, L., F. Houle, G. Jourdan, and J. Huot.** 2004. Phosphorylation of tyrosine 1214 on VEGFR2 is required for VEGF-induced activation of CDC42 upstream of SAPK2/p38. *Oncogene* **23**:434-445.

189. **Lambeng, N., Y. Wallez, C. Rampon, F. Cand, G. Christe, D. Gulino-Debrac, I. Vilgrain, and P. Huber.** 2005. Vascular endothelial-cadherin tyrosine phosphorylation in angiogenic and quiescent adult tissues. *Circ Res* **96**:384-91.
190. **Lammers, R., B. Bossenmaier, D. E. Cool, N. K. Tonks, J. Schlessinger, E. H. Fischer, and A. Ullrich.** 1993. Differential activities of protein tyrosine phosphatases in intact cells. *J Biol Chem* **268**:22456-62.
191. **Lammers, R., M. M. Lerch, and A. Ullrich.** 2000. The carboxyl-terminal tyrosine residue of protein-tyrosine phosphatase alpha mediates association with focal adhesion plaques. *J Biol Chem* **275**:3391-6.
192. **Lampugnani, M. G., M. Corada, L. Caveda, F. Breviario, O. Ayalon, B. Geiger, and E. Dejana.** 1995. The molecular organization of endothelial cell to cell junctions: differential association of plakoglobin, beta-catenin, and alpha-catenin with vascular endothelial cadherin (VE-cadherin). *J Cell Biol* **129**:203-17.
193. **Lampugnani, M. G., A. Zanetti, M. Corada, T. Takahashi, G. Balconi, F. Breviario, F. Orsenigo, A. Cattelino, R. Kemler, T. O. Daniel, and E. Dejana.** 2003. Contact inhibition of VEGF-induced proliferation requires vascular endothelial cadherin,  $\beta$ -catenin, and the phosphatase DEP-1/CD148. *J. Cell Biol.* **161**:793-804.
194. **Laramée, M., C. Chabot, M. Cloutier, R. Stenne, M. Holgado-Madruga, A. J. Wong, and I. Royal.** 2007. The scaffolding adapter Gab1 mediates vascular endothelial growth factor signaling and is required for endothelial cell migration and capillary formation. *J. Biol. Chem.* **282**:7758-7769.
195. **Le Pera, I., R. Iuliano, T. Florio, C. Susini, F. Trapasso, M. Santoro, L. Chiariotti, G. Schettini, G. Vigierto, and A. Fusco.** 2005. The rat tyrosine phosphatase eta increases cell adhesion by activating c-Src through dephosphorylation of its inhibitory phosphotyrosine residue. *Oncogene* **24**:3187-3195.
196. **Lee, S., T. T. Chen, C. L. Barber, M. C. Jordan, J. Murdock, S. Desai, N. Ferrara, A. Nagy, K. P. Roos, and M. L. Iruela-Arispe.** 2007. Autocrine VEGF Signaling Is Required for Vascular Homeostasis. *Cell* **130**:691-703.
197. **Lee, S., C. Faux, J. Nixon, D. Alete, J. Chilton, M. Hawadle, and A. W. Stoker.** 2007. Dimerization of protein tyrosine phosphatase sigma governs both ligand binding and isoform specificity. *Mol Cell Biol* **27**:1795-808.
198. **Lee, S., S. M. Jilani, G. V. Nikolova, D. Carpizo, and M. L. Iruela-Arispe.** 2005. Processing of VEGF-A by matrix metalloproteinases regulates bioavailability and vascular patterning in tumors. *J Cell Biol* **169**:681-91.
199. **Li, B., G. Fuh, G. Meng, X. Xin, M. E. Gerritsen, B. Cunningham, and A. M. de Vos.** 2000. Receptor-selective variants of human vascular endothelial growth factor. *J. Biol. Chem.* **275**:29823-29828.
200. **Li, X., M. Meriane, I. triki, M. Shekarabi, T. E. Kennedy, L. Larose, and N. Lamarche-Vane.** 2002. The adaptor protein Nck-1 couples the Netrin-1 receptor DCC (Deleted in colorectal cancer) to the activation of the small GTPase Rac1 through an atypical mechanism. *J. Biol. Chem.* **277**:37788-37797.

201. **Liang, F., S. Y. Lee, J. Liang, D. S. Lawrence, and Z. Y. Zhang.** 2005. The role of protein-tyrosine phosphatase 1B in integrin signaling. *J Biol Chem* **280**:24857-63.
202. **Lilien, J., and J. Balsamo.** 2005. The regulation of cadherin-mediated adhesion by tyrosine phosphorylation/dephosphorylation of beta-catenin. *Curr Opin Cell Biol* **17**:459-65.
203. **Litchfield, D. W.** 2003. Protein kinase CK2: structure, regulation and role in cellular decisions of life and death. *Biochem J* **369**:1-15.
204. **Longo, F. M., J. A. Martignetti, J. M. Le Beau, J. S. Zhang, J. P. Barnes, and J. Brosius.** 1993. Leukocyte common antigen-related receptor-linked tyrosine phosphatase. Regulation of mRNA expression. *J Biol Chem* **268**:26503-11.
205. **Lu, W., D. Gong, D. Bar-Sagi, and P. A. Cole.** 2001. Site-specific incorporation of a phosphotyrosine mimetic reveals a role for tyrosine phosphorylation of SHP-2 in cell signaling. *Mol Cell* **8**:759-69.
206. **Luttun, A., and P. Carmeliet.** 2003. Soluble VEGF receptor Flt1: the elusive preeclampsia factor discovered? *J Clin Invest* **111**:600-2.
207. **Luttun, A., M. Tjwa, L. Moons, Y. Wu, A. Angelillo-Scherrer, F. Liao, J. A. Nagy, A. Hooper, J. Priller, B. De Klerck, V. Compernelle, E. Daci, P. Bohlen, M. Dewerchin, J. M. Herbert, R. Fava, P. Matthys, G. Carmeliet, D. Collen, H. F. Dvorak, D. J. Hicklin, and P. Carmeliet.** 2002. Revascularization of ischemic tissues by PlGF treatment, and inhibition of tumor angiogenesis, arthritis and atherosclerosis by anti-Flt1. *Nat Med* **8**:831-40.
208. **Lyden, D., K. Hattori, S. Dias, C. Costa, P. Blaikie, L. Butros, A. Chadburn, B. Heissig, W. Marks, L. Witte, Y. Wu, D. Hicklin, Z. Zhu, N. R. Hackett, R. G. Crystal, M. A. Moore, K. A. Hajjar, K. Manova, R. Benezra, and S. Rafii.** 2001. Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth. *Nat Med* **7**:1194-201.
209. **Majeti, R., A. M. Bilwes, J. P. Noel, T. Hunter, and A. Weiss.** 1998. Dimerization-induced inhibition of receptor protein tyrosine phosphatase function through an inhibitory wedge. *Science* **279**:88-91.
210. **Maksumova, L., Y. Wang, N. K. Wong, H. T. Le, C. J. Pallen, and P. Johnson.** 2007. Differential function of PTPalpha and PTPalpha Y789F in T cells and regulation of PTPalpha phosphorylation at Tyr-789 by CD45. *J Biol Chem* **282**:20925-32.
211. **Manning, B. D., and L. C. Cantley.** 2007. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* **129**:1261-1274.
212. **Marin-Padilla, M.** 1985. Early vascularization of the embryonic cerebral cortex: Golgi and electron microscopic studies. *J Comp Neurol* **241**:237-49.
213. **Martin, G. S.** 2001. The hunting of the Src. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**:467-75.
214. **Matsumoto, T., S. Bohman, J. Dixelius, A. Berge, A. Dimberg, P. Magnusson, L. Wang, C. Wikner, J. H. Qi, C. Wernstedt, J. Wu, S. Bruheim, H. Mugishima, D. Mukhopadhyay, A. Spurkland, and L.**

- Claesson-Welsh.** 2005. VEGF receptor-2 Y951 signaling and a role for the adapter molecule TSAd in tumor angiogenesis. *EMBO J.* **24**:2342-2353.
215. **Mattila, E., K. Auvinen, M. Salmi, and J. Ivaska.** 2008. The protein tyrosine phosphatase TCPTP controls VEGFR2 signalling. *J Cell Sci* **121**:3570-80.
216. **Mazzone, M., D. Dettori, R. Leite de Oliveira, S. Loges, T. Schmidt, B. Jonckx, Y. M. Tian, A. A. Lanahan, P. Pollard, C. Ruiz de Almodovar, F. De Smet, S. Vinckier, J. Aragonés, K. Debackere, A. Lutun, S. Wyns, B. Jordan, A. Pisacane, B. Gallez, M. G. Lampugnani, E. Dejana, M. Simons, P. Ratcliffe, P. Maxwell, and P. Carmeliet.** 2009. Heterozygous deficiency of PHD2 restores tumor oxygenation and inhibits metastasis via endothelial normalization. *Cell* **136**:839-51.
217. **Mee, P. J., M. Turner, M. A. Basson, P. S. Costello, R. Zamoyska, and V. L. Tybulewicz.** 1999. Greatly reduced efficiency of both positive and negative selection of thymocytes in CD45 tyrosine phosphatase-deficient mice. *Eur J Immunol* **29**:2923-33.
218. **Meggio, F., and L. A. Pinna.** 2003. One-thousand-and-one substrates of protein kinase CK2? *FASEB J* **17**:349-68.
219. **Mellberg, S., A. Dimberg, F. Bahram, M. Hayashi, E. Rennel, A. Ameer, J. O. Westholm, E. Larsson, P. Lindahl, M. J. Cross, and L. Claesson-Welsh.** 2009. Transcriptional profiling reveals a critical role for tyrosine phosphatase VE-PTP in regulation of VEGFR2 activity and endothelial cell morphogenesis. *FASEB J.*
220. **Meyer, M., M. Clauss, A. Lepple-Wienhues, J. Waltenberger, H. G. Augustin, M. Ziche, C. Lanz, M. Buttner, H. J. Rziha, and C. Dehio.** 1999. A novel vascular endothelial growth factor encoded by Orf virus, VEGF-E, mediates angiogenesis via signalling through VEGFR-2 (KDR) but not VEGFR-1 (Flt-1) receptor tyrosine kinases. *EMBO J* **18**:363-74.
221. **Michell, B. J., J. E. Griffiths, K. I. Mitchelhill, I. Rodriguez-Crespo, T. Tiganis, S. Bozinovski, P. R. O. de Montellano, B. E. Kemp, and R. B. Pearson.** 1999. The Akt kinase signals directly to endothelial nitric oxide synthase. *Curr. Biol.* **9**:845-848.
222. **Mitola, S., B. Brenchio, M. Piccinini, L. Tertoolen, L. Zammataro, G. Breier, M. T. Rinaudo, J. den Hertog, M. Arese, and F. Bussolino.** 2006. Type I collagen limits VEGFR-2 signaling by a SHP2 protein-tyrosine phosphatase-dependent mechanism 1. *Circ Res* **98**:45-54.
223. **Motley, E. D., K. Eguchi, M. M. Patterson, P. D. Palmer, H. Suzuki, and S. Eguchi.** 2007. Mechanism of endothelial nitric oxide synthase phosphorylation and activation by thrombin. *Hypertension* **49**:577-583.
224. **Munshi, N., J. E. Groopman, P. S. Gill, and R. K. Ganju.** 2000. c-Src mediates mitogenic signals and associates with cytoskeletal proteins upon vascular endothelial growth factor stimulation in Kaposi's sarcoma cells. *J. Immunol.* **164**:1169-1174.
225. **Nakagami, H., T. X. Cui, M. Iwai, T. Shiuchi, Y. Takeda-Matsubara, L. Wu, and M. Horiuchi.** 2002. Tumor necrosis factor-alpha inhibits growth factor-mediated cell proliferation through SHP-1 activation in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **22**:238-42.

226. **Nakamura, Y., N. Patrushev, H. Inomata, D. Mehta, N. Urao, H. W. Kim, M. Razvi, V. Kini, K. Mahadev, B. J. Goldstein, R. McKinney, T. Fukai, and M. Ushio-Fukai.** 2008. Role of protein tyrosine phosphatase 1B in vascular endothelial growth factor signaling and cell-cell adhesions in endothelial cells. *Circ Res* **102**:1182-91.
227. **Nawroth, R., G. Poell, A. Ranft, S. Kloep, U. Samulowitz, G. Fachinger, M. Golding, D. T. Shima, U. Deutsch, and D. Vestweber.** 2002. VE-PTP and VE-cadherin ectodomains interact to facilitate regulation of phosphorylation and cell contacts. *EMBO J* **21**:4885-95.
228. **Neufeld, G., T. Cohen, S. Gengrinovitch, and Z. Poltorak.** 1999. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J* **13**:9-22.
229. **Neufeld, G., O. Kessler, and Y. Herzog.** 2002. The interaction of Neuropilin-1 and Neuropilin-2 with tyrosine-kinase receptors for VEGF. *Adv Exp Med Biol* **515**:81-90.
230. **Noguera-Troise, I., C. Daly, N. J. Papadopoulos, S. Coetzee, P. Boland, N. W. Gale, H. C. Lin, G. D. Yancopoulos, and G. Thurston.** 2006. Blockade of Dll4 inhibits tumour growth by promoting non-productive angiogenesis. *Nature* **444**:1032-7.
231. **Nottebaum, A. F., G. Cagna, M. Winderlich, A. C. Gamp, R. Linnepe, C. Polaschegg, K. Filippova, R. Lyck, B. Engelhardt, O. Kamenyeva, M. G. Bixel, S. Butz, and D. Vestweber.** 2008. VE-PTP maintains the endothelial barrier via plakoglobin and becomes dissociated from VE-cadherin by leukocytes and by VEGF. *J Exp Med* **205**:2929-45.
232. **Ogata, M., M. Sawada, A. Kosugi, and T. Hamaoka.** 1994. Developmentally regulated expression of a murine receptor-type protein tyrosine phosphatase in the thymus. *J Immunol* **153**:4478-87.
233. **Olsson, A.-K., A. Dimberg, J. Kreuger, and L. Claesson-Welsh.** 2006. VEGF receptor signalling; in control of vascular function. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **7**:359-371.
234. **Ong, S. H., S. Dilworth, I. Hauck-Schmalenberger, T. Pawson, and F. Kiefer.** 2001. ShcA and Grb2 mediate polyoma middle T antigen-induced endothelial transformation and Gab1 tyrosine phosphorylation. *EMBO J.* **20**:6327-6336.
235. **Ostman, A., and F. D. Bohmer.** 2001. Regulation of receptor tyrosine kinase signaling by protein tyrosine phosphatases. *Trends Cell Biol* **11**:258-66.
236. **Ostman, A., Q. Yang, and N. Tonks.** 1994. Expression of DEP-1, a receptor-like protein-tyrosine-phosphatase, is enhanced with increasing cell density. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**:9680-9684.
237. **Palka, H. L., M. Park, and N. K. Tonks.** 2003. Hepatocyte growth factor receptor tyrosine kinase met is a substrate of the receptor protein-tyrosine phosphatase DEP-1. *J Biol Chem* **278**:5728-35.
238. **Park, J. E., G. A. Keller, and N. Ferrara.** 1993. The vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms: differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of extracellular matrix-bound VEGF. *Mol Biol Cell* **4**:1317-26.



239. **Parsons, S. J., and J. T. Parsons.** 2004. Src family kinases, key regulators of signal transduction. *Oncogene* **23**:7906-9.
240. **Pera, I. L., R. Iuliano, T. Florio, C. Susini, F. Trapasso, M. Santoro, L. Chiariotti, G. Schettini, G. Viglietto, and A. Fusco.** 2005. The rat tyrosine phosphatase eta increases cell adhesion by activating c-Src through dephosphorylation of its inhibitory phosphotyrosine residue. *Oncogene* **24**:3187-95.
241. **Piedra, J., S. Miravet, J. Castano, H. G. Palmer, N. Heisterkamp, A. Garcia de Herreros, and M. Dunach.** 2003. p120 Catenin-associated Fer and Fyn tyrosine kinases regulate beta-catenin Tyr-142 phosphorylation and beta-catenin-alpha-catenin Interaction. *Mol Cell Biol* **23**:2287-97.
242. **Playford, M. P., and M. D. Schaller.** 2004. The interplay between Src and integrins in normal and tumor biology. *Oncogene* **23**:7928-46.
243. **Presta, M., P. Dell'Era, S. Mitola, E. Moroni, R. Ronca, and M. Rusnati.** 2005. Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev* **16**:159-78.
244. **Rahimi, N., V. Dayanir, and K. Lashkari.** 2000. Receptors chimeras indicate that the vascular endothelial growth factor receptor-1 (VEGFR-1) modulates mitogenic activity of VEGFR-2 in endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **275**:16986-16992.
245. **Rhee, S. G.** 2006. Cell signaling. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a necessary evil for cell signaling. *Science* **312**:1882-3.
246. **Ridley, A. J., H. F. Paterson, C. L. Johnston, D. Diekmann, and A. Hall.** 1992. The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell* **70**:401-410.
247. **Risau, W.** 1997. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* **386**:671-674.
248. **Roach, T., S. Slater, M. Koval, L. White, E. D. Cahir McFarland, M. Okumura, M. Thomas, and E. Brown.** 1997. CD45 regulates Src family member kinase activity associated with macrophage integrin-mediated adhesion. *Curr Biol* **7**:408-17.
249. **Roca, C., and R. H. Adams.** 2007. Regulation of vascular morphogenesis by Notch signaling. *Genes Dev* **21**:2511-24.
250. **Rodriguez, F., A. Vacaru, J. Overvoorde, and J. den Hertog.** 2008. The receptor protein-tyrosine phosphatase, Dep1, acts in arterial/venous cell fate decisions in zebrafish development. *Dev Biol* **324**:122-30.
251. **Rolny, C., I. Nilsson, P. Magnusson, A. Armulik, L. Jakobsson, P. Wentzel, P. Lindblom, J. Norlin, C. Betsholtz, R. Heuchel, M. Welsh, and L. Claesson-Welsh.** 2006. Platelet-derived growth factor receptor-beta promotes early endothelial cell differentiation. *Blood* **108**:1877-86.
252. **Roskoski, R., Jr.** 2005. Src kinase regulation by phosphorylation and dephosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun* **331**:1-14.
253. **Roura, S., S. Miravet, J. Piedra, A. Garcia de Herreros, and M. Dunach.** 1999. Regulation of E-cadherin/Catenin association by tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem* **274**:36734-40.
254. **Royal, I., N. Lamarche-Vane, L. Lamorte, K. Kaibuchi, and M. Park.** 2000. Activation of Cdc42, Rac, PAK and Rho-kinase in response to hepatocyte

- growth factor differentially regulate epithelial cell colony spreading and dissociation. *Mol. Biol. Cell* **11**:1709-1725.
255. **Ruch, C., G. Skiniotis, M. O. Steinmetz, T. Walz, and K. Ballmer-Hofer.** 2007. Structure of a VEGF-VEGF receptor complex determined by electron microscopy. *Nat Struct Mol Biol* **14**:249-50.
  256. **Ruhrberg, C., H. Gerhardt, M. Golding, R. Watson, S. Ioannidou, H. Fujisawa, C. Betsholtz, and D. T. Shima.** 2002. Spatially restricted patterning cues provided by heparin-binding VEGF-A control blood vessel branching morphogenesis. *Genes Dev* **16**:2684-98.
  257. **Ruivenkamp, C. A. L., T. van Wezel, C. Zanon, A. P. M. Stassen, C. Vleck, T. Csikos, A. M. Klous, N. Tripodis, A. Perrakis, L. Boerrigter, P. C. Groot, J. Lindeman, W. J. Mooi, G. A. Meijjer, G. Scholten, H. Dauwerse, V. Paces, N. van Zandwijk, G. J. B. van Ommen, and P. Demant.** 2002. Ptpnj is a candidate for the mouse colon-cancer susceptibility locus *Sccl* and is frequently deleted in human cancers. *Nat. Genet.* **31**:295-300.
  258. **Saijo, K., C. Schmedt, I. H. Su, H. Karasuyama, C. A. Lowell, M. Reth, T. Adachi, A. Patke, A. Santana, and A. Tarakhovsky.** 2003. Essential role of Src-family protein tyrosine kinases in NF-kappaB activation during B cell development. *Nat Immunol* **4**:274-9.
  259. **Sallee, J. L., E. S. Wittchen, and K. Burridge.** 2006. Regulation of cell adhesion by protein-tyrosine phosphatases: II. Cell-cell adhesion. *J Biol Chem* **281**:16189-92.
  260. **Salmeen, A., J. N. Andersen, M. P. Myers, T. C. Meng, J. A. Hinks, N. K. Tonks, and D. Barford.** 2003. Redox regulation of protein tyrosine phosphatase 1B involves a sulphenyl-amide intermediate. *Nature* **423**:769-73.
  261. **Salmeen, A., and D. Barford.** 2005. Functions and mechanisms of redox regulation of cysteine-based phosphatases. *Antioxid Redox Signal* **7**:560-77.
  262. **Sap, J., Y. P. Jiang, D. Friedlander, M. Grumet, and J. Schlessinger.** 1994. Receptor tyrosine phosphatase R-PTP-kappa mediates homophilic binding. *Mol Cell Biol* **14**:1-9.
  263. **Schindler, T., F. Sicheri, A. Pico, A. Gazit, A. Levitzki, and J. Kuriyan.** 1999. Crystal structure of Hck in complex with a Src family-selective tyrosine kinase inhibitor. *Mol Cell* **3**:639-48.
  264. **Schmidt-Arras, D. E., A. Bohmer, B. Markova, C. Choudhary, H. Serve, and F. D. Bohmer.** 2005. Tyrosine phosphorylation regulates maturation of receptor tyrosine kinases. *Mol Cell Biol* **25**:3690-703.
  265. **Semplici, F., F. Meggio, L. A. Pinna, and S. Oliviero.** 2002. CK2-dependent phosphorylation of the E2 ubiquitin conjugating enzyme UBC3B induces its interaction with beta-TrCP and enhances beta-catenin degradation. *Oncogene* **21**:3978-87.
  266. **Shalaby, F., J. Rossant, T. P. Yamaguchi, M. Gertsenstein, X.-F. Wu, M. L. Breitman, and A. C. Schuh.** 1995. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature (London)* **376**:62-66.
  267. **Sicheri, F., I. Moarefi, and J. Kuriyan.** 1997. Crystal structure of the Src family tyrosine kinase Hck. *Nature* **385**:602-9.

268. **Skelton, M. R., S. Ponniah, D. Z. Wang, T. Doetschman, C. V. Vorhees, and C. J. Pallen.** 2003. Protein tyrosine phosphatase alpha (PTP alpha) knockout mice show deficits in Morris water maze learning, decreased locomotor activity, and decreases in anxiety. *Brain Res* **984**:1-10.
269. **Soker, S., H. Q. Miao, M. Nomi, S. Takashima, and M. Klagsbrun.** 2002. VEGF165 mediates formation of complexes containing VEGFR-2 and neuropilin-1 that enhance VEGF165-receptor binding. *J Cell Biochem* **85**:357-68.
270. **Soldi, R., S. Mitola, M. Strasly, P. Defilippi, G. Tarone, and F. Bussolino.** 1999. Role of alphavbeta3 integrin in the activation of vascular endothelial growth factor receptor-2. *EMBO J* **18**:882-92.
271. **Songyang, Z., S. E. Shoelson, M. Chaudhuri, G. Gish, T. Pawson, W. G. Haser, F. King, T. Roberts, S. Ratnofsky, R. J. Lechleider, B. G. Neel, R. B. Birge, J. E. Fajardo, M. M. Chou, H. Hanafusa, B. Schaffhausen, and L. C. Cantley.** 1993. SH2 domains recognize specific phosphopeptide sequences. *Cell* **72**:767-778.
272. **Songyang, Z., S. E. Shoelson, J. McGlade, P. Olivier, T. Pawson, X. R. Bustelo, M. Barbacid, H. Sabe, H. Hanafusa, T. Yi, R. Ren, D. Baltimore, S. Ratnofsky, R. A. Feldman, and L. C. Cantley.** 1994. Specific motifs recognized by the SH2 domains of Csk, 3BP2, fps/fes, GRB-2, HCP, SHC, Syk, and Vav. *Mol. Cell. Biol.* **14**:2777-2785.
273. **Sorby, M., J. Sandstrom, and A. Ostman.** 2001. An extracellular ligand increases the specific activity of the receptor-like protein tyrosine phosphatase DEP-1. *Oncogene* **20**:5219-24.
274. **Stein, P. L., H. Vogel, and P. Soriano.** 1994. Combined deficiencies of Src, Fyn, and Yes tyrosine kinases in mutant mice. *Genes Dev* **8**:1999-2007.
275. **Stover, D. R., H. Charbonneau, N. K. Tonks, and K. A. Walsh.** 1991. Protein-tyrosine-phosphatase CD45 is phosphorylated transiently on tyrosine upon activation of Jurkat T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**:7704-7.
276. **Stover, D. R., P. Furet, and N. B. Lydon.** 1996. Modulation of the SH2 binding specificity and kinase activity of Src by tyrosine phosphorylation within its SH2 domain. *J Biol Chem* **271**:12481-7.
277. **Streuli, M., N. X. Krueger, P. D. Ariniello, M. Tang, J. M. Munro, W. A. Blattler, D. A. Adler, C. M. Disteche, and H. Saito.** 1992. Expression of the receptor-linked protein tyrosine phosphatase LAR: proteolytic cleavage and shedding of the CAM-like extracellular region. *EMBO J* **11**:897-907.
278. **Su, J., A. Batzer, and J. Sap.** 1994. Receptor tyrosine phosphatase R-PTP-alpha is tyrosine-phosphorylated and associated with the adaptor protein Grb2. *J Biol Chem* **269**:18731-4.
279. **Su, J., M. Muranjan, and J. Sap.** 1999. Receptor protein tyrosine phosphatase alpha activates Src-family kinases and controls integrin-mediated responses in fibroblasts. *Curr Biol* **9**:505-11.
280. **Suchting, S., C. Freitas, F. le Noble, R. Benedito, C. Breant, A. Duarte, and A. Eichmann.** 2007. The Notch ligand Delta-like 4 negatively regulates endothelial tip cell formation and vessel branching. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**:3225-30.

281. **Sugano, M., K. Tsuchida, T. Maeda, and N. Makino.** 2007. SiRNA targeting SHP-1 accelerates angiogenesis in a rat model of hindlimb ischemia. *Atherosclerosis* **191**:33-9.
282. **Summers, S. A., L. Lipfert, and M. J. Birnbaum.** 1998. Polyoma middle T antigen activates the Ser/Thr kinase Akt in a PI3-kinase-dependent manner. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **246**:76-81.
283. **Takahashi, T., K. Takahashi, R. Mernaugh, V. Drozdoff, C. Sipe, H. Schoeckmann, B. Robert, D. R. Abrahamson, and T. O. Daniel.** 1999. Endothelial localization of receptor tyrosine phosphatase, ECRTP/DEP-1, in developing and mature renal vasculature. *J. Am. Soc. Nephrol.* **10**:2135-2145.
284. **Takahashi, T., K. Takahashi, R. L. Mernaugh, N. Tsuboi, H. Liu, and T. O. Daniel.** 2006. A monoclonal antibody against CD148, a receptor-like tyrosine phosphatase, inhibits endothelial-cell growth and angiogenesis. *Blood* **108**:1234-42.
285. **Takahashi, T., K. Takahashi, P. L. St. John, P. A. Fleming, T. Tomemori, T. Watanabe, D. R. Abrahamson, C. J. Drake, T. Shirasawa, and T. O. Daniel.** 2003. A mutant receptor tyrosine phosphatase, CD148, causes defects in vascular development. *Mol. Cell. Biol.* **23**:1817-1831.
286. **Takahashi, T., H. Ueno, and M. Shibuya.** 1999. VEGF activates protein kinase C-dependent, but Ras-independent Raf-MEK-MAP kinase pathway for DNA synthesis in primary endothelial cells. *Oncogene* **18**:2221-2230.
287. **Takahashi, T., S. Yamaguchi, K. Chida, and M. Shibuya.** 2001. A single autophosphorylation site on KDR/Flk-1 is essential for VEGF-A-dependent activation of PLC- $\gamma$  and DNA synthesis in vascular endothelial cells. *EMBO J.* **20**:2768-2778.
288. **Takeda, A., J. J. Wu, and A. L. Maizel.** 1992. Evidence for monomeric and dimeric forms of CD45 associated with a 30-kDa phosphorylated protein. *J Biol Chem* **267**:16651-9.
289. **Tanaka, T., and T. H. Rabbitts.** 2003. Intrabodies based on intracellular capture frameworks that bind the RAS protein with high affinity and impair oncogenic transformation. *EMBO J* **22**:1025-35.
290. **Taniguchi, Y., R. London, K. Schinkmann, S. Jiang, and H. Avraham.** 1999. The receptor protein tyrosine phosphatase, PTP-RO, is upregulated during megakaryocyte differentiation and is associated with the c-Kit receptor. *Blood* **94**:539-49.
291. **Tchilian, E. Z., D. L. Wallace, R. S. Wells, D. R. Flower, G. Morgan, and P. C. Beverley.** 2001. A deletion in the gene encoding the CD45 antigen in a patient with SCID. *J Immunol* **166**:1308-13.
292. **Terman, B. I., M. Dougher-Vermazen, M. E. Carrion, D. Dimitrov, D. C. Armellino, G. D., and P. Bohlen.** 1992. Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial cell growth factor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **187**:1579-1586.
293. **Tertoolen, L. G., C. Blanchetot, G. Jiang, J. Overvoorde, T. W. Gadella, Jr., T. Hunter, and J. den Hertog.** 2001. Dimerization of receptor protein-tyrosine phosphatase alpha in living cells. *BMC Cell Biol* **2**:8.

294. **Thomas, M. L., and E. J. Brown.** 1999. Positive and negative regulation of Src-family membrane kinases by CD45. *Immunol Today* **20**:406-11.
295. **Thomas, S. M., and J. S. Brugge.** 1997. Cellular functions regulated by Src family kinases. *Annu Rev Cell Dev Biol* **13**:513-609.
296. **Tiganis, T., A. M. Bennett, K. S. Ravichandran, and N. K. Tonks.** 1998. Epidermal growth factor receptor and the adaptor protein p52Shc are specific substrates of T-cell protein tyrosine phosphatase. *Mol Cell Biol* **18**:1622-34.
297. **Toledano-Katchalski, H., and A. Elson.** 1999. The transmembranal and cytoplasmic forms of protein tyrosine phosphatase epsilon physically associate with the adaptor molecule Grb2. *Oncogene* **18**:5024-31.
298. **Tonks, N. K.** 2006. Protein tyrosine phosphatases: from genes, to function, to disease. *Nature Reviews Mol. Cell Biol.* **7**:833-846.
299. **Tonks, N. K.** 2003. PTP1B: from the sidelines to the front lines! *FEBS Lett* **546**:140-8.
300. **Tracy, S., P. van der Geer, and T. Hunter.** 1995. The receptor-like protein-tyrosine phosphatase, RPTP alpha, is phosphorylated by protein kinase C on two serines close to the inner face of the plasma membrane. *J Biol Chem* **270**:10587-94.
301. **Tran, J., J. Rak, C. Sheehan, S. D. Saibil, E. LaCasse, R. G. Korneluk, and R. S. Kerbel.** 1999. Marked induction of the IAP family antiapoptotic proteins survivin and XIAP by VEGF in vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* **264**:781-8.
302. **Trapasso, F., A. Drusco, S. Costinean, H. Alder, R. I. Aqeilan, R. Iuliano, E. Gaudio, C. Raso, N. Zanesi, C. M. Croce, and A. Fusco.** 2006. Genetic ablation of Ptpnj, a mouse cancer susceptibility gene, results in normal growth and development and does not predispose to spontaneous tumorigenesis. *DNA Cell Biol* **25**:376-82.
303. **Trapasso, F., R. Iuliano, A. Boccia, A. Stella, R. Visconti, P. Bruni, G. Baldassarre, M. Santoro, G. Viglietto, and A. Fusco.** 2000. Rat protein tyrosine phosphatase eta suppresses the neoplastic phenotype of retrovirally transformed thyroid cells through the stabilization of p27Kip1. *Mol. Cell. Biol.* **20**:9236-9246.
304. **Trapasso, F., S. Yendamuri, K. R. Dumon, R. Iuliano, R. Cesari, B. Feig, R. Seto, L. Infante, H. Ishii, A. Vecchione, M. J. During, C. M. Croce, and A. Fusco.** 2004. Restoration of receptor-type protein tyrosine phosphatase eta function inhibits human pancreatic carcinoma cell growth in vitro and in vivo. *Carcinogenesis* **25**:2107-14.
305. **Tsuboi, N., T. Utsunomiya, R. L. Roberts, H. Ito, K. Takahashi, M. Noda, and T. Takahashi.** 2008. The tyrosine phosphatase CD148 interacts with the p85 regulatory subunit of phosphoinositide 3-kinase. *Biochem J* **413**:193-200.
306. **Tsujikawa, K., T. Ichijo, K. Moriyama, N. Tadotsu, K. Sakamoto, N. Sakane, S.-i. Fukada, T. Furukawa, H. Saito, and H. Yamamoto.** 2002. Regulation of Lck and Fyn tyrosine kinase activities by transmembrane protein tyrosine phosphatase leukocyte common antigen-related molecule. *Mol. Cancer Res.* **1**:155-163.

307. **Ushio-Fukai, M., and R. W. Alexander.** 2004. Reactive oxygen species as mediators of angiogenesis signaling: role of NAD(P)H oxidase. *Mol Cell Biochem* **264**:85-97.
308. **Vacaresse, N., B. Moller, E. M. Danielsen, M. Okada, and J. Sap.** 2008. Activation of c-Src and Fyn kinases by protein tyrosine phosphatase RPTPalpha is substrate-specific and compatible with lipid raft localization. *J Biol Chem.*
309. **Vadlamudi, R. K., A. A. Sahin, L. Adam, R. A. Wang, and R. Kumar.** 2003. Heregulin and HER2 signaling selectively activates c-Src phosphorylation at tyrosine 215. *FEBS Lett* **543**:76-80.
310. **van der Wijk, T., C. Blanchetot, J. Overvoorde, and J. den Hertog.** 2003. Redox-regulated rotational coupling of receptor protein-tyrosine phosphatase alpha dimers. *J Biol Chem* **278**:13968-74.
311. **Vogel, W., R. Lammers, J. Huang, and A. Ullrich.** 1993. Activation of a phosphotyrosine phosphatase by tyrosine phosphorylation. *Science* **259**:1611-4.
312. **von Wichert, G., G. Jiang, A. Kostic, K. De Vos, J. Sap, and M. P. Sheetz.** 2003. RPTP-alpha acts as a transducer of mechanical force on alphav/beta3-integrin-cytoskeleton linkages. *J Cell Biol* **161**:143-53.
313. **Walchli, S., X. Espanel, and R. Hooft van Huijsduijnen.** 2005. Sap-1/PTPRH activity is regulated by reversible dimerization. *Biochem Biophys Res Commun* **331**:497-502.
314. **Wallez, Y., and P. Huber.** 2008. Endothelial adherens and tight junctions in vascular homeostasis, inflammation and angiogenesis. *Biochim Biophys Acta* **1778**:794-809.
315. **Wallez, Y., I. Vilgrain, and P. Huber.** 2006. Angiogenesis: the VE-cadherin switch. *Trends Cardiovasc Med* **16**:55-9.
316. **Waltenberger, J., L. Claesson-Welsh, A. Siegbahn, M. Shibuya, and C.-H. Heldin.** 1994. Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor. *J. Biol. Chem.* **269**:26988-26995.
317. **Walton, K. M., K. J. Martell, S. P. Kwak, J. E. Dixon, and B. L. Largent.** 1993. A novel receptor-type protein tyrosine phosphatase is expressed during neurogenesis in the olfactory neuroepithelium. *Neuron* **11**:387-400.
318. **Weis, S., S. Shintani, A. Weber, R. Kirchmair, M. Wood, A. Cravens, H. McSharry, A. Iwakura, Y. S. Yoon, N. Himes, D. Burstein, J. Doukas, R. Soll, D. Losordo, and D. Cheresch.** 2004. Src blockade stabilizes a Flk/cadherin complex, reducing edema and tissue injury following myocardial infarction. *J Clin Invest* **113**:885-94.
319. **Wheeler, Y. Y., S. Y. Chen, and D. C. Sane.** 2003. Intrabody and intrakine strategies for molecular therapy. *Mol Ther* **8**:355-66.
320. **Wheeler, Y. Y., T. E. Kute, M. C. Willingham, S. Y. Chen, and D. C. Sane.** 2003. Intrabody-based strategies for inhibition of vascular endothelial growth factor receptor-2: effects on apoptosis, cell growth, and angiogenesis. *FASEB J* **17**:1733-5.
321. **Whitaker, G. B., B. J. Limberg, and J. S. Rosenbaum.** 2001. Vascular endothelial growth factor receptor-2 and neuropilin-1 form a receptor complex

- that is responsible for the differential signaling potency of VEGF(165) and VEGF(121). *J Biol Chem* **276**:25520-31.
322. **Wolff, J. R., and T. Bar.** 1972. 'Seamless' endothelia in brain capillaries during development of the rat's cerebral cortex. *Brain Res* **41**:17-24.
323. **Wymann, M. P., and L. Pirola.** 1998. Structure and function of phosphoinositide 3-kinases. *Biochim Biophys Acta* **1436**:127-50.
324. **Xia, P., L. P. Aiello, H. Ishii, Z. Y. Jiang, D. J. Park, G. S. Robinson, H. Takagi, W. P. Newsome, M. R. Jirousek, and G. L. King.** 1996. Characterization of vascular endothelial growth factor's effect on the activation of protein kinase C, its isoform, and endothelial cell growth. *J. Clin. Invest.* **9**:2018-2026.
325. **Xu, W., A. Doshi, M. Lei, M. J. Eck, and S. C. Harrison.** 1999. Crystal structures of c-Src reveal features of its autoinhibitory mechanism. *Mol Cell* **3**:629-38.
326. **Xu, W., S. C. Harrison, and M. J. Eck.** 1997. Three-dimensional structure of the tyrosine kinase c-Src. *Nature* **385**:595-602.
327. **Xu, Z., and A. Weiss.** 2002. Negative regulation of CD45 by differential homodimerization of the alternatively spliced isoforms. *Nat Immunol* **3**:764-71.
328. **Yamada, A., M. Streuli, H. Saito, D. M. Rothstein, S. F. Schlossman, and C. Morimoto.** 1990. Effect of activation of protein kinase C on CD45 isoform expression and CD45 protein tyrosine phosphatase activity in T cells. *Eur J Immunol* **20**:1655-60.
329. **Yamada, S., S. Pokutta, F. Drees, W. I. Weis, and W. J. Nelson.** 2005. Deconstructing the cadherin-catenin-actin complex. *Cell* **123**:889-901.
330. **Yamazaki, Y., K. Takani, H. Atoda, and T. Morita.** 2003. Snake venom vascular endothelial growth factors (VEGFs) exhibit potent activity through their specific recognition of KDR (VEGF receptor 2). *J Biol Chem* **278**:51985-8.
331. **Yancopoulos, G. D., S. Davis, N. W. Gale, J. S. Rudge, S. J. Wiegand, and J. Holash.** 2000. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* **407**:242-8.
332. **You-Ten, K. E., E. S. Muise, A. Itie, E. Michaliszyn, J. Wagner, S. Jothy, W. S. Lapp, and M. L. Tremblay.** 1997. Impaired bone marrow microenvironment and immune function in T cell protein tyrosine phosphatase-deficient mice. *J Exp Med* **186**:683-93.
333. **Young, M. A., S. Gonfloni, G. Superti-Furga, B. Roux, and J. Kuriyan.** 2001. Dynamic coupling between the SH2 and SH3 domains of c-Src and Hck underlies their inactivation by C-terminal tyrosine phosphorylation. *Cell* **105**:115-26.
334. **Yuan, F., Y. Chen, M. Dellian, N. Safabakhsh, N. Ferrara, and R. K. Jain.** 1996. Time-dependent vascular regression and permeability changes in established human tumor xenografts induced by an anti-vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor antibody. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:14765-70.

335. **Zeller, P. J., T. C. Skalak, A. M. Ponce, and R. J. Price.** 2001. In vivo chemotactic properties and spatial expression of PDGF in developing mesenteric microvascular networks. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **280**:H2116-25.
336. **Zeng, H., H. F. Dvorak, and D. Mukhopadhyay.** 2001. Vascular permeability factor (VPF/vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor-1 down-modulates VPF/VEGF receptor-2-mediated endothelial cell proliferation, but not migration, through phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathways. *J. Biol. Chem.* **276**:26969-26979.
337. **Zeng, H., S. Sanyal, and D. Mukhopadhyay.** 2001. Tyrosine residues 951 and 1059 of vascular endothelial growth factor receptor-2 (KDR) are essential for vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor-induced endothelium migration and proliferation, respectively. *J. Biol. Chem.* **276**:32714-32719.
338. **Zeng, L., X. Si, W. P. Yu, H. T. Le, K. P. Ng, R. M. Teng, K. Ryan, D. Z. Wang, S. Ponniah, and C. J. Pallen.** 2003. PTP alpha regulates integrin-stimulated FAK autophosphorylation and cytoskeletal rearrangement in cell spreading and migration. *J Cell Biol* **160**:137-46.
339. **Zhang, L., M. Martelli, C. Battaglia, F. Trapasso, D. Tramontano, G. Viglietto, A. Porcellini, M. Santoro, and A. Fusco.** 1997. Thyroid cell transformation inhibits the expression of a novel rat protein tyrosine phosphatase. *Exp. Cell Res.* **235**:62-70.
340. **Zhang, S. Q., W. Yang, M. I. Kontaridis, T. G. Bivona, G. Wen, T. Araki, J. Luo, J. A. Thompson, B. L. Schraven, M. R. Philips, and B. G. Neel.** 2004. Shp2 regulates SRC family kinase activity and Ras/Erk activation by controlling Csk recruitment. *Mol Cell* **13**:341-55.
341. **Zhang, Z., K. Shen, W. Lu, and P. A. Cole.** 2003. The role of C-terminal tyrosine phosphorylation in the regulation of SHP-1 explored via expressed protein ligation. *J Biol Chem* **278**:4668-74.
342. **Zhang, Z. Y.** 2003. Mechanistic studies on protein tyrosine phosphatases. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **73**:171-220.
343. **Zheng, X., R. J. Resnick, and D. Shalloway.** 2008. Apoptosis of estrogen-receptor negative breast cancer and colon cancer cell lines by PTP alpha and src RNAi. *Int J Cancer* **122**:1999-2007.
344. **Zheng, X. M., R. J. Resnick, and D. Shalloway.** 2002. Mitotic activation of protein-tyrosine phosphatase alpha and regulation of its Src-mediated transforming activity by its sites of protein kinase C phosphorylation. *J Biol Chem* **277**:21922-9.
345. **Zheng, X. M., R. J. Resnick, and D. Shalloway.** 2000. A phosphotyrosine displacement mechanism for activation of Src by PTP. *EMBO J.* **19**:964-978.
346. **Zheng, X. M., and D. Shalloway.** 2001. Two mechanisms activate PTPalpha during mitosis. *EMBO J* **20**:6037-49.
347. **Zheng, X. M., Y. Wang, and C. J. Pallen.** 1992. Cell transformation and activation of pp60c-src by overexpression of a protein tyrosine phosphatase. *Nature* **359**:336-9.



348. **Zhu, J. W., T. Brdicka, T. R. Katsumoto, J. Lin, and A. Weiss.** 2008. Structurally distinct phosphatases CD45 and CD148 both regulate B cell and macrophage immunoreceptor signaling. *Immunity* **28**:183-96.
349. **Zhu, S., J. D. Bjorge, and D. J. Fujita.** 2007. PTP1B contributes to the oncogenic properties of colon cancer cells through Src activation. *Cancer Res* **67**:10129-37.

