

Université de Montréal

**Le VEGF induit la synthèse du PAF par l'entremise de l'activation du VEGFR-2 :  
identification des phosphotyrosines impliquées**

Par

Abdennebi Rechka

Département de pharmacologie

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des Études supérieures

en vue de l'obtention du grade de

Maître es sciences (M.Sc.)

en pharmacologie

Aout 2009

©Abdennebi Rechka, 2009

Université de Montréal

Faculté des Études Supérieure

Ce mémoire intitulé :

Le VEGF induit la synthèse du PAF par l'entremise de l'activation du VEGFR-2 :  
identification des phosphotyrosines impliquées

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Eric THORIN, Ph.D.

-----  
Président-rapporteur

Martin G. SIROIS, Ph.D.

-----  
Directeur de Recherche

Pierre S. HADDAD, Ph.D.

-----  
Membre du jury

## RÉSUMÉ

**Mots clés:** Récepteur à tyrosine kinase, facteurs de croissance, VEGF, PAF, cellules endothéliales, signalisation cellulaire, inflammation, angiogenèse.

Notre laboratoire a démontré que la capacité proinflammatoire *du vascular endothelial growth factor* (VEGF-A<sub>165</sub>) implique la synthèse endothéliale du facteur d'activation plaquettaire (PAF) via l'activation du récepteur tyrosine kinase homodimérique VEGFR-2/R-2. La synthèse du PAF requiert l'activation de la p38 MAPK et p42/44 MAPK qui activent la phospholipase A<sub>2</sub> sécrétée de type V (sPLA<sub>2</sub>-V). Nous avons découvert que la synthèse aigue de prostacycline (PGI<sub>2</sub>) induite par le VEGF-A<sub>165</sub> requiert l'activation des récepteurs hétérodimériques VEGFR-1/R-2. L'activation sélective des récepteurs du VEGF peut donc agir comme balance dans la synthèse de facteurs pro-(PAF) et anti-(PGI<sub>2</sub>) inflammatoire. Cependant, les tyrosines impliquées dans la transphosphorylation de VEGFR-2/R-2 menant à la synthèse du PAF sont inconnues. Par mutagenèse dirigée, nous avons effectué des transfections transitoires de cellules endothéliales avec des plasmides codant pour le VEGFR-2 dont les tyrosines ciblées ont été remplacées de façon séquentielle par une phénylalanine. Un vecteur vide pcDNA a été utilisé comme contrôle négatif. La stimulation des cellules endothéliales de l'aorte bovine (BAEC) transfectées avec le VEGF-A<sub>165</sub> (1nM) pendant 15 minutes augmente la synthèse du PAF de 300%, laquelle était similaire dans les BAEC non transfectées. Dans les BAEC transfectées avec les vecteurs pcDNA codant pour les mutations Y801F, Y1059F, Y1175F et Y1214F, nous avons observé une réduction de 54, 73, 68, et 57% respectivement de la synthèse du PAF induite par le VEGF par rapport au pcDNA témoin. Nos résultats apportent un nouvel aperçu sur le mécanisme par lequel le VEGF induit la synthèse du PAF qui est connu pour sa contribution dans l'activité pro-inflammatoire du VEGF.

## ABSTRACT

**Key words:** Tyrosine kinase receptor, growth factors, VEGF, PAF, endothelial cells, cell signalling, inflammation, angiogenesis.

Vascular endothelial growth factor (VEGF) inflammatory effects require acute platelet-activating factor (PAF) synthesis by endothelial cells (EC). We reported that VEGF-mediated PAF synthesis involves the activation of the homodimeric tyrosine kinase receptor VEGFR-2/R-2 which is leading to p38 and p42/44 mitogen-activated protein kinases (MAPKs) and secreted group V phospholipase A<sub>2</sub> (sPLA<sub>2</sub>-V) activation. We also reported that VEGF-A<sub>165</sub>-mediated prostacyclin (PGI<sub>2</sub>) synthesis requires VEGFR-1/R-2 heterodimeric receptor activation. Selective activation of VEGF receptors can thus act as a balance in the synthesis of pro-(PAF) and anti-(PGI<sub>2</sub>) inflammatory factors. It is unknown which VEGFR-2 tyrosine phosphorylation site(s) contribute(s) to PAF synthesis. Bovine aortic endothelial cells (BAEC) were transfected with pcDNA vectors encoding for native VEGF receptor-2 (VEGFR-2) cDNA, or tyrosine phosphorylation sites mutated into phenylalanine (Y801F), (Y1059F), (Y1175F), (Y1214F), and an empty pcDNA vector was used as negative control. Treatment of pcDNA-transfected BAEC with VEGF-A<sub>165</sub> (1nM) for 15 minutes increased PAF synthesis by 300%, which was similar to VEGF-mediated PAF synthesis in untransfected BAEC. In BAEC transfected with pcDNA vectors encoding mutated Y801F, Y1059F, Y1175F or Y1214F VEGFR-2 cDNA, we observed a marked reduction of VEGF-mediated PAF synthesis by 54, 73, 68 and 57% respectively as compared to pcDNA-transfected BAEC. Our current data provide novel insight on the mechanisms by which VEGF promotes endothelial PAF synthesis which is known to contribute to VEGF pro-inflammatory activities.

## TABLE DES MATIÈRES

<b>RÉSUMÉ.....</b>	<b>iii</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>iv</b>
<b>REMERCIEMENTS.....</b>	<b>vii</b>
<b>LISTE DES FIGURES.....</b>	<b>viii</b>
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS.....</b>	<b>ix</b>
<b>1.0 INTRODUCTION.....</b>	<b>2</b>
<b>1.1 FONCTION DU SYSTÈME VASCULAIRE.....</b>	<b>3</b>
1.1.1 Fonction physiologique .....	3
1.1.2 Fonction pathologique.....	6
<b>1.2 LE <i>VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR</i> (VEGF).....</b>	<b>9</b>
1.2.1 VEGF et fonctions générales.....	9
1.2.2 VEGF et analogues .....	12
1.2.3 Signalisation intracellulaire.....	15
1.2.4 Les récepteurs du VEGF.....	20
1.2.5 VEGFR-1, récepteur de clairance.....	21
1.2.6 VEGFR-2, principal site d'action du VEGF-A.....	22
1.2.6.1 La migration des CE.....	23
1.2.6.2 La prolifération des CE.....	24
1.2.6.3 La survie des CE .....	25
1.2.7 Les Résidus tyrosines du VEGFR-2 .....	26
1.2.7.1 La Tyr <sup>801</sup> .....	27
1.2.7.2 La Tyr <sup>1059</sup> .....	28

1.2.7.3 La Tyr <sup>1175</sup> .....	29
1.2.7.4 La Tyr <sup>1214</sup> .....	30
1.2.8 VEGFR-3 .....	31
1.2.9 Neuropiline, co-récepteur et modulateur de l'activité du VEGFR-2.....	33
1.2.9.1 Expression des neuropilines.....	34
1.2.9.2 Effets médiés par les neuropilines.....	34
<b>1.3 RÉACTION INFLAMMATOIRE.....</b>	<b>36</b>
1.3.1 Biosynthèses du PAF.....	37
1.3.2 Le PAF, Médiateur de l'inflammation .....	38
1.3.3 PAF, Inducteur du processus angiogénique.....	39
1.3.4 Le PAF, Médiateur essentiel pour l'effet angiogénique du VEGF.....	41
1.3.5 Récepteur du PAF .....	43
1.3.6 Adhésion des cellules inflammatoires aux CE.....	43
<b>1.4 PROBLÉMATIQUE ET BUT DU PROJET DE RECHERCHE.....</b>	<b>46</b>
<b>2.0 ARTICLE.....</b>	<b>47</b>
<b>3.0 DISCUSSION .....</b>	<b>73</b>
<b>3.1 Le VEGF induit la synthèse du PAF par les BAEC.....</b>	<b>75</b>
<b>3.2 Régulation de la sPLA<sub>2</sub>-V et de la LYSO-PAF-AT par les p42/44, p38 MAPK     et PI3K.....</b>	<b>76</b>
<b>3.3 Choix des mutants du VEGFR-2.....</b>	<b>82</b>

**4.0 CONCLUSION.....87**

**5.0 RÉFÉRENCES.....88**

## REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier le Professeur Martin G. Sirois pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire, me permettant ainsi de découvrir le monde passionnant de la recherche scientifique. Merci pour l'intérêt prononcé que vous avez porté à mes travaux et votre support financier qui m'a grandement aidé dans ma démarche scientifique.

\* \* \* \* \*

Je remercie le département de pharmacologie et la Faculté des études supérieures de l'Université de Montréal pour le support financier et la qualité des études offertes.

\* \* \* \* \*

Je tiens à remercier tout mes collègues de laboratoire pour le soutien scientifique et moral, Fadi, Elizabeth, Lydia et particulièrement Pauly car malgré ton emploi du temps surchargé, tu as toujours répondu présent lorsque j'avais besoin de tes conseils. Je vous suis très reconnaissant de tout ce que vous avez fait pour moi durant ces deux années de Maitrise.

\* \* \* \* \*

Il va de soi que je remercie mes parents pour m'avoir donné ma chance à arriver là et de m'avoir appris à ne jamais baisser les bras, même dans l'adversité. Si j'en suis là, c'est grâce à vous... Je remercie également ma belle mère pour son soutien durant toutes ces années.

\* \* \* \* \*

Je termine en remerciant ma petite famille, ma femme Naima, mes enfants Rawaa, Moataz et Roaa qui me sont les plus chers, je vous remercie pour votre patience, votre écoute et vos encouragements au quotidien. Merci de m'avoir pardonné mes absences, mes irritabilités et mes coups de déprime. Je vous remercie aussi de m'avoir redonné courage et confiance quand j'étais au bout du rouleau. Je vous aime.



**LISTE DES FIGURES**

Figure 1 :	Représentation schématique des différents récepteurs du VEGF liés par les différents ligands.....	17
Figure 2 :	Les isoformes du VEGF dérivées par épissage alternatif.....	18
Figure 3 :	Famille des <i>vascular endothelial growth factor</i> (VEGF) et de leurs récepteurs.....	19
Figure 4 :	La biosynthèse du PAF passe par la voie de remodelage des phospholipides membranaires la voie de biosynthèse <i>de novo</i> .....	42
Figure 5 :	Mécanismes intracellulaires régissant la synthèse endothéliale du PAF induite par le VEGF.....	81

**LISTE DES ABRÉVIATIONS**

AA	: Acide arachidonique
BAEC	: Cellules endothéliales d'aorte bovine
CE	: Cellules endothéliales
DAG	: Diacylglycérol
EGF	: <i>Epidermal growth factor</i>
EDHF	: <i>Endothelium derived hyperpolarization factor</i>
eNOS	: Synthase endothéliale du monoxyde d'azote
ET	: Endothéline
MAPK	: <i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MEC	: Matrice extracellulaire
NO	: Monoxyde d'azote
NRP	: Neuropiline
PAF	: Facteur d'activation plaquettaire
PGE <sub>2</sub>	: Prostaglandine E <sub>2</sub>
PLC	: Phospholipase C
PIGF	: <i>Placental growth factor</i>
PI3K	: Phosphatidyl inositol 3-kinase
PDGF	: <i>Platelet derived growth factor</i>
sPLA <sub>2</sub>	: Phospholipase A <sub>2</sub> sécrétée
VEGF	: <i>Vascular endothelial growth factor</i>
VEGF-R	: Récepteur du VEGF

## **1.0 INTRODUCTION**

## 1.1 FONCTION DU SYSTÈME VASCULAIRE

### 1.1.1 Fonction physiologique

L'endothélium, qui est composé de cellules endothéliales (CE), tapisse l'intérieur des vaisseaux sanguins, constituant ainsi le seul point de contact avec le sang. L'endothélium de tous les vaisseaux sanguins représente un organe diffus de 700g chez l'Homme adulte [1]. Quoique des différences locales existent au niveau de l'endothélium dans divers types de vaisseaux de résistance vasculaire et des tissus capillaires, un certain nombre de fonctions générales sont connus et sont cruciales pour le fonctionnement approprié de l'organisme [2, 3]. En plus, l'endothélium de différents organes a des fonctions spécialisées [2]. L'endothélium peut étendre son répertoire de fonctions en s'adaptant à différents stimuli, incluant le stress mécanique, le stress métabolique et oxydatif, l'inflammation, l'hypoxie et bien d'autres stress [3, 4]. Par la nature de sa localisation, l'endothélium constitue une barrière physique entre le sang et les tissus, en plus, il régule activement le passage des nutriments, des hormones et des macromolécules aux tissus avoisinants [5]. Il est tapissé par une couche de glycocalyx qui contribue dans la sélectivité de sa fonction de barrière [6]. En outre, l'endothélium assure la fluidité du sang par sa contribution dans le phénomène de l'hémostase. En effet, des CE actives sont nécessaires pour limiter et prévenir la coagulation sanguine, la formation de thrombus plaquettaire et pour produire des régulateurs de fibrinolyse [7].

Les CE assurent aussi la régulation du tonus vasculaire en modulant les phénomènes de vasodilatation et de vasoconstriction par l'envoi de messages appropriés aux cellules musculaires lisses. L'interaction entre l'endothélium et le sang circulant n'implique pas uniquement le contact entre les cellules et les constituants sanguins et

l'endothélium, mais aussi l'impact des forces mécaniques, en particulier les forces de cisaillement exercées par le flux sanguin sur l'endothélium. Cette force tangentielle dilatatrice permet une réponse endothéliale rapide et une adaptation locale du débit sanguin. La vasorégulation rapide est réalisée par la production de facteurs vasodilatateurs comme le monoxyde d'azote (NO), *l'endothelium derived hyperpolarization factor* (EDHF) et les prostaglandines (PGI<sub>2</sub>/PGE<sub>2</sub>), avec lesquels la contribution relative varie selon les différents types de vaisseaux sanguins [8]. Par opposition, d'autres médiateurs endothéliaux entraînent une vasoconstriction, à savoir l'angiotensine II et l'endothéline (ET). L'angiotensine II entraîne de façon directe, une vasoconstriction et également de façon indirecte en favorisant la libération de l'endothéline. Ce n'est qu'en 1988 que Yanagisawa et coll. ont pu décrire la structure en acides aminés de ce puissant vasoconstricteur libéré par l'endothélium qu'ils ont nommé endothéline [9]. Il s'agit d'un peptide de deux acides aminés qui possède au moins trois isoformes, respectivement nommés ET-1, ET-2, ET-3. Les isoformes assurent leurs actions en se liant à des récepteurs membranaires, dont il existe au moins deux types distincts ET-A et ET-B. L'affinité de l'ET-1 pour le récepteur ET-A est 100 fois supérieure à celle de l'ET-3, alors que les 3 isoformes ont la même affinité pour le récepteur ET-B. La liaison de l'endothéline à son récepteur active une protéine G couplée à la phospholipase C. Cette dernière hydrolyse des phospholipides membranaires, donnant ainsi naissance à l'inositol triphosphate d'une part, et au 1-2 diacylglycérol d'autre part. Par des voies de transductions intracellulaires différentes, le DAG active la PKC, et par conséquent entraîne une augmentation de la sensibilité de l'appareil contractile au calcium responsable de la contraction du muscle lisse vasculaire [10].

Il est à noter que l'endothélium joue également un rôle primordial dans le processus de l'angiogenèse. L'angiogenèse consiste en la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir des vaisseaux préexistants. Cette angiogenèse se distingue de la vasculogenèse qui est une formation de vaisseaux *de novo* à partir des hémangioblastes lors du processus de l'embryogenèse [11]. Autrement, les cellules endothéliales sont maintenues dans un état de repos, qui peut durer des mois ou des années. Ce phénomène de stabilité du système vasculaire repose sur un rapport d'équilibre entre les facteurs de stimulation et d'inhibition de l'angiogenèse. Le statut vasculaire de repos est maintenu dans les tissus grâce à la prédominance des facteurs anti-angiogéniques sur les facteurs pro-angiogéniques. Le passage de l'état de repos à l'état actif des vaisseaux est déclenché par la rupture de l'équilibre. La diminution des inhibiteurs et/ou l'augmentation des activateurs entraîne un déplacement de l'équilibre en faveur des activateurs et induit par conséquent une néovascularisation [12].

Un des facteurs de croissance spécifique des CE est le *vascular endothelial growth factor* (VEGF), qui est un facteur de croissance reconnu pour jouer un rôle crucial lors de la formation de nouveaux vaisseaux sanguins [13]. Il possède, au niveau des CE, deux récepteurs, VEGFR-1 et VEGFR-2, via lesquels il induit ses diverses activités physiologiques. Il est capable d'induire auprès des CE des accumulations transitoires du calcium cytoplasmique [14], des changements morphologiques cellulaires [15], leur prolifération et leur migration [16] ainsi que la formation du système vasculaire mature à partir du plexus vasculaire primaire par l'entremise de l'angiogenèse [17]. Cette dernière intervient au cours du développement embryonnaire et joue un rôle fondamental chez l'enfant et l'adulte dans les fonctions reproductrices (régénération de l'utérus, formation

du corps jaune et du placenta) [18]. Elle intervient dans la réparation tissulaire, l'ossification endochondrale [19], la reperméabilisation des thrombus ou encore dans l'adaptation musculaire à l'exercice physique [20]. C'est un mécanisme indispensable et hautement régulé dans des conditions physiologiques [17]. On observe aussi une expression accrue du VEGF dans de nombreuses masses tumorales [21].

### **1.1.2 Fonction pathologique de l'endothélium**

Malgré le rôle physiologique bénéfique des CE dans le maintien de l'homéostasie vasculaire, elles peuvent néanmoins avoir un rôle délétère dans certains cas, de façon particulière lors du processus inflammatoire. Les observations de John Hunter (1728-1793) l'ont amené à démontrer que la rougeur associée à l'inflammation était imputable à une augmentation du flot sanguin à travers les vaisseaux dilatés. Depuis, de nombreuses études ont mis l'emphase sur le fait que l'inflammation est caractérisée par une altération endothélium-dépendante de la microcirculation et associent directement l'endothélium à l'accumulation et la transmigration de leucocytes vers les tissus sous-endothéliaux [22]. L'inflammation constitue le processus de défense des tissus contre une agression invasive. Ceci se caractérise par un changement des propriétés de l'endothélium, qui devient plus perméable et provoque la formation d'œdème et de rougeur.

L'angiogenèse pathologique constitue souvent une réponse de l'organisme aux effets de l'hypoxie due à l'éloignement du site pathologique des vaisseaux sanguins existants. L'angiogenèse est rapidement initiée en réponse à l'ischémie et l'activation des CE est le premier processus qui intervient dans l'angiogenèse physiologique et

physiopathologique. L'hypoxie, qui est définie comme un manque d'approvisionnement en oxygène des cellules, intervient lors de différents phénomènes physiologiques, tels que l'embryogenèse et les séjours en altitude, ou pathologiques comme l'ischémie et la carcinogenèse. Elle entraîne une augmentation des taux d'une famille de facteurs de transcription induite par l'hypoxie (HIFs) comprenant HIF-1 $\beta$  (le translocateur nucléaire du récepteur aryl-hydrocarbone, ARNT), HIF-1 $\alpha$  et HIF-2 $\alpha$ . Ces facteurs sont à l'origine de la réponse à l'hypoxie en se liant à des séquences spécifiques d'ADN (les éléments promoteurs de la réponse à l'hypoxie) qui régule l'expression de plus de 70 gènes dont le VEGF, l'EPO (érythropoïétine), ou encore des transporteurs de glucose (GLUT-1, GLUT3). Ces gènes induits en condition hypoxique sont impliqués dans divers processus cellulaires tels que le métabolisme du glucose, le contrôle du pH intracellulaire, la survie, la prolifération et l'angiogenèse [23].

Les pathologies vasculaires sont soumises à une régulation exercées par l'hypoxie, l'inflammation et l'angiogenèse. L'angiogenèse est un processus hautement régulé au cours duquel un léger déséquilibre peut se traduire en hyper- ou hypovascularisation de certaines régions et ainsi causer ou aggraver un état pathologique. Jusqu'à ce jour, 70 maladies ont été reliées à l'angiogenèse [24]. Parmi ces maladies, on peut citer les rétinopathies prolifératives, la dégénérescence maculaire dépendante de l'âge (AMD), l'athérosclérose, le psoriasis, l'arthrite rhumatoïde (RA) et le cancer tumoral [25]. En effet, le Docteur Folkman rapporta que les tumeurs cancéreuses contiennent une très forte densité de vaisseaux et de capillaires sanguins, permettant ainsi un apport supplémentaire de nutriments aux cellules tumorales en croissance rapide, et il proposa qu'il serait possible de prévenir la progression tumorale en inhibant le



développement anarchique de ces nouveaux vaisseaux sanguins [14]. A partir d'une taille critique de 1-3 mm<sup>3</sup>, la tumeur a besoin de micro-vaisseaux sanguins pour assurer son approvisionnement en oxygène et en nutriments, l'évacuation des déchets du métabolisme et l'apport de facteurs de croissance (phase dite vasculaire). Sous l'effet de l'hypoxie, la tumeur produit des facteurs angiogéniques qui attirent les cellules endothéliales. L'angiogenèse tumorale constitue un processus multifactoriel auquel participent, en plus des facteurs de l'angiogenèse, des protéines de la matrice extracellulaire et des molécules d'adhésion cellulaire. Cette «néovascularisation pathologique» se déroule en plusieurs étapes régulées par des interactions complexes entre toute une série de facteurs de stimulation et d'inhibition. Le développement du phénotype angiogénique des tumeurs est en définitive induit par la prépondérance des facteurs pro-angiogéniques sur les facteurs anti-angiogéniques [26]. Par ailleurs, il est possible de distinguer deux étapes au cours du développement tumoral. Une phase dormante avasculaire, pendant laquelle nous sommes en présence d'une tumeur de petite taille caractérisée par un équilibre entre prolifération et apoptose, et il n'y a pas de formation de nouveaux vaisseaux, et une phase vasculaire qui correspond au 'switch' angiogénique et neovasculaire, au cours duquel, il y a une perte de l'équilibre entre facteurs pro-angiogéniques et facteurs anti-angiogéniques. Ceci entraîne une forte croissance tumorale qui se traduit par une survie et une prolifération anarchique des cellules cancéreuses favorisées par la présence de néovaisseaux [27].

La pathologie vasculaire non tumorale, comme l'arthrite rhumatoïde et l'athérosclérose, est aussi régulée par l'inflammation et l'hypoxie, mais possède des vaisseaux sanguins moins fenestrés et plus structurés. Ainsi, lors de la réponse

inflammatoire, les cellules du système immunitaire relâchent plusieurs facteurs angiogéniques qui vont permettre une réorganisation des vaisseaux sanguins existants, voir en former de nouveaux. On appelle ce phénomène le ‘*switch*’ angiogénique. Ce dernier n’est pas facile à détecter au niveau temporel et pourrait expliquer la difficulté à détecter la phase initiale et à traiter ce genre de pathologie [17].

## **1.2 LE *VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR* (VEGF)**

### **1.2.1 VEGF et fonctions générales**

Vers 1800, Rudolf Virchow et autres pathologistes allemands ont observé que certaines tumeurs chez l’Homme étaient très vascularisées. En 1971, lors de la première tentative d’isoler un signal pro-angiogénique spécifique, Judah Folkman a identifié au niveau des cellules cancéreuses le *facteur tumorale angiogénique* (*TAF*: *tumor angiogenic factor*) qui était mitogénique pour les CE et était responsable de la formation de nouveaux capillaires [28]. Au début des années 80, le VEGF a été découvert comme une molécule de 34 à 42 kDa sous le nom de *Vascular Permeability Factor* (*VPF*). Cette protéine était sécrétée par des cellules tumorales et était responsable de la perméabilité microvasculaire chez le rat et le hamster [29]. En 1989, Napoleone Ferrara et coll. ont isolé et cloné une protéine qui était mitogénique seulement pour les CE. Ils la nommèrent alors le *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF). Des études ultérieures ont permis de révéler que le VPF et le VEGF étaient la même protéine [30]. La forme active du VEGF est une glycoprotéine dimérique liée par un pont disulfure hautement conservé,

qui perd son activité biologique en présence d'agents réducteurs. Le VEGF possède une activité multifonctionnelle et est capable de promouvoir la migration et la prolifération des CE [31, 32]. Le VEGF joue un rôle central dans l'angiogenèse physiologique, non seulement au cours du développement embryonnaire, mais également chez l'adulte. L'inactivation d'un seul des allèles du VEGF induit une létalité embryonnaire chez la souris entre les jours embryonnaires 9,5 et 11 (E9,5 et E11) [33, 34]. Une surexpression du VEGF (d'un facteur 2 par rapport aux taux endogènes) chez des souris transgéniques conduit, quant à elle, à des anomalies sévères du développement cardiaque et à la mort à E12,5-E14. Ceci démontre clairement la nécessité d'une régulation très fine de la concentration de VEGF pour un développement embryonnaire normal [35]. Il est souvent assimilé au seul produit du gène VEGF-A. Toutefois, la famille des VEGF comprend plusieurs membres de protéines sécrétées, jouant un rôle important dans la physiologie et la pathologie du système vasculaire, incluant la vasculogenèse, l'hématopoïèse, l'angiogenèse et la lymphangiogenèse [36]. Cette famille se compose de VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D et PlGF. Le PlGF possède 53% d'homologie avec le VEGF-A et présente aussi les mêmes sites de glycosylation que ce dernier [37] alors que le VEGF-B a 43% d'homologie avec le VEGF-A et seulement 30% avec le PlGF, ne présentant pas de site de glycosylation [38]. Le VEGF-C est identique à seulement 30% avec le domaine d'homologie du VEGF-A, étant encodé seulement par les exons 3 et 4 du gène [39], alors que le VEGF-D présente 61% d'homologie avec le VEGF-C, mais seulement 11,8% d'homologie avec le VEGF-A [40]. Finalement, le VEGF-E est un homologue du virus *orf* qui présente de 17 à 27% d'homologie protéique avec le VEGF-A [41].

L'effet du VEGF et ses analogues se produit par l'intermédiaire de trois récepteurs tyrosine kinase nommé VEGFR-1/Flt-1, VEGFR-2/KDR/Flk-1 et VEGFR-3/Flt-4. Le profil de liaison des VEGF à ces récepteurs n'est pas spécifique à un membre en particulier. En effet, VEGFR-1 lie VEGF-A, -B et PlGF-1,-2, VEGFR-2 lie VEGF-A, -C, -D et VEGF-E tandis que VEGFR-3 lie VEGF-C et -D (Figure 1). Il est à noter que les différents VEGF induisent des activités biologiques différentes. Dans un premier temps, le VEGF se distingue des autres facteurs de croissance par sa capacité d'induire l'inflammation [31, 32]. En effet, le VEGF était le seul facteur de croissance proangiogénique, avant la mise en évidence par notre laboratoire de l'effet pro-inflammatoire des angiopoïétines (Ang-1 et Ang-2). Cet effet est médié par sa capacité d'induire la synthèse du facteur d'activation plaquettaire (PAF), ce dernier augmente la perméabilité vasculaire et favorise ainsi l'angiogenèse pathologique [42, 43].

Il est également reconnu que le monoxyde d'azote (NO), une molécule de signalisation produite dans les cellules endothéliales par la synthase endothéliale du monoxyde d'azote (eNOS), joue également un rôle primordial dans les effets biologiques du VEGF. Il y a en effet une diminution dans la formation de nouveaux vaisseaux sanguins et dans la perméabilité vasculaire en réponse au VEGF chez les souris déficientes génétiquement en eNOS [44]. De plus, l'inhibition d'eNOS diminue significativement l'extravasation des macromolécules induite par le VEGF [45]. La principale fonction du NO est d'agir sur les cellules du muscle lisse vasculaire dans le but d'induire une vasodilatation [46]. Elle intervient aussi à toutes les étapes de la réponse cellulaire au VEGF menant à l'angiogenèse et à l'induction de la perméabilité vasculaire [44]. En conséquence, elle est aussi bien impliquée dans les conditions physiologiques

normales, que dans certaines pathologies comme l'angiogenèse tumorale et certaines maladies cardiovasculaires, induites par cette cytokine.

### 1.2.2 VEGF et ses analogues

Le *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF-A) fut le premier facteur découvert ayant une activité mitotique spécifique sur les cellules endothéliales [30]. Le VEGF-A est une glycoprotéine homodimérique dont le gène, cloné en 1989 [47, 48] comprend 8 exons répartis sur une distance approximative de 14Kb sur le chromosome 6p21.3 [49] et code une forme longue de 206 acides aminés. Par épissage alternatif des exons 6 et 7, plusieurs transcrits sont produits et les peptides générés se distinguent par leur pouvoir de liaison à l'héparine et aux protéoglycanes de type héparane sulfate, composants de la matrice extracellulaire (MEC). On peut distinguer les isoformes VEGF-A<sub>189</sub>, VEGF-A<sub>183</sub>, VEGF-A<sub>165</sub>, VEGF-A<sub>148</sub>, VEGF-A<sub>145</sub>, VEGF-A<sub>121</sub>, d'après le nombre d'acides aminés de la protéine mature prédite (Figure2), auxquelles s'est ajouté récemment le VEGF<sub>162</sub> [50]. L'isoforme la plus abondante et la plus étudiée est celle contenant 165 acides aminés [51]. L'isoforme VEGF<sub>165b</sub> est particulière du fait de l'absence de l'exon 8, et qui est remplacé par un 9ième exon [52]. De plus, il est intéressant de noter que le VEGF<sub>165b</sub>, dont l'expression est associée à une croissance tumorale lente, correspondrait à une isoforme inhibant l'activité du VEGF-A<sub>165</sub> [53]. Les formes surexprimées dans les processus d'angiogenèse physiologique aussi bien que pathologique sont les VEGF-A<sub>121</sub>, VEGF-A<sub>165</sub> et VEGF-A<sub>189</sub>. En fonction de la présence ou non du site de liaison à l'héparine, les homodimères de VEGF-A<sub>189</sub> sont retrouvés essentiellement séquestrés à la matrice extracellulaire, alors que la forme VEGF-A<sub>121</sub> est

totale soluble dans la circulation à cause de l'absence des exons 6 et 7 du gène, qui correspondent au site de liaison à l'héparine, et par conséquent n'a aucune affinité envers la MEC [54]. Le VEGF-A<sub>165</sub>, qui est partiellement lié à la matrice extracellulaire et à la membrane cytoplasmique à cause de la présence de l'exon 7, apparaît prédominant aussi bien d'un point de vue quantitatif que fonctionnel et pouvant induire tous les effets biologiques associés au VEGF. L'importance de VEGF-A dans l'angiogenèse a été montrée chez divers modèles expérimentaux *in vivo*. Chez la souris, l'inactivation du gène de VEGF-A conduit à une mort embryonnaire et ceci même à l'état hétérozygote [34, 55]. De plus l'inactivation du VEGF-A spécifiquement à partir de la période néonatale entraîne, entre autres, un retard de la croissance qui est létal [56]. Ceci démontre bien la nécessité de VEGF-A en ce qui concerne le développement physiologique de l'organisme. Son importance dans l'induction angiogénique lors de la croissance tumorale a été mise en évidence dans un modèle animal de transformation oncogénique des cellules bêta ( $\beta$ ) des îlots pancréatiques [57, 58]. Dans les carcinomes à cellules rénales (CCR), la coexpression des transcrits 121, 165 et 189 est associée aux stades T3-T4 et à la densité en microvaisseaux [59]. De même, la surexpression de 2 à 3 fois du VEGF par rapport à son expression endogène entraîne de graves anomalies du développement cardiaque et une létalité embryonnaire [35].

Rappelons que la famille des VEGF consiste en des dimères de glycoprotéines qui ont en commun un domaine d'homologie des VEGF [60]. L'invalidation par recombinaison homologue (knock-out) des gènes codant pour le VEGF-A, le VEGFR-2 et le VEGFR-1 a été réalisée et met en évidence le rôle primordial de ces molécules lors de l'angiogenèse embryonnaire [34, 61]. La transcription du gène codant pour le VEGF-

A est activée dans les cellules tumorales mais ne l'est pas, en général, dans les cellules endothéliales. En revanche, le VEGFR-2 et le VEGFR-1 sont présents à la surface des cellules endothéliales adjacentes aux cellules tumorales et le VEGFR-1 est exprimé au niveau des monocytes et des cellules hématopoïétiques participant à l'angiogenèse tumorale. Notons qu'une source supplémentaire de VEGF-A est constituée par les lymphocytes infiltrant la tumeur [62]. Ceci indique que le VEGF-A induit l'angiogenèse par un mode paracrine. Il semble qu'il agit principalement via le VEGFR-2 directement au niveau des CE tumorales. En effet, chez la souris *nude* (une souche mutante de souris dépourvue de poils et de thymus, affectée d'un déficit immunitaire important), la croissance des glioblastomes est inhibée par la surexpression dans les CE d'une forme dominante-négative de VEGFR-2 [13]. Le VEGF-A a été détecté à des concentrations très élevées dans un certain nombre de tumeurs comme les tumeurs du poumon et de la vessie [63]. Cette surexpression est accompagnée d'une augmentation significative de la densité de microvaisseaux dans les tumeurs [63]. Par ailleurs, l'expression du VEGF-A dans les cellules tumorales est positivement corrélée avec le pouvoir métastatique [63]. En utilisant principalement des approches de transgénèse et d'inactivation conditionnelle spécifique, des informations importantes concernant l'activité des différentes formes du VEGF ont été obtenues [64]. Si le VEGF-A<sub>121</sub> semble être indispensable pour le développement et l'organogenèse, l'ensemble des isoformes du VEGF-A est capable d'induire l'angiogenèse tumorale [65]. Par ailleurs, une isoforme du VEGF-B, le VEGF-B<sub>186</sub>, est exprimée dans certains types de tumeurs. Le VEGF-C et le VEGF-D seraient plutôt impliqués dans la croissance, la migration et la survie des cellules endothéliales

lymphatiques. Tous deux activent le VEGFR-3, exprimé par les cellules endothéliales lymphatiques [66, 67].

La famille des *placental growth factors* (PlGF1, 2 et 3) semble jouer un rôle principal dans la neoangiogenèse post-natale en activant exclusivement le VEGFR-1 [68]. En effet, des souris PlGF1<sup>-/-</sup> ne présentent pas de déficits de développement, mais ont une inhibition de l'angiogenèse lors de l'ischémie, l'inflammation et le cancer chez des modèles expérimentaux.

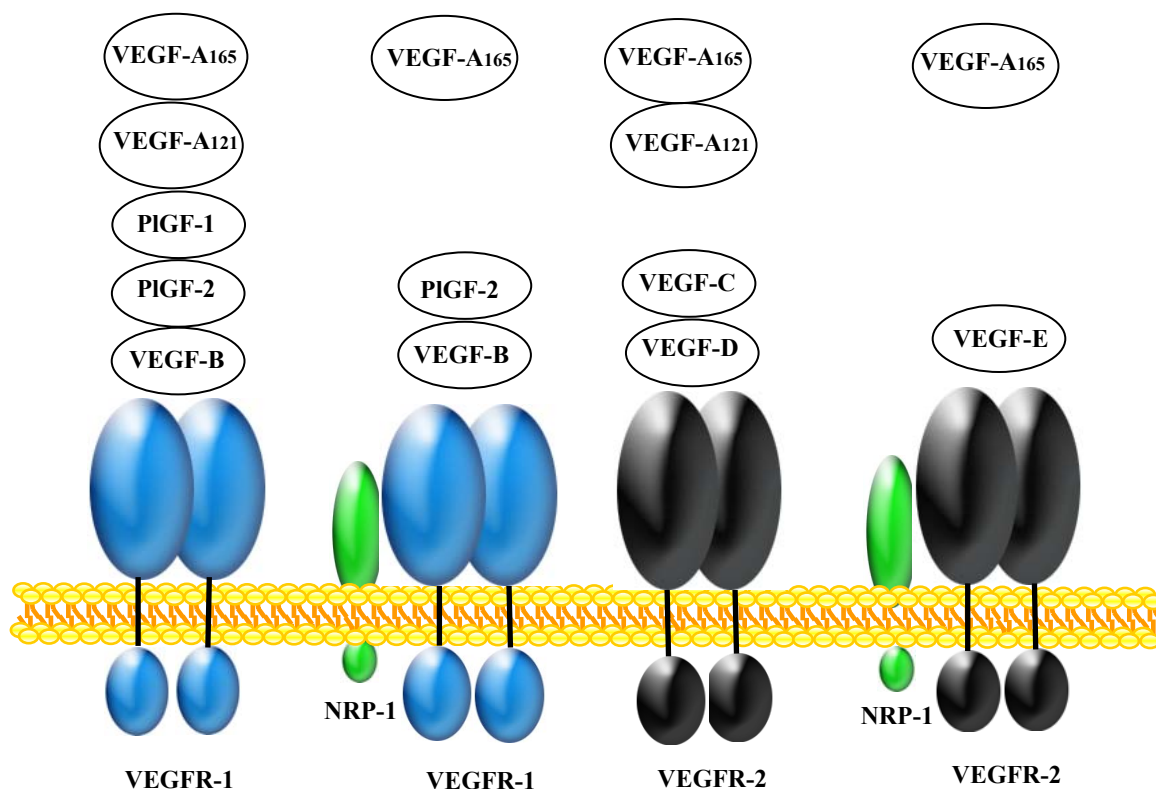
### 1.2.3 Signalisation intracellulaire

Les molécules de VEGF-A se fixent sur deux types de récepteurs de surface appelés VEGFR-2 et VEGFR-1 ainsi que sur un co-récepteur la neuropiline 1 (NRP1). Ce dernier est un récepteur transmembranaire non tyrosine-kinase qui permet d'augmenter l'activation du VEGFR-2 suite à son activation par le VEGF-A<sub>165</sub>. La transduction du signal par ces types de récepteurs a récemment fait l'objet de recherches actives [69, 70]. Le VEGF-A a une affinité dix fois plus importante pour le VEGFR-1 que pour le VEGFR-2. Cependant, l'activité tyrosine kinase de VEGFR-2 est fortement stimulée par le VEGF-A, contrairement à celle du VEGFR1 [37, 71].

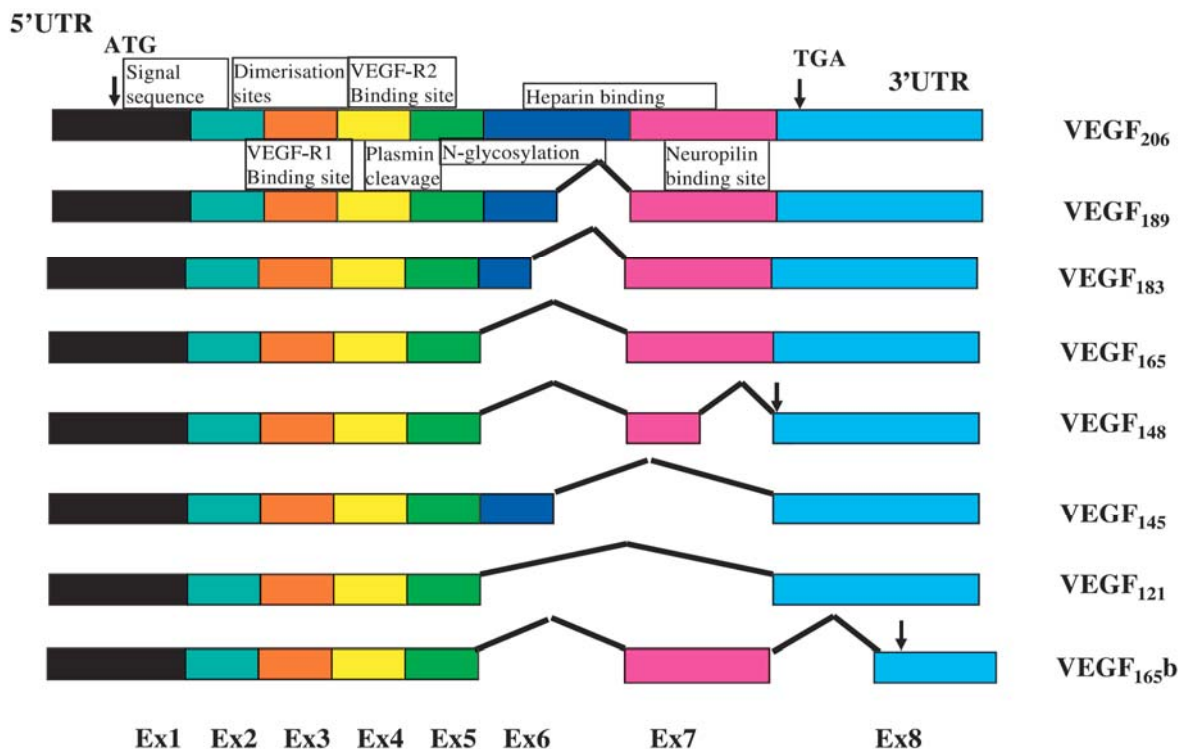
Le VEGF est reconnu pour exercer de nombreuses actions principalement au niveau de l'endothélium vasculaire. Il a été démontré qu'il est capable d'induire auprès des CE des accumulations transitoires de calcium cytoplasmique [14], des changements morphologiques cellulaires [15], ainsi que leur prolifération et leur migration. Ces effets semblent être médiés tant via l'activation de la voie Ras-dépendante, en faisant intervenir des molécules adaptatrices Sos, Grb2 et Shc, que la voie Ras-indépendante, qui est



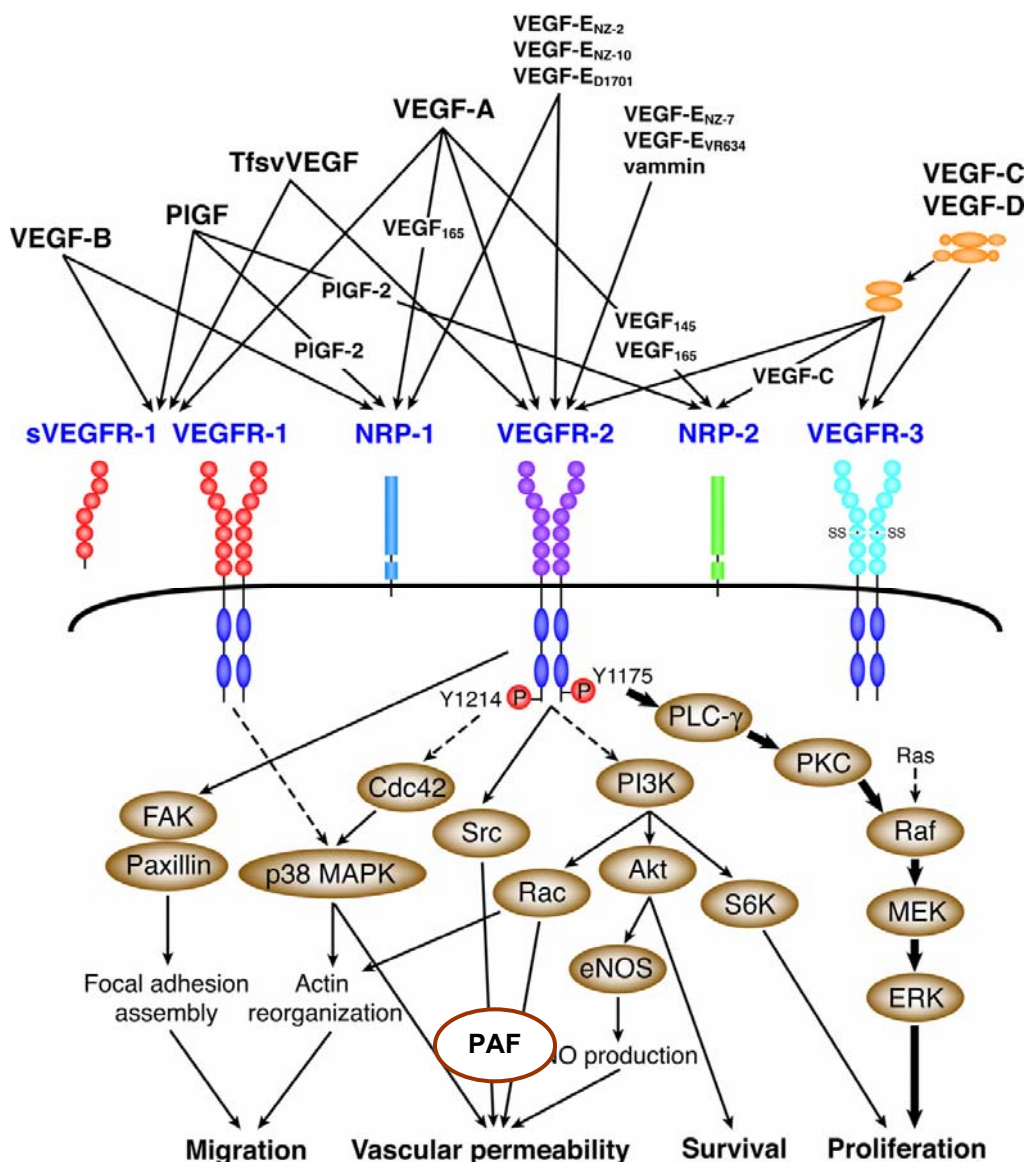
responsable de l'activation de la phospholipase C et la protéine kinase C [72, 73]. Ces deux voies sont responsables de l'activation des *mitogen-activated protein kinases* (MAPK). L'isoforme ERK de cette famille joue un rôle primordial au niveau de la prolifération et la migration cellulaire (Figure3). Après activation de ces deux voies, on assiste à une réorganisation rapide du cytosquelette, ainsi qu'à la phosphorylation de nombreux facteurs de transcription nucléaires responsable du cycle cellulaire et de la réplication de l'ADN génomique [72, 73]. Ceci appuie les données qui démontrent que le VEGF est également un facteur angiogénique [13].



**Figure 1** : Représentation schématique des différents récepteurs du VEGF liés par les différents ligands à savoir les VEGF-A<sub>165</sub>, VEGF-A<sub>121</sub>, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, PlGF-1 et le PlGF-2. Le corécepteur neuropiline-1 (NRP-1) peut être associé au récepteur VEGFR-1 ou VEGFR-2. Les agonistes du VEGFR-1, le VEGF-B et le PlGF, peuvent lier seulement les homodimères du VEGFR-1, tandis que les agonistes du VEGFR-2, le VEGF-C et le VEGF-D se lient avec les homodimères du VEGFR-2 (Adaptée à partir du Mémoire de Simon Rollin, 2003).



**Figure 2:** La structure théorique des exons du pré-ARNm du VEGF dans lequel les domaines fonctionnels sont identifiés. L'exon 1, contient la région 5'-non traduite (UTR) et la séquence du peptide signal; L'exon 2, NH<sub>2</sub> terminal; L'exon 3, le domaine de dimérisation et le site de liaison VEGFR-1; L'exon 4, le site de liaison VEGFR-2; et Les exons 6 et 7, le domaine de liaison à l'héparine. L'exon 7 confère au VEGF-A<sub>165</sub> une séquestration partielle à la MEC et la capacité de liaison au corécepteur neuropiline-1 (NRP-1) (Bates DO, Vasc. Pharmacol., 39, 225-37, 2002) [74].



**Figure 3:** La superfamille des VEGF et les voies de signalisation en rapport avec le VEGFR-2. La Tyr<sup>1175</sup> et la Tyr<sup>1214</sup> sont les deux principaux sites autophosphorylés au niveau du VEGFR-2. La liaison de la PLC-γ à la Tyr<sup>1175</sup> mène à la phosphorylation et l'activation de cette protéine. La Tyr<sup>1214</sup> apparaît être essentielle au déclenchement de l'activation de Cdc42 et de la p38 MAPK. L'activation des molécules en aval mène à des fonctions cellulaires endothéliales comme la migration, la perméabilité vasculaire, la survie et la prolifération (Adaptée à partir de: Takahashi, H. and M. Shibuya, Clin Sci , 109. 227-41, 2005)[75].

#### 1.2.4 Les récepteurs du VEGF

Les récepteurs du VEGF font partie de la famille des récepteurs à tyrosine kinase. Cette famille comprend trois types de récepteurs, déjà cités, à savoir le VEGFR-1, également appelé Flt-1 (Fms-like tyrosine kinase-1) chez la souris, le VEGFR-2 et le VEGFR-3 (Flt-4). Les récepteurs VEGFR-1 et VEGFR-2 semblent être tous les deux indispensables au développement d'un réseau vasculaire normal de l'embryon. Les souris invalidées pour l'un ou l'autre gène, meurent *in utero* entre j8,5 et j9,5, mais montrent des phénotypes différents indiquant que leurs rôles sont distincts [61, 76]. Il est à noter que le VEGFR-1 et le VEGFR-2 sont présents à la surface des CE [77] à l'exception des CE des vaisseaux cérébraux [78, 79]. Ces récepteurs forment une sous-famille caractérisée par sept domaines extracellulaires ressemblant à l'immunoglobuline, une seule région transmembranaire et un double domaine tyrosine kinase. Ces récepteurs sont présents sous forme de monomère à la surface cellulaire, mais suite à leurs stimulations par le ligand, ils subissent une dimérisation par autophosphorylation. Le VEGFR-2 est exprimé de façon ubiquitaire chez toutes les CE, alors que l'expression de VEGFR-1 dans les CE varie en fonction du type de lit vasculaire et que le récepteur VEGFR-3 est surtout localisé à la surface des CE des vaisseaux lymphatiques [80]. Suite à l'inactivation des gènes codant pour le VEGFR-1, le VEGFR-2 ou le VEGFR-3, nous observons une létalité embryonnaire chez la souris. Activées par le VEGF, les CE synthétisent plusieurs types d'enzymes et de protéines qui dégradent la matrice extracellulaire, facilitant ainsi la migration et l'invasion des CE vers les tissus cibles. Le VEGF est, par ailleurs, un puissant facteur qui augmente la perméabilité vasculaire, agissant principalement au niveau de la micro-vascularisation [81, 82].

### 1.2.5 Le récepteur VEGFR-1

Le VEGFR-1/(Flt-1) est une protéine transmembranaire de 180-kDa qui joue un rôle dans l'entretien de l'activité vasculaire et dans le recrutement des précurseurs des CE durant la vasculogenèse [83]. Il a été identifié et cloné en 1992 par le groupe de Williams [84]. Il lie les isoformes de VEGF-A, VEGF-B et PlGF et traduit les diverses réponses biologiques [85, 86]. Autiero et coll. ont suggéré que le mécanisme qui régit les différentes réponses du VEGF et PlGF pourrait être lié à l'induction de différentes voies de phosphorylation au niveau du VEGFR-1 [87]. Ce dernier est capable de lier le VEGF avec une affinité dix fois supérieure à celle de VEGFR-2, mais ses propriétés de transduction du signal sont extrêmement faibles [71]. Le VEGFR-1 existe sous deux formes, une forme transmembranaire et une forme soluble. Il aurait un rôle inhibiteur de la vasculogenèse et de l'angiogenèse dans l'embryogenèse précoce, mais un rôle activateur de l'angiogenèse ou de la réponse inflammatoire chez l'adulte. Le VEGFR-1 est exprimé à la fois chez les CE en prolifération et chez les cellules quiescentes, suggérant un rôle de ce récepteur dans le maintien de la survie des CE [88]. De plus, le VEGFR-1 est également exprimé à la surface des cellules dendritiques, des ostéoclastes, des péricytes et des trophoblastes du placenta [89, 90]. Le rôle du VEGFR-1 dans ces types cellulaires n'est pas toujours élucidé. Il pourrait jouer un rôle dans leur survie.

L'inactivation du gène codant pour le VEGFR-1 entraîne un surnombre de CE ayant comme conséquence une altération de la vasculogenèse [76, 91]. Par contre, l'inactivation de la partie tyrosine kinase de VEGFR-1 est compatible avec le développement normal chez la souris, mais elle affecte l'angiogenèse tumorale [92, 93]. Pendant la période de l'embryogenèse, le VEGFR-1 jouerait un rôle de récepteur

"réservoir" pour le ligand VEGF-A réglant sa disponibilité pour le VEGFR-2 ainsi que son activité transmise par cette liaison au VEGFR-2. Dans l'angiogenèse pathologique, le récepteur VEGFR-1 participe activement au développement de lésions athéromateuses et dans l'arthrite rhumatoïde [94]. Une forme soluble du VEGFR-1 contenant seulement les six premiers domaines Ig a été clonée à partir d'une banque d'ADN complémentaires issue de cellules HUVEC [95]. Le VEGFR-1 soluble inhibe l'activité du VEGF-A en le séquestrant [96]. Dans un modèle murin d'arthrite, l'inhibition de VEGFR-1 diminue l'œdème, l'érythème et l'ankylose [94]. Dans ce modèle, VEGFR-1 est nécessaire à la mobilisation de précurseurs de CE à partir de la moelle osseuse [97, 98]. Il semble que VEGF-B et PlGF soient nécessaires pour la réponse biologique induite par la phosphorylation de VEGFR-1 [87].

### 1.2.6 Le récepteur VEGFR-2

Le récepteur de type 2 du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGFR-2), aussi appelé kinase du foie fœtal (Flk-1) chez la souris et récepteur contenant un domaine kinase (KDR) chez l'humain, est un récepteur à tyrosine kinase de 200 à 300-kDa. Le VEGFR-2 est une glycoprotéine qui a été découverte en 1992 [99], et qui semblait être responsable de la plupart des réponses des CE observées sous l'action du VEGF [100]. Bien que l'affinité du VEGF soit presque 10 fois supérieure pour le VEGFR-1 que pour le VEGFR-2, ce dernier semble être le principal récepteur impliqué dans la signalisation intracellulaire et dans l'activité angiogénique induite par le VEGF. Il lit les isoformes du VEGF-A, -C, -D, -E et svVEGF [75], mais pas le VEGF-B<sub>167</sub> et le

PIGF [95]. Le VEGFR-2 est exprimé au niveau des CE des systèmes sanguin et lymphatique [101]. Il est impliqué dans la transduction du signal intracellulaire responsable de la migration des CE dépendant des intégrines, ceci découle de sa capacité de former un complexe avec l'intégrine V3 et d'induire la prolifération des CE, la migration et l'angiogenèse *in vivo* [102]. Chez la souris, l'inactivation du gène codant pour le récepteur VEGFR-2 entraîne un manque de développement d'hémangioblastes, ceci affecte la vasculogenèse [61]. Les formes matures de VEGF-C et -D lient et activent également le VEGFR-2 en plus du VEGFR-3 [36]. Actuellement, il n'est pas confirmé que l'activation de VEGFR-2 par ces différents ligands induise les mêmes voies de signalisation et par conséquent une réponse physiologique identique.

La majeure partie de la signalisation cellulaire fonctionnelle du VEGF décrite jusqu'à maintenant est liée à l'activation du VEGFR-2. En effet, des données *in vitro* et *in vivo* ont démontré l'impact de l'activation du VEGFR-2 par le VEGF-A dans les CE pour l'induction spécifique de la migration, la prolifération, la perméabilité vasculaire, ainsi que l'angiogenèse [51].

#### **1.2.6.1 La migration des CE**

La stimulation du VEGFR-2 induit la polymérisation de l'actine, la formation de lamellipodes/filopodes et la contraction des fibres de myosine permettant la migration cellulaire au moyen de deux voies de signalisation principales. En effet, le VEGFR-2 permet la phosphorylation de la MAPK p38, laquelle active, à son tour, la protéine kinase activée par MAPK de types 2 et 3 (MAPKAPK2/3). Cette dernière phosphoryle un



modulateur de la polymérisation des fibres F-actine, la protéine Hsp27 [103]. De plus, tel que mentionné précédemment, le VEGFR-2 induit la phosphorylation et l'activation de FAK, qui intervient dans la régulation de l'assemblage des foyers d'adhésions, de l'organisation du cytosquelette d'actine et de la migration cellulaire [104]. De façon détaillée, après activation du VEGFR-2, on voit une association entre les 130 derniers acides aminés du récepteur et la protéine Hsp90. Ceci permet l'activation de la petite GTPase RhoA et sa kinase sérine/thréonine associée ROCK, puis ultimement la phosphorylation de FAK sur son résidu tyrosine 407, une étape requise pour l'induction et la migration cellulaire [105]. Ainsi, l'inhibition de l'interaction VEGFR-2/Hsp90, en utilisant un inhibiteur spécifique de ROCK ou des formes dominantes négatives de RhoA et ROCK entraîne une inhibition de la phosphorylation de FAK sur sa tyrosine 407 [105]. De même, l'utilisation d'une forme mutante du VEGFR-2 où les 130 acides aminés de la partie C-terminale ont été supprimés entraîne une incapacité d'association avec la Hsp90 et une inhibition de la migration cellulaire induite par le VEGF [105].

### 1.2.6.2 La prolifération des CE

La principale voie de signalisation qui mène à la prolifération des CE est due à l'activation des MAPKs, ERK-1 et -2 (*extracellular signal-regulated kinase*). Le VEGFR-2 permet l'activation de ces protéines par le biais de deux mécanismes intracellulaires distincts; soit par la voie classique dépendante de Ras ou à l'aide d'une voie qui lui est unique et basée sur l'activation de la phospholipase C- $\gamma$  (PLC- $\gamma$ ). Ainsi, le VEGFR-2 peut activer de façon directe la PLC- $\gamma$ . Cette dernière hydrolysera le

phosphatidylinositol-4,5-biphosphate dans le but de produire du diacylglycérol (DAG) et de l'inositol-triphosphate (IP<sub>3</sub>). Cette cascade signalétique permet une augmentation du calcium intracellulaire et l'activation de la protéine kinase C (PKC). Enfin, cette kinase agira au niveau du Raf-1 lequel, une fois activé, phosphorylera et activera les kinases MEK-1 et -2. Ces dernières vont ensuite phosphoryler et activer les protéines kinases spécifiques aux sérines/thréonines; les ERK-1 et -2 [106-108].

On croyait que l'induction de la prolifération des CE par le VEGFR-2 était dépendante uniquement de la PLC- $\gamma$  et indépendante de Ras. Maintenant, nous savons que la voie classique d'activation des ERKs par les récepteurs à tyrosine kinase (RTKs) est aussi impliquée lors de ce processus [109]. Ainsi, il a été démontré que le VEGF provoque l'activation de Ras et que cette étape est primordiale à l'induction de la prolifération des CE par cette cytokine [109].

### **1.2.6.3 La survie des CE**

La dégradation de la matrice extracellulaire est l'une des étapes les plus importantes du processus angiogénique. Pour ceci, les cellules enrôlées dans l'angiogenèse requièrent de forts signaux de survie/anti-apoptotiques afin d'éviter la mort cellulaire programmée causée par le manque d'adhésion [110]. L'activation de la phosphoinositol 3-kinase (PI3K) avec son plus important médiateur, la kinase anti-apoptotique Akt/protéine kinase B (PKB), constituent le principal mécanisme par lequel le VEGF initie des signaux de survie [111, 112]. En effet, l'activation du VEGFR-2 par le VEGF mène à l'activation de l'enzyme PI3K, laquelle phosphorylera le

phosphatidylinositol-4,5-biphosphate (PIP<sub>2</sub>) dans le but de produire le phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate (PIP<sub>3</sub>). Le PIP<sub>3</sub> fonctionne comme un signal de recrutement membranaire pour Akt et PDK1 (*phosphoinositol-dependent kinase-1*) et par la suite l'activation de l'Akt par cette dernière. La forme activée d'Akt retournera au cytoplasme pour inhiber l'activité de protéines pro-apoptotiques telles que Bad, Bax et la caspase 9, et augmenter le niveau de certaines protéines anti-apoptotiques dont A1 et Bcl-2 [111, 113]. Un deuxième scénario qui permet la survie cellulaire via l'activation du VEGFR-2 par le VEGF fait intervenir l'activation de la protéine kinase de contacts focaux (FAK), une protéine connue pour son rôle dans le maintien des signaux de survie chez plusieurs types de cellules adhérentes dont les CE [114]. En effet, une augmentation de la phosphorylation et le recrutement de FAK induits par le VEGF, au sein de nouveaux foyers d'adhésion dans les CE permet un ancrage de la cellule à la MEC et induit des signaux de survie [115].

### 1.2.7 Les résidus tyrosines du VEGFR-2

Le VEGFR-2 joue un rôle important dans la médiation des processus physiologiques et physiopathologiques induits par le VEGF. Ainsi, plusieurs résidus tyrosines (Y) existent dont la phosphorylation est essentielle au recrutement et à l'activation de protéines contenant des domaines d'homologie à Src 2 (SH2) et qui sont impliquées dans la transmission de signaux intracellulaires. Le VEGFR-2 contient un

domaine extracellulaire avec un motif de liaison du ligand, un domaine transmembranaire puis un domaine intracellulaire incluant une région avec activité tyrosine kinase.

L'homodimérisation du VEGFR-2 provoquée par la liaison au VEGF entraîne une forte autophosphorylation du récepteur sur les résidus tyrosines. Cette phosphorylation entraîne un changement de conformation qui facilite la liaison de l'ATP au récepteur, ce qui permet au site catalytique de chaque monomère de phosphoryler des résidus tyrosines sur la portion cytosolique de l'autre monomère [116]. Le VEGFR-2 contient 19 résidus tyrosines intracellulaires dont seulement 11 sont situés dans une région non catalytique et par conséquent potentiellement phosphorylables [117]. Jusqu'à maintenant, seulement huit de ces tyrosines ont été démontrées comme pouvant être phosphorylées en réponse au VEGF; parmi ces derniers, il y a le résidu Tyr<sup>1059</sup> qui est situé dans le domaine kinase, les tyrosines Tyr<sup>1175</sup> et Tyr<sup>1214</sup> qui sont situées dans la région de la queue C-terminale du récepteur [71, 118] et la Tyr<sup>801</sup> située au niveau du domaine d'insert kinase. Certains de ces sites ont été identifiés par des méthodes directes (par des anticorps spécifiques) [118, 119] et indirectes (par l'identification d'une réponse cellulaire reliée à la phosphorylation du résidu tyrosine).

### 1.2.7.1 Résidu Tyr<sup>801</sup>

La Tyr<sup>801</sup> est considérée comme étant l'un des premiers sites de phosphorylation potentiel du récepteur VEGFR-2 [120]. Dans cette étude, les séquences des récepteurs VEGFR-1 et -2 ont été alignées, permettant de savoir que la Tyr<sup>801</sup> du VEGFR-2 correspondait à la Tyr<sup>794</sup> du VEGFR-1. Ce résidu est phosphorylé et interagit avec

l'enzyme PLC- $\gamma$  après une stimulation du récepteur au VEGF. De plus, la Tyr<sup>801</sup> est entourée de séquences d'autophosphorylation et de liaison à la PLC- $\gamma$ . Finalement, grâce à des études de double-hybride en levure, une interaction entre l'enzyme et ce résidu a été observée [120]. Par opposition, une deuxième étude montre clairement que la phosphorylation de la Tyr<sup>801</sup> est primordiale pour l'activation de la PI3K mais pas pour l'activation de la PLC- $\gamma$ . En effet, l'utilisation d'un mutant du VEGFR-2 dont la tyrosine a été remplacée par une phénylalanine (Y801F) montre une diminution de la production de PIP3 dans un essai d'activité kinase PI3K *in vitro* [121]. De plus, la mutation de ce résidu inhibe l'interaction entre le VEGFR-2 et la sous-unité régulatrice de la PI3K et affecte la phosphorylation d'Akt mais n'a pas d'effet sur la phosphorylation de la PLC- $\gamma$ . Finalement, cette même étude montre que la Tyr<sup>801</sup> est importante dans la stimulation de la croissance cellulaire par le VEGFR-2.

### 1.2.7.2 Résidu Tyr<sup>1059</sup>

La Tyr<sup>1059</sup> est situé au niveau du domaine kinase du VEGFR-2 [122, 123]. Elle est impliquée dans l'activité tyrosine kinase du récepteur. Ceci est confirmé par la perte de cette activité suite à la mutation de la tyrosine en phénylalanine [122-124]. Ce résidu est clairement reconnu comme étant nécessaire à l'activité catalytique maximale du récepteur [122, 123]. En effet, ce site, en compagnie du résidu Tyr<sup>1054</sup>, est localisé au niveau de la boucle d'activation de la kinase dont la phosphorylation a été présentée comme étant essentielle à l'activité kinase du récepteur. Ce double mutant Tyr<sup>1059</sup>/Tyr<sup>1054</sup> ne montre que 10% de la phosphorylation totale par rapport à la phosphorylation du

VEGFR-2 sauvage [122]. Par conséquent, ces constatations sont semblables à celles antérieurement rapportées pour le récepteur à l'insuline et d'autres récepteurs à tyrosine kinase qui contiennent aussi des résidus tyrosines dont la phosphorylation est essentielle à l'induction de l'activité catalytique maximale du récepteur [125].

### 1.2.7.3 Résidu Tyr<sup>1175</sup>

Le résidu Tyr<sup>1175</sup> du VEGFR-2 est le site le plus documenté. Sa phosphorylation donne lieu au recrutement et à l'activation de la PLC- $\gamma$  et correspond à la tyrosine Tyr<sup>1169</sup> du VEGFR-1 [120]. L'utilisation d'études de double hybride en levure, de co-transfection ou suite à l'utilisation d'un phospho-peptide Tyr<sup>1175</sup> synthétique en combinaison avec une protéine recombinante contenant les domaines SH2 de la PLC- $\gamma$  a permis de découvrir que la Tyr<sup>1175</sup> joue un rôle important dans l'interaction VEGFR-2/PLC- $\gamma$  [118, 120, 126]. Il est à noter que la forme non phosphorylable du VEGFR-2 pour ce résidu montre une diminution de la phosphorylation de la PLC- $\gamma$ , de la p42/44 MAPK ainsi qu'une baisse de la synthèse d'ADN induite par le VEGF [118, 127]. Ces données montrent que ce résidu joue un rôle important dans la régulation de la prolifération des CE par le VEGFR-2. Ce même résidu a été reconnu comme interagissant avec les protéines adaptatrices Shc/Sck et Shb [128, 129]. La protéine Shc est connue pour interagir avec plusieurs récepteurs tyrosine kinase à la voie de Ras-MAPK [130] alors que Shb a été relié à l'activation de la PI3K ainsi qu'à la phosphorylation de FAK qui mène à la régulation de la migration cellulaire [131]. L'activation de la voie de signalisation de la MAPK/Erk survient en aval du récepteur, à la suite de la phosphorylation du résidu Tyr<sup>1175</sup>. Ce mécanisme

d'activation mène à la prolifération des CE. La Tyr<sup>1175</sup> phosphorylée qui entre en liaison et active la PLC- $\gamma$  mène à une cascade de signalisation qui requiert la protéine kinase C (PKC), c-Raf, MEK-1/-2 et ERK-1/-2 [118].

Une étude récente propose que la Tyr<sup>1173</sup> (forme murine du gène VEGFR-2, résidu qui correspond à la Tyr<sup>1175</sup> de la forme humaine) exerce un rôle très important dans la vasculogénèse des souris [132]. Ainsi, des souris homozygotes pour une version mutante du VEGFR-2 (Y1173F) meurent aux jours E8,5-E9,5 à cause d'une déficience de vaisseaux sanguins et d'une déficience marquée de précurseurs hématopoïétiques, un phénotype semblable à celui des souris VEGFR-2<sup>-/-</sup>. Une autre étude suggère que la phosphorylation de la Tyr<sup>1175</sup> est requise pour l'activation de la PI3K [121]. Par contre, cette étude contredit aussi l'implication de la Tyr<sup>1175</sup> dans l'activation de la PLC- $\gamma$ . Il se pourrait donc que ces observations soient plus le résultat de l'utilisation d'un récepteur chimérique (composé des domaines trans-membranaires et intracellulaire du VEGFR-2 fusionnés au domaine extracellulaire du récepteur CSF-1R/*c-fms*) qu'un effet physiologique réel.

#### 1.2.7.4 Résidu Tyr<sup>1214</sup>

La phosphorylation de la Tyr<sup>1214</sup> du VEGFR-2 favorise la régulation de la migration des CE induite par le VEGF [133], et celle de l'autophosphorylation du récepteur [134]. En effet, il a été observé que l'utilisation d'une forme mutante du VEGFR-2 au niveau du résidu Tyr<sup>1214</sup> (Y1214F) entraîne une diminution importante de la phosphorylation totale du récepteur après stimulation au VEGF. Ceci est produit en

parallèle avec une diminution de l'activation de certaines protéines de signalisation telles que PLC- $\gamma$ , MAPK et Src [134]. Par contre, ces observations n'ont pu être confirmées, la plupart des études qui ont utilisé cette forme mutante du VEGFR-2 n'observent pas une telle diminution de l'activité catalytique du récepteur ni de l'activation des enzymes PLC- $\gamma$ , ERK ou de la synthèse d'ADN [118, 133].

Récemment, la Tyr<sup>1214</sup> a été caractérisée comme responsable de l'activation de la Cdc42, qui active par la suite la SAPK2/3 (*Stress-activated Protein Kinase*)/p38 MAPK, deux protéines indispensables au remodelage de l'actine dans les fibres de stress. L'activation de la MAPKAPK-2 (*MAPK activated protein kinase-2*) et Hsp27 (*Heat shock protein 27*) survient suite à l'activation de ces cascades enzymatiques, déclenchant un remodelage de l'actine et ainsi la mobilité cellulaire [133]. Cette activité signalétique entraîne la polymérisation de l'actine et le rassemblement d'adhésions focales, convergeant vers la formation de fibres de stress et la contraction des CE qui est indispensable pour induire la migration et la prolifération cellulaire.

### 1.2.8 Le VEGFR-3

Le VEGFR-3 (Flt-4) est une glycoprotéine de 170-kDa. C'est un récepteur qui possède une grande affinité pour le VEGF-C et le VEGF-D [75], mais pas pour le VEGF-A, ni pour le VEGF-B et le PlGF. Au stade embryonnaire, le VEGFR-3 est exprimé au niveau de tout l'arbre vasculaire puis se restreint aux vaisseaux lymphatiques et à certains capillaires fenestrés [135, 136]. En effet, l'expression d'une forme soluble du VEGFR-3 inhibe la lymphangiogenèse fœtale et induit la régression des vaisseaux lymphatiques



déjà formés [66]. De plus, l'activation du VEGFR-3 par ses agonistes induit une protection des CE lymphatiques de l'apoptose causé par le sevrage [75]. Par ailleurs, nous observons une augmentation de l'expression du VEGFR-3 chez les personnes souffrant de chondrocyte ostéoarthritique par rapport à celles sans arthrite [137]. Le VEGFR-3 est traduit en un précurseur qui subit un clivage protéolytique au niveau de sa partie extracellulaire, cette dernière restant liée à sa partie transmembranaire par des ponts disulfures [36]. L'inactivation du gène codant pour VEGFR-3 entraîne un défaut dans le remodelage de l'arbre vasculaire avant l'apparition des vaisseaux lymphatiques [138]. La différenciation des CE, ainsi que la vasculogénèse, ne sont pas touchées par l'absence de VEGFR-3. Par contre, le développement de l'hématopoïèse au niveau de la membrane vitelline est très affecté, suggérant un rôle pour VEGFR-3 dans l'hématopoïèse [139]. Dans l'angiogénèse tumorale, le VEGFR-3 est ré-exprimé au niveau des CE des vaisseaux sanguins [140, 141]. Le blocage du VEGFR-3, lors du processus tumoral, entraîne une altération de l'angiogénèse et résulte en une diminution de la croissance tumorale [142]. Le VEGFR-3 est impliqué dans le lymphoedème héréditaire de type I [143, 144]. Cette maladie se transmet de manière autosomale dominante et les mutations décrites se trouvent dans la partie kinase de VEGFR-3. Ces mutations affectent la capacité d'autophosphorylation du récepteur [143, 144]. De plus, dans les hémangiomes, une mutation somatique dans la partie kinase de VEGFR-3 a été trouvée dans les CE de la lésion, mais pas dans celles du tissu sain environnant [145].

### 1.2.9 Neuropiline, co-récepteur et modulateur de l'activité du VEGFR-2

La neuropiline a été mise en évidence en 1991 à la surface des neurones d'embryons *Xenopus* et identifiée sous le nom d'antigène A5 [146]. En 1997, deux équipes scientifiques rapportèrent qu'il s'agissait d'un récepteur de SEMA3A, une des sémaphorines (SEMA) de classe 3 [147]. Un homologue de la neuropiline ayant plus tard été mis en évidence et nommé neuropiline-2 (NRP-2), la neuropiline fut renommée alors neuropiline-1 (NRP-1) [148]. Les NRPs sont des récepteurs dépourvus d'activité tyrosine kinase de 120 à 130-kDa [149, 150], composées de 5 domaines : une portion extracellulaire de 860 acides aminés composée de 3 domaines (a1a2, b1b2 et c), un domaine transmembranaire de 23 acides aminés, et un court domaine cytoplasmique d'environ 40 acides aminés [150]. Si les NRPs ont été identifiées à l'origine pour leur rôle essentiel dans le guidage axonal au cours du développement du système nerveux chez l'embryon [151], leur rôle a par la suite été démontré dans l'angiogenèse adulte, en agissant comme site de liaison (co-récepteur) du VEGF-A<sub>165</sub> [152, 153]. Il est intéressant de noter que d'autres familles de molécules (éphrine/Eph, nétrine/UNC5 et slit/Robo), originellement impliquées dans le développement du système nerveux, sont désormais associées à la vasculogenèse et à l'angiogenèse, suggérant un parallèle entre les molécules de l'angiogenèse et celles impliquées dans le guidage axonal [154].

### 1.2.9.1 Expression des neuropilines

Les NRPs sont présentes dans les vaisseaux matures et en développement, à la fois sur les cellules musculaires lisses (CML)[155] et sur les CE [156], mais également au niveau de l'endothélium vasculaire des tumeurs [155, 157-159]. L'expression de la NRP-2 au niveau endothélial semble être restreinte aux veines et aux vaisseaux lymphatiques [160]. L'expression de la NRP-1 est régulée chez les cellules endothéliales par le *Tumor necrosis factor  $\alpha$*  (TNF $\alpha$ ), les facteurs de transcription dHAND et Ets-1 et les dommages vasculaires [161]. L'expression de la NRP-1, mais pas de la NRP-2, sur les CE est accrue en présence de VEGF, par un mécanisme faisant intervenir VEGFR-2 [162].

### 1.2.9.2 Effets médiés par les neuropilines

Il y a eu beaucoup d'études sur le rôle des co-récepteurs (NRP-1, NRP-2) au cours du développement des CE artérielles, veineuses et lymphatiques. Ces observations nous amènent à suggérer des rôles spécifiques de ces co-récepteurs dans le développement du réseau artériel et veineux/lymphatique. La NRP-1 ne possède pas de domaine tyrosine kinase intracellulaire et par conséquent agit en conjonction avec d'autres récepteurs pour potentialiser la cascade signalétique via le VEGF-A<sub>165</sub> [163]. La NRP-2 ne possède pas, lui non plus, le domaine intracellulaire et peut se lier aux VEGF-A<sub>165</sub>, VEGF-A<sub>145</sub> et PlGF, et peut interagir avec le VEGFR-1 [164, 165].

La signalisation médiée par le VEGF-A<sub>165</sub> via la NRP-1 se ferait par la formation de complexes avec le VEGFR-2 [150, 164]. Contrairement à l'isoforme VEGF-A<sub>121</sub>, l'isoforme VEGF-A<sub>165</sub> se lie à la NRP-1, par la biais d'un domaine encodé par l'exon 7 [149, 156]. Le VEGF-A<sub>165</sub> se lie par ailleurs au VEGFR-2, via une région encodée par l'exon 4, ce qui conduit à la formation d'un complexe ternaire entre le VEGF-A<sub>165</sub>, la NRP-1 et le VEGFR-2 [166, 167]. La présence de la NRP-1 augmente la liaison du VEGF-A<sub>165</sub> au VEGFR-2 [167], et potentialise les effets mitogéniques et chimiotactiques induit par le VEGFR-2 [150, 168, 169]. Cela pourrait expliquer la moindre activité pro-angiogénique du VEGF-A<sub>121</sub> comparé au VEGF-A<sub>165</sub>, puisque que le VEGF-A<sub>121</sub> ne se lie pas à la NRP-1 [168]. Il a été reporté que la migration cellulaire médiée par le VEGFR-2, induite par le VEGF-A<sub>165</sub> et non par le VEGF-A<sub>121</sub>, est fortement augmentée en présence du co-récepteur NRP-1 [170]. Il a été démontré encore que la co-expression de la neuropiline-1 et du récepteur VEGFR-2 à la surface des cellules endothéliales augmente de 6,5 fois la phosphorylation du VEGFR-2 et de 2,5 fois la migration cellulaire [150], tout en accentuant la synthèse du facteur d'activation plaquettaire et la prolifération/migration des cellules endothéliales stimulées par le VEGF [169]. L'inactivation de la NRP-1 inhibe la liaison du VEGF-A<sub>165</sub> au récepteur VEGFR-2 et bloque l'activité mitogénique normalement induite par cette isoforme du VEGF.

Les NRPs agissent comme des médiateurs actifs dans la réponse immunitaire, le développement neuronal et dans l'angiogenèse [161]. La suppression du gène de NRP-2 compromet la formation de petits vaisseaux lymphatiques, menant à suggérer que le NRP-2 peut agir comme un co-récepteur pour le VEGFR-3 [171]. Le rôle de la neuropiline-1 dans l'angiogenèse a par ailleurs été documenté par des expériences de

transgénèse de la NRP-1 et a montré une létalité à 17,5 jours de vie embryonnaire avec développement d'une hyper-capillarité et la production de vaisseaux anormaux et d'une angiogenèse aberrante.

### 1.3 RÉACTION INFLAMMATOIRE

L'inflammation est définie comme une réponse physiologique de l'organisme face à une agression telle qu'une brûlure, une infection, une réaction auto-immune ou une allergie. Dans le cas habituel, l'inflammation est un processus bénéfique, rapide et de courte durée. Son but est d'éliminer les agents pathogènes ou de réparer les lésions tissulaires. Elle peut être divisée en deux stades : l'inflammation aiguë et l'inflammation chronique. L'inflammation aiguë vient de l'effet direct de médiateurs inflammatoires sur la contraction des CE, ainsi que la formation par ces dernières de brèches intercellulaires menant à l'extravasation des protéines plasmatiques [172]. Par contre, l'inflammation chronique implique le recrutement de cellules inflammatoires circulantes comme les monocytes et les polymorphonucléaires. Après activation de l'endothélium par un stimulus pro-inflammatoire, plusieurs types de molécules d'adhérences sont exprimés à sa surface, visant à faciliter le ralentissement et l'arrêt complet des cellules inflammatoires de la circulation au site enflammé. Ces cellules migrent par la suite vers l'interstitium et les tissus sous-endothéliaux en direction du chémoattractant dans le but d'y sécréter une panoplie de facteurs inflammatoires et angiogéniques, ainsi que pour y exercer des réactions radicalaires qui peuvent amplement endommager les tissus atteints.

Des données montrent que l'inflammation précède et/ou accompagne presque automatiquement l'angiogenèse dans des conditions tant physiologiques que pathologiques. Ces évidences s'appuient en partie sur des observations montrant que de nombreuses masses tumorales ont une perméabilité vasculaire accrue, et que des cellules inflammatoires telles que les neutrophiles et les macrophages sont souvent présentes aux sites angiogéniques [14, 173]. Par conséquent, plusieurs scientifiques ont porté une attention particulière à l'étude des mécanismes inflammatoires retrouvés en condition d'angiogenèse pathologique.

### **1.3.1 Le PAF, médiateur de l'inflammation**

Le facteur d'activation plaquettaire (PAF) fut découvert en 1970 en tant que facteur relâché par des leucocytes de lapin [174]. Le PAF est connu comme un puissant inducteur de multiples phénomènes biologiques tels que l'agrégation plaquettaire [175, 176], l'hypotension [177], la bronchoconstriction [178] et principalement sa capacité à engendrer l'inflammation [175, 176]. Cette dernière caractéristique est liée à l'augmentation de la perméabilité vasculaire qu'induit le PAF. En effet, le PAF se lie aux CE et provoque des changements au niveau du cytosquelette. Les changements morphologiques des CE entraînent une contraction transitoire de ces dernières et, subséquemment, la formation de brèches intercellulaires permettant ainsi aux protéines plasmatiques de migrer vers l'interstitium [176, 179, 180].

Des études *in vitro* ont permis de démontrer que le PAF sert de messenger intercellulaire et intracellulaire [181] et participe à l'angiogenèse de par son pouvoir à induire la migration des CE [42]. Dans un contexte pathologique, le PAF peut provoquer

une puissante réponse inflammatoire aiguë et chronique [182]. Suite à la liaison du PAF à ses récepteurs endothéliaux membranaires ou endosomaux, ce dernier produit une augmentation de calcium intracellulaire, une contraction du cytosquelette d'actine, un rétrécissement cellulaire suivie d'une hyperperméabilité vasculaire [183]. De plus, une co-localisation du PAF à la membrane plasmique avec la P-sélectine endothéliale peut avoir lieu. L'interaction de ces deux facteurs respectivement avec le récepteur du PAF (PAFR) et le *P-Selectin Glycosylated Ligand-1* (PSGL-1) de la surface des leucocytes favorise le roulement, l'activation et l'adhérence subséquente des leucocytes à l'endothélium [184].

### 1.3.2 PAF, inducteur du processus angiogénique

La libération du PAF à l'aide d'implants spongieux, *in vivo*, engendre un bourgeonnement de nouveaux vaisseaux sanguins chez la souris [185, 186], alors qu'*in vitro*, le PAF provoque directement la migration des CE [42]. Cette propriété est attribuable aussi bien à l'effet du PAF sur la migration endothéliale, qu'à la modulation PAF-dépendante des propriétés d'adhérence des CE. Le PAF, qui est responsable de l'augmentation de l'adhérence des plaquettes et de la transmission des leucocytes à travers la barrière endothéliale, permet la libération de la presque totalité des médiateurs angiogéniques [187]. D'autre part, le PAF paraît également jouer un rôle dans l'angiogenèse pathologique. Entre autre, le PAF peut être sécrété par plusieurs cellules tumorales [188]. Ce dernier, lorsque sécrété dans l'espace extracellulaire, exerce une influence de façon paracrine sur les CE et tumorales pour permettre la formation de

bourgeoisement de nouveaux vaisseaux sanguins et favorise directement la malignité des tumeurs en question [42, 186]. Ces données viennent appuyer les observations *in vivo* qui rapportent la liaison directe entre le PAF et les effets pro-métastatiques du TNF- $\alpha$  et de l'interleukine-1, de même que dans la formation ultérieure de métastases pulmonaires [189-191]. Il est à noter que le récepteur du PAF (PAFR) est exprimé par plusieurs souches de cellules tumorales [186, 192] proposant un rôle autocrine pathologique du PAF. De plus, une surexpression du PAFR *in vivo* [193] favorise l'apparition spontanée de tumeurs. Ceci peut confirmer le rôle pro-tumoral du PAF.

### 1.3.3 Le PAF, médiateur essentiel pour l'effet angiogénique du VEGF

Les Docteurs Sirois et Edelman ont démontré que le VEGF est un puissant inducteur de la synthèse du PAF [43]. Dans un contexte hypoxique, la grande majorité des tumeurs humaines présentent une augmentation importante de la sécrétion du VEGF dans le but de promouvoir leur vascularisation [156, 194-197]. Le VEGF s'infiltré vers les tissus environnants dans le but de stimuler le VEGFR-2 des CE induisant en conséquence la synthèse et l'exposition du PAF à la surface membranaire. Le VEGF et/ou le PAF entraîne une baisse rapide du contenu en F-actine, une redistribution de la vinculine endothéliale [198, 199] et un rétrécissement cellulaire par le biais d'une contraction du cytosquelette d'actine. Ce dernier provoque la formation de brèches intercellulaire endothéliale [198], induisant une augmentation de la perméabilité vasculaire. Ceci est considéré comme un signe aigü de l'angiogenèse [28]. Suite à cela, le VEGF et le PAF promouvoient la translocation rapide de la P-sélectine à la membrane

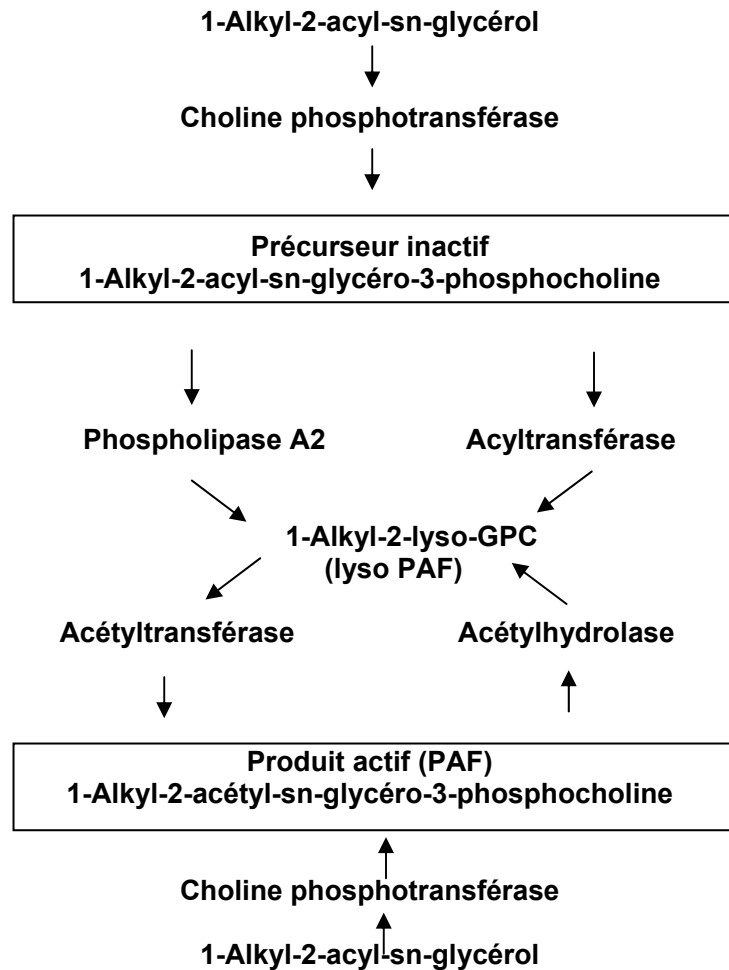


[168, 184]. L'activation du PSGL-1 et du PAFR des neutrophiles ou des monocytes circulants respectivement par la P-sélectine et le PAF induit leur roulement et favorise leur adhérence et leur transmigration vers les tissus sous-endothéliaux [200]. Le VEGF et le PAF sont sécrétés par les monocytes transformés en macrophages et les neutrophiles activés [173]. Les CE se dissocient partiellement de la membrane basale et migrent vers la source de VEGF ou de PAF grâce à la relâche des métalloprotéases par l'endothélium [201, 202]. La migration endothéliale induite par le VEGF est associée à la synthèse du PAF par l'endothélium [203]. Suite à l'effet mitogénique de VEGF, les CE vont s'assembler de façon tri-dimensionnelle dans le but de former un nouveau vaisseau sanguin souvent immature à cause de l'absence d'une membrane basale pleinement fonctionnelle. Ces nouveaux vaisseaux sanguins permettent la croissance rapide de la masse tumorale ainsi que la libération systémique de métastases et de VEGF pouvant influencer le processus angiogénique et la malignité tumorale à des foyers lointains.

Une autre étude vient confirmer le rôle crucial du PAF au niveau des effets angiogéniques du VEGF [188]. Cette étude rapporte que le PAF intervient directement dans la vascularisation de tumeurs induite par le VEGF. Ces chercheurs stipulent que le PAF synthétisé en réponse au VEGF amplifie la formation de nouveaux vaisseaux sanguins induite par le VEGF. Ainsi, le PAF participe aux processus pathologiques du VEGF, au moins au niveau des tumeurs. De là, il serait préférable d'enrichir nos connaissances des mécanismes via lesquels le VEGF induit la synthèse du PAF.

### 1.3.4 Biosynthèse du PAF

La biosynthèse du PAF passe par deux mécanismes distincts. Le premier est connu sous le nom de biosynthèse *de novo*, et répond aux besoins physiologiques de l'organisme. L'activité des enzymes qui le compose est principalement dictée par la disponibilité en substrat et permet une synthèse de PAF basale et constitutive [204]. Dans le contexte d'une réaction inflammatoire ou allergique, la voie principale est celle du remodelage. La synthèse commence soit par l'activation de la phospholipase A<sub>2</sub> cytosolique (cPLA<sub>2</sub>) ou d'une transacylase indépendante du Coenzyme A (CoA-IT) capable d'hydrolyser un phospholipide membranaire (généralement le 1-O-alkyl-2-arachidonoyl-sn-glycéro-3-phosphocholine) de nombreuses cellules de la réaction inflammatoire telles que les cellules polynucléaires neutrophiles et basophiles, les mastocytes, les monocytes, les macrophages, les cellules endothéliales et les plaquettes [205] générant ainsi un acide gras (acide arachidonique) et le lyso-PAF (1-alkyl-2-lyso-glycéro-3-phosphocholine), le précurseur du PAF [206, 207]. Le lyso-PAF est transformé, par la suite, en PAF par la lyso-PAF acétyltransférase qui catalyse le transfert du groupement acétyl de l'acétylCoA vers le groupement hydroxyl libre en position *sn-2* du lyso-PAF [206]. Il s'agit de l'étape limitante de la biosynthèse du PAF contrôlée par la phosphorylation/déphosphorylation de l'acétyltransférase. Le PAF n'est pas emmagasiné de façon constitutive dans les cellules, il est produit, en réponse à diverses stimulations par les cellules déjà citées. Le PAF est inactivé par désacétylation sous l'action d'une acétylhydrolase qui le transforme en lyso-PAF, lui-même transformé par une acyltransférase en précurseur inactif, le 1-O-alkyl-2-acyl-glycérophosphocholine. L'inhibition de l'acétylhydrolase augmente la concentration tissulaire du PAF (figure 4).



**Figure 4. Biosynthèse du PAF-acéther.** Dans la voie de synthèse par remodelage, la biosynthèse du précurseur du PAF, 1-O-alkyl-2-acyl-sn-glycérol-3-phosphorylcholine est hydrolysée par la phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) pour engendrer 1-O-alkyl-sn-glycérol-3-phosphorylcholine (lyso-PAF), précurseur immédiat du PAF dépourvu d'effet biologique, et un acide arachidonique. L'acétyltransférase convertit le lyso-PAF en PAF par l'ajout d'un acétate provenant de l'acétyl-CoA. La voie de novo fait d'abord intervenir l'acétylation du précurseur 1-O-alkyl-sn-glycérophosphate à l'aide d'un acétyltransférase ; cette nouvelle molécule subit ensuite une déphosphorylation par une phosphohydrolase. Finalement, un groupement phosphocholine issu d'une cytidine-diphosphate est ajoutée à ce précurseur, par une choline phosphotransférase, pour donner le PAF. Cette voie de synthèse n'est pas utilisée par toutes les cellules (Adaptée à partir de : Snyder, F. Med Bio, 416, 5-10,1996) [208].

### **1.3.5 Les récepteurs du PAF**

Le PAF, qui est un puissant médiateur inflammatoire [175, 176], agit sur son récepteur spécifique. Ce dernier comporte une séquence de 342 acides aminés. L'analyse du profil d'hydrophobie a montré la présence de sept domaines hydrophobes transmembranaires et couplé à une protéine G (RCPG) [209, 210], ce qui est une caractéristique commune de tous les récepteurs couplés à une protéine G. Ce RCPG est rencontré chez plusieurs types de cellules comme les leucocytes, les cellules musculaires lisses et les CE [210]. Il y a au moins deux promoteurs distincts qui sont impliqués dans la régulation transcriptionnelle de l'expression du gène du récepteur du PAF dans divers tissus et cellules. Il est à noter que suite aux études de liaison du groupe du Dr Bazan (1990), trois sites d'affinité différents et spécifiques ont été mis en évidence dont un à la surface membranaire et deux autres intracellulaires [211]. Ces résultats ont permis de distinguer deux sous-types de récepteurs du PAF, le premier existe au niveau du cytosol et le deuxième à la surface du noyau [210]. Ainsi, il a été possible d'inhiber de façon dose-dépendante l'agrégation plaquettaire induite par le PAF grâce à un antagoniste des récepteurs du PAF, le CV-3988 [212].

### **1.3.6 Adhésion des cellules inflammatoires aux CE**

L'activation des CE par un stimulus inflammatoire conduit à la translocation de la P-sélectine et à la synthèse du PAF. Ce dernier peut être co-localisé à la membrane plasmique avec la P-sélectine endothéliale. Comme évoqué précédemment, ces deux facteurs interagissent respectivement avec le PAFR et le PSGL-1 à la surface des

leucocytes, pour ainsi favoriser le roulement, l'activation et l'adhérence subséquente des leucocytes à l'endothélium [184]. Le roulement est caractérisé par un contact plus intime entre les cellules inflammatoires et les CE. Pendant cette étape, une augmentation marquée du nombre de molécules d'adhésion à la surface des cellules inflammatoires est observé. Il s'agit des  $\beta$  intégrines, et principalement les formes  $\alpha_L\beta_2$  et  $\alpha_M\beta_2$ . Le rôle de ces intégrines est de ralentir davantage les cellules inflammatoires à la surface des CE, les amenant à un arrêt complet près du site enflammé. Il est à noter que la P-sélectine joue un rôle important à ce stade. Les cellules inflammatoires sont principalement ancrées fermement aux CE par l'interaction de leurs intégrines. C'est principalement le CD18 (sous-unité  $\beta_2$ ) des intégrines CD11a/CD18 et CD11b/CD18 qui s'active. Ceci a été découvert à l'aide de souris CD18<sup>-/-</sup> qui présentent des défauts entre autre de recrutement des leucocytes dans le péritoine [213] et dans la peau [214]. La dernière étape est la transmigration. Elle se traduit par la migration des cellules inflammatoires à travers la monocouche de CE. Ceci va permettre aux cellules inflammatoires d'atteindre l'espace sous-endothélial dans le but d'arriver à la source de l'inflammation. La famille des intégrines est très impliquée à ce niveau (CD11a/CD18 et  $\alpha_4\beta_1$ ), de même que les ligands de la famille des CAM (PECAM-1 : *platelet endothelial*-CAM et ICAM-1) et en particulier PECAM-1 [215, 216].

Deux scénarios sont envisageables suite à l'évolution des étapes de l'adhésion : soit la réparation normale qui mène à une résolution et un retour à un tissu sain et fonctionnel. Dans le cas contraire, il se peut qu'il y ait une poursuite chronique d'un phénomène normal qui devient dégénératif et nuisible comme l'arthrite rhumatoïde et

l'inflammation chronique qui connaissent une affluence continue de cellules inflammatoires [217].

## 1.4 PROBLÉMATIQUE ET BUT DU PROJET DE RECHERCHE

Les Docteurs Sirois et Edelman ont prouvé qu'il était possible d'inhiber l'effet inflammatoire *in vivo* du VEGF à l'aide d'un prétraitement des animaux avec un antagoniste du récepteur du PAF, suggérant ainsi que l'hyperperméabilité vasculaire imputable au VEGF dépend de la synthèse du PAF [43]. Cette hypothèse fut confirmée via l'induction de la synthèse du PAF endothéliale par le VEGF au niveau des CE en culture. Cependant, les tyrosines impliquées dans la transphosphorylation de VEGFR-2/R-2 menant à la synthèse du PAF étaient inconnues. Conséquemment, en utilisant des mutagenèses dirigées, ceci pour effectuer des transfections transitoires de CE avec des plasmides codant pour le cDNA du récepteur VEGFR-2, et dont les tyrosines ciblées doivent être remplacées de façon séquentielle par une phénylalanine pour les résidus Tyr<sup>801</sup>, Tyr<sup>1059</sup>, Tyr<sup>1175</sup> et Tyr<sup>1214</sup>, nous avons voulu déterminer la contribution de ces tyrosines dans la synthèse du PAF. Par la suite, nous avons voulu confirmer ce fait par la mesures de l'expression et l'activation des tyrosines du VEGFR-2 impliquées dans les voies de signalisation menant à la synthèse du PAF, pour ce faire, nous avons utilisé des immunobuvardages de type Western.

## **2.0 ARTICLE**



**Identification of VEGF receptor-2 tyrosine phosphorylation sites involved  
in VEGF-mediated endothelial platelet-activating factor synthesis**

Abdennebi Rechka<sup>1,2</sup>, Paul-Eduard Neagoe<sup>1,2</sup>, Jean-Philippe Gratton<sup>2,3</sup>, Martin G. Sirois<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Research Centre, Montreal Heart Institute, <sup>2</sup>Department of pharmacology, Université de  
Montréal, <sup>3</sup>Institut de recherches cliniques de Montréal, Montréal, (QC), Canada

Running title: VEGF-mediated PAF synthesis

\*Correspondence should be addressed to:

Martin G. Sirois, Ph.D.

Research Center

Montreal Heart Institute

5000, Belanger Street

Montreal, Canada, H1T 1C8

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

Fax: (514) 376-1355

## ABSTRACT

Vascular endothelial growth factor (VEGF) inflammatory effects require acute platelet-activating factor (PAF) synthesis by endothelial cells (EC). We reported that VEGF-mediated PAF synthesis involves the activation of the homodimeric tyrosine kinase receptor VEGFR-2/R-2 which is leading to p38 and p42/44 mitogen-activated protein kinases (MAPKs) and secreted group V phospholipase A<sub>2</sub> (sPLA<sub>2</sub>-V) activation. We also reported that VEGF-A<sub>165</sub>-mediated prostacyclin (PGI<sub>2</sub>) synthesis requires VEGFR-1/R-2 heterodimeric receptor activation. Selective activation of VEGF receptors can act as a balance in the synthesis of pro-(PAF) and anti-(PGI<sub>2</sub>) inflammatory factors. It is unknown which VEGFR-2 tyrosine phosphorylation site(s) contribute(s) to PAF synthesis. Bovine aortic endothelial cells (BAEC) were transfected with pcDNA vectors encoding for native VEGF receptor-2 (VEGFR-2) cDNA, or one where tyrosine phosphorylation sites were mutated into phenylalanine (Y801F), (Y1059F), (Y1175F), (Y1214F); an empty pcDNA vector was used as negative control. Treatment of pcDNA-transfected BAEC with VEGF (10<sup>-9</sup> M) for 15 minutes increased PAF synthesis by 180%. In BAEC transfected with pcDNA vectors encoding mutated Y801F, Y1059F, Y1175F or Y1214F VEGFR-2 cDNA, we observed a marked reduction of VEGF-mediated PAF synthesis by 55, 61, 78 and 50% respectively as compared to pcDNA-transfected BAEC. Our data provide novel insight on the mechanisms by which VEGF promotes PAF synthesis.

**Key words:** Tyrosine kinase receptor, growth factors, VEGF, PAF, endothelial cells, cell signalling, inflammation, angiogenesis.

## INTRODUCTION

Angiogenesis, the formation of new capillaries from pre-existing ones, plays a crucial role in the development of pathologies such as atherosclerosis, proliferative retinopathies, and tumor growth metastasis [72, 218]. Previous studies established the contribution of vascular endothelial growth factor (VEGF) in angiogenesis [82]. VEGF is a member of a family which includes 5 different analogs namely: placental growth factor (PlGF) and VEGF-A, -B, -C, -D. The most studied VEGF analog is VEGF-A which comprises 5 isoforms of 206, 189, 165, 145 and 121 amino acids produced by alternative splicing [95]. The actions of VEGF analogs are mediated by the activation of tyrosine kinase receptors including VEGFR-1 and VEGFR-2, which are mainly expressed on endothelial cells (EC) and VEGFR-3, which is limited to lymphatic endothelium. Recent studies reported that neuropilin-1 (NRP-1), a transmembrane receptor, acts as a coreceptor, complexing with VEGFR-1 and VEGFR-2 and that NRP-1 specifically enhances VEGF-A<sub>165</sub> binding to VEGFR-2 and biological activities [150, 219, 220]. Upon ligand binding, VEGFRs undergo dimerization which can activate their intrinsic tyrosine kinase activities. The formation of VEGFR-1/R-1 homodimers provides minor autophosphorylation and biological functions [221]. VEGFR-1/R-2 heterodimerization promotes endothelial prostacyclin synthesis [222-224]. On our side, we observed that VEGF-A<sub>165</sub> through the activation of VEGFR-2/R-2 promotes EC migration, proliferation and vascular permeability through the synthesis of platelet-activating factor (PAF) [43, 169, 216].

Previous studies reported that PAF alone can induce angiogenesis and contribute to VEGF-A<sub>165</sub> angiogenic activity [183, 186, 225]. Using selective inhibitors, we showed

that VEGF-mediated PAF synthesis is driven by the activation of the secreted phospholipase A<sub>2</sub> group V (sPLA<sub>2</sub>-V), which is positively regulated by the activation of p38 and p42/44 mitogen-activated protein kinases (MAPKs) [203]. These observations are in agreement with previous studies reporting that VEGFR-2 homodimerization leads to a strong VEGFR-2 autophosphorylation on tyrosine (Y) residues which are essential for the recruitment and activation of Src homology 2 (SH2)-bearing proteins involved in intracellular signal transmission. For instance, Y<sup>1059</sup> residue is located in VEGFR-2 tyrosine kinase catalytic domain and its phosphorylation is involved as a docking site to recruit molecules containing SH2, SH3 or PTB domains and conveys signals to downstream pathways [226]. The phosphorylation of Y<sup>1175</sup> residue is essential for phospholipase C (PLC)- $\gamma$  recruitment and activation as well as to convey ERK1/2-mediated signal to DNA synthesis and cell proliferation [118]. The phosphorylation of Y<sup>1214</sup> is needed for p38 MAPK-mediated actin remodeling and cellular migration [133, 216, 227]. Finally, the phosphorylation of Y<sup>801</sup> residue has been linked to PI3K association to VEGFR-2 docking site and prosurvival, anti-apoptotic activity [121].

As we previously reported the contribution of p38 and p42/44 MAPKs in VEGF-mediated endothelial PAF synthesis, we then wanted to delineate the contribution of VEGFR-2 tyrosine phosphorylation sites on VEGF mediated PAF synthesis.

## MATERIAL & METHODS

### Cell culture

Bovine aortic endothelial cells (BAEC) were isolated from freshly harvested aortas, cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Invitrogen, Pickering, ON) containing 5% fetal bovine serum (FBS; Medicorp Inc, Montreal, QC), and antibiotics (100 units/ml penicillin and 1 µg/ml streptomycin; Sigma Chem., St-Louis, MO). BAEC were characterized as described previously [43, 216]. Cells were not passaged for more than eight cycles.

### Plasmids and transfections

Single point mutations resulting in codon change from tyrosine (Y) to phenylalanine (F) for residue Y<sup>801</sup>, Y<sup>1175</sup>, Y<sup>1059</sup> and Y<sup>1214</sup> were achieved using the QuikChange site-directed mutagenesis kit (Stratagene, Kirkland, WA) on human VEGFR-2 cDNA (in pRK7) [228]. All mutations were verified by DNA sequencing. BAEC were transfected at 80% confluence using Lipofectamine 2000 according to the manufacturer's protocol (Invitrogen, Burlington, ON) either in 35- or 100-mm dishes (depending on experiments). 24 hours post-transfection, fresh culture media (DMEM / 10% FBS / antibiotics) was added and the cells were maintained in this culture media for an additional 24 hours to reach endothelial cell confluence.

### Measurement of PAF synthesis

PAF synthesis by BAEC was measured by the incorporation of <sup>3</sup>H-acetate into lyso-PAF as described previously [43, 216]. Briefly, at 48 hours post-transfection of BAEC in 35-

mm tissue culture plates, confluent BAEC were rinsed with HBSS (Hank's balanced salt solution) / HEPES ( $10^{-2}$  M, pH 7.4). Cells were then stimulated for 15 minutes in 1 ml of HBSS-HEPES ( $10^{-2}$  M, pH 7.4),  $\text{CaCl}_2$  ( $10^{-2}$  M),  $^3\text{H}$ -acetate (25  $\mu\text{Ci}$ ) (New England Nuclear, Boston, MA) plus VEGF ( $10^{-9}$  M) (human VEGF- $A_{165}$ , PeproTech, Rocky Hill, NJ). The reaction was stopped by addition of acidified methanol ( $5 \times 10^{-2}$  M acetic acid), the wells were scraped and added to chloroform (2.5 ml) and 0.1 M sodium acetate (1 ml) mixture. Culture plates were washed twice with 1 ml of methanol, added to the chloroform mixture, shaken vigorously and centrifuged for 2 minutes at 1700 rpm. The upper phase was discarded and the chloroform phase was washed twice with 2 ml of the organic phase of HBSS-HEPES ( $10^{-2}$  M)-methanol-chloroform-sodium acetate (0.1 M) solution (1:2.5:3.75:1). Isolated lipids were dried under a stream of  $\text{N}_2$  gas, redissolved in 180  $\mu\text{l}$  of mobile phase solvent (water-chloroform-methanol 5:40:55) and purified by normal phase HPLC column (4.5x250 mm, 5  $\mu\text{m}$  silica particle size; Varian, Harbour City, CA) and eluted with the mobile phase solvent at a 0.5 ml/minute flow rate. Fractions corresponding to  $^3\text{H}$ -PAF were quantified by counting radioactivity with a  $\beta$ -counter.

### **Western blot analyses of VEGFR-2 expression and phosphorylation**

Forty-two (42) hours post-seeding of transfected BAEC in 100-mm culture dishes, confluent BAEC were serum-starved in DMEM with antibiotics for 6 hours, rinsed with HBSS, then stimulated with or without VEGF- $A_{165}$  ( $10^{-9}$  M) in a solution of HBSS/HEPES ( $10^{-2}$  M, PH 7.4),  $\text{CaCl}_2$  ( $10^{-2}$  M) for 7.5 minutes in  $37^\circ\text{C}$ . Cell were solubilized with lysis buffer (500  $\mu\text{l}$ ) with PMSF  $10^{-3}$  M, leupeptin 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , aprotinin 30

$\mu\text{g/ml}$  and  $\text{NaVO}_3$   $10^{-9}$  M (Sigma) and incubated at  $4^\circ\text{C}$  for 30 minutes. Cells were scraped using a plastic policeman and protein concentration determined by Bradford assay.

Proteins were transferred onto a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane. Membranes were blocked in immunoblot buffer (Tris-HCl  $2.5 \times 10^{-2}$  M, NaCl 0.15 M, pH: 7.5) with 5% BSA (Bovine serum Albumine) for 1 hour at room temperature with gentle agitation and probed with primary antibodies as rabbit polyclonal phospho-Y<sup>1059</sup>-VEGFR-2, rabbit polyclonal phospho-Y<sup>1214</sup>-VEGFR-2 (abcam, Cambridge, MA), rabbit monoclonal, phospho-Y<sup>1175</sup>-VEGFR-2 (Danvers, MA) and phospho-Y<sup>801</sup>-VEGFR-2 [228] (1:1000 dilution) overnight. Membranes were stripped using Re-Blot Plus Strong stripping solution (Chemicon International, Temecula, CA) for 20 min and reprobed with Flk-1 mouse monoclonal IgG (1:1000 dilution; Santa-Cruz Biotechnology, Inc). Bands were visualized using LumiGlo<sup>TM</sup> (New England Biolabs, Pickering, ON). The density of the bands was determined using Quantity One software (Bio-Rad, Mississauga, ON) [168].

### **Statistical analysis**

Data are mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). Statistical comparisons were made by analysis of variance. Data were considered significantly different if values of  $p < 0.05$  were observed.

## RESULTS

### **Phosphorylation of VEGFR-2 tyrosine residues in endothelial cells transfected with cDNA VEGFR-2 tyrosine mutants**

We previously reported that VEGF induces PAF synthesis from endothelial cells through VEGFR-2 activation [216]. However, we did not address which VEGFR-2 tyrosine phosphorylation sites are involved in VEGF-mediated endothelial PAF synthesis. To do so, we used in the current study: native BAEC, BAEC transfected with an empty pcDNA vector (negative control) and with pcDNA vectors encoding for native VEGF receptor-2 (VEGFR-2) cDNA, or tyrosine phosphorylation sites mutated into phenylalanine (Y801F), (Y1059F), (Y1175F) and (Y1214F).

In a first series of experiment, we performed a dose ( $10^{-11}$  -  $10^{-8}$  M) and time-dependent experiment to assess the optimal conditions for VEGF to promote VEGFR-2 phosphorylation. As previously reported [203], we observed that VEGF ( $10^{-9}$  M) induced a maximal VEGFR-2 phosphorylation within 7.5 minutes (data not shown) and those parameters were selected for our following studies related to VEGFR-2 phosphorylation.

Then, we assessed that the BAEC transfected with selected plasmids did maintain their intrinsic VEGFR-2 kinase activity. Native and transfected BAEC were stimulated with phosphate buffer saline (PBS; control) and with VEGF ( $10^{-9}$  M) for 7.5 minutes and we quantified the levels of tyrosine phosphorylation of mutated cells as compared to native untransfected BAEC and transfected BAEC with an empty pcDNA plasmid.

In BAEC transfected either with an empty pcDNA vector or with a pcDNA vector encoding for native VEGF receptor-2, we observed that the capacity of VEGF to promote the phosphorylation of VEGFR-2 tyrosine residues (Y<sup>801</sup>, -Y<sup>1059</sup>, -Y<sup>1175</sup>, -Y<sup>1214</sup>) as



compared to native untransfected BAEC was maintained (Figures 1-4). Then, we assessed the capacity of selected plasmids in which tyrosine residues were substituted to reduce the phosphorylation of corresponding endogenous VEGFR-2 tyrosine residues. In BAEC encoding pcDNA VEGFR-2 mutants (Y801F, Y1059F, Y1175F or Y1214F), we observed a reduction of VEGF-mediated VEGFR-2-Y<sup>801</sup>, -Y<sup>1059</sup>, -Y<sup>1175</sup> and -Y<sup>1214</sup> phosphorylation by 73, 84, 89 and 47% respectively as compared to their corresponding control BAEC transfected with an empty pcDNA vector (Figures 1-4).

### **Contribution of VEGFR-2 tyrosine residues on VEGF-mediated PAF synthesis**

We then addressed the synthesis of PAF in native BAEC and in transfected BAEC encoding pcDNA VEGFR-2 mutants (Y801F, Y1059F, Y1175F or Y1214F). As previously reported, native and transfected BAEC were stimulated with PBS or VEGF ( $10^{-9}$  M) for 15 minutes which is the optimal time period to promote endothelial PAF synthesis [43, 216]. In native BAEC, VEGF ( $10^{-9}$  M) increased PAF synthesis by 300% as compared to PBS-treated cells. In BAEC transfected with an empty pcDNA vector or with pcDNA vector encoding for native VEGF receptor-2, we observed that VEGF ( $10^{-9}$  M) increased PAF synthesis by 180 and 130% as compared to their corresponding control BAEC stimulated with PBS. In BAEC encoding pcDNA VEGFR-2 mutants (Y801F, Y1059F, Y1175F or Y1214F), we observed a significant reduction of VEGF-mediated PAF synthesis by 55, 61, 78 and 50% respectively as compared to pcDNA-transfected BAEC stimulated with VEGF ( $10^{-9}$  M) (Figure 5).

## DISCUSSION

In the current study, we did observe that the autophosphorylation of VEGFR-2 contributes to VEGF-mediated endothelial PAF synthesis and that the induction of PAF synthesis does not seem to be unique to the phosphorylation of only one VEGFR-2 tyrosine residue as the reduction of VEGFR-2-Y<sup>801</sup>, -Y<sup>1059</sup>, -Y<sup>1175</sup> or -Y<sup>1214</sup> did contribute in all cases to a marked reduction of endothelial PAF synthesis as compared to control cells transfected with a control pcDNA vector.

Previous studies reported that VEGF promotes the phosphorylation of VEGFR-2 tyrosine residues which activate distinct and common intracellular signaling pathways, leading to cell proliferation, migration and permeability, this latter being namely mediated by the induction of endothelial PAF synthesis [43, 132, 229, 230]. Those signaling events are pivotal to the induction of pathological angiogenesis such as tumor growth, atherosclerosis, rheumatoid arthritis, retinopathies and other diseases associated to dysregulated formation of new blood vessels [82]. In order to develop pharmaceutical drug(s) that may suppress pathological angiogenesis, it is important to identify the tyrosine residues involved in the critical signaling pathways upon VEGFR-2 activation.

We reported that VEGF-mediated PAF synthesis is dependent on VEGFR-2/R-2 homodimerisation [216] and implies the activation of two parallel intracellular pathways: 1) the Ras-independent pathway through the downstream activation of PLC- $\gamma$ / PKC/ Raf and p42/44 MAPK, and 2) the activation of p38 MAPK pathway [203]. We then observed that the activation of p38 and p42/44 MAPK which form a constitutive multi-protein complex with the mitogen-stress kinase (MSK1) leads to MSK1 phosphorylation and the activation of the secreted phospholipase A<sub>2</sub> type V (sPLA<sub>2</sub>-V) which is essential

to PAF synthesis [231]. However, in those studies, we did not delineate which VEGFR-2 tyrosine phosphorylation sites are involved in the activation of downstream intracellular signaling pathways leading to PAF synthesis.

Using, endothelial cells transfected with pcDNA vectors encoding for VEGFR-2 mutated tyrosine phosphorylation sites, we thus wanted to address the potential contribution of different VEGFR-2 tyrosine phosphorylation sites on VEGF-mediated PAF synthesis. Firstly, we did observe that the phosphorylation of VEGFR-2-Y<sup>1175</sup> is the predominant tyrosine phosphorylated upon VEGF stimulation, and that the transfection of endothelial cells with a plasmid encoding pcDNA VEGFR-2 mutants (Y1175F) did provide the highest inhibition of VEGF-mediated PAF synthesis. These data are in line with a previous study reporting that the major autophosphorylation site on VEGFR-2 is Y<sup>1175</sup>, and that it is the major PLC- $\gamma$  binding site which is essential to downstream PLC- $\gamma$ -PKC-p42/44 MAPK activation [118]. These observations support our current and previous data suggesting that VEGF-mediated phosphorylation of VEGFR-2-Y<sup>1175</sup> and downstream PLC- $\gamma$ -PKC-p42/44 MAPK activation is essential to endothelial PAF synthesis.

It has also been reported that the phosphorylation of VEGFR-2-Y<sup>1214</sup> leads to the activation of the stress-activated protein kinases (SAPK)2/p38 MAPK pathway which is essential in triggering endothelial cell actin polymerization and cell migration [133, 232]. It has also been reported that the activation of VEGFR-2-Y<sup>1214</sup> does not contribute to PLC- $\gamma$ -PKC-p42/44 MAPK pathway [118, 132, 133]. As mentioned earlier, we previously reported that p38 and p42/44 MAPK form a constitutive multi-protein complex with the mitogen-stress kinase (MSK1) and that dual activation of p38 and p42/44 MAPK is

needed to promote MSK1 phosphorylation and downstream the activation of sPLA<sub>2</sub>-V and PAF synthesis. In our study, we observed in BAEC transfected with a plasmid encoding for VEGFR-2 (Y1214F) a reduction of VEGFR-2-Y<sup>1214</sup> phosphorylation and PAF synthesis mediated by VEGF. These observation are thus in agreement with the previous demonstration that VEGFR-2-Y<sup>1214</sup> activation leads to p38 MAPK activation and downstream activities including endothelial cell movement and PAF synthesis.

Other groups reported that VEGF-mediated phosphorylation of VEGFR-2-Y<sup>801</sup> is involved in the activation of the p85 subunit phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) and downstream activation of Akt and endothelial nitric-oxide synthase (eNOS) and nitric oxide (NO) production [121, 228]. Another group reported that VEGFR-2-Y<sup>1175</sup> activation regulates VEGF-induced PI3K activation and cell migration [131, 132]. Therefore, although the activation of PLC- $\gamma$ -PKC-p42/44 MAPK pathway is unique to VEGFR-2-Y<sup>1175</sup> activation, it appears that VEGFR-2-Y<sup>1175</sup> can contribute to activate other intracellular signaling pathways. This latter observation is in agreement with previous studies reporting that eNOS is a Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin (Ca<sup>2+</sup>/CaM)-dependent enzyme, which is activated by intracellular Ca<sup>2+</sup> release upon phospholipase C- $\gamma$  (PLC- $\gamma$ ) activation [233-236]. In a previous study, we reported that VEGF-mediated NO was independent from PAF synthesis and that NO synthesis does not contribute to promote VEGF-mediated PAF synthesis [237]. Thus, we were surprised to observe in our current study a reduction of PAF synthesis in BAEC transfected with a plasmid encoding pcDNA VEGFR-2 (Y801F) mutant. However, based on the aforementioned observation regarding the dual activation of eNOS by the phosphorylation of VEGFR-2-Y<sup>801</sup> and Y<sup>1175</sup> residues, we cannot rule out the possibility that the activation of VEGFR-2-Y<sup>801</sup> is limited to the

activation of PI3K signalling pathway and that it may not participate directly or indirectly to the activation of selected kinases associated to endothelial PAF synthesis. Another possibility could be that the blockade of VEGFR-2-Y<sup>801</sup> phosphorylation interferes with the activation of the VEGFR-2 tyrosine residues.

Another major VEGFR-2 tyrosine (Y<sup>1054/1059</sup>) phosphorylation site is located in the tyrosine kinase catalytic domain [119] which appears to be needed for maximal intrinsic VEGFR-2 kinase activity. Although specific intracellular kinase activities have not been yet associated to VEGFR-2-Y<sup>1054/1059</sup> phosphorylation, it has been reported that Y<sup>1054/1059</sup> phosphorylation is responsible for VEGFR-2 internalization upon its activation. However, studies remain to be performed to confirm whether VEGFR-2 internalization is needed to support phosphorylation of intracellular substrates [122]. In our present study, we did observe that the blockade of VEGFR-2- Y<sup>1059</sup> phosphorylation did reduce significantly the synthesis of PAF in transfected BAEC encoding pcDNA VEGFR-2 (Y1059F). Although, we cannot speculate on the mechanisms regulated by the activation of VEGFR-2- Y<sup>1059</sup>, it is interesting to report a biological activity (PAF synthesis) associated to its phosphorylation.

In summary, our data demonstrate that the phosphorylation of at least 4 different VEGFR-2 tyrosine residues can contribute to support VEGF-mediated endothelial PAF synthesis. In addition, since the tyrosine (Y<sup>1175</sup>) residue is the major autophosphorylation site on VEGFR-2 and that it is the major PLC- $\gamma$  binding site that regulates endothelial cell proliferation and PAF synthesis, that contribute to VEGF-mediated inflammatory response and pathological angiogenesis, it could thus be considered as a potential target for the development of a selective VEGFR-2 kinase inhibitor.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR; MOP-43919) and from the Heart and Stroke Foundation of Québec to Dr. Sirois. Dr. Sirois is recipient of a senior scientist scholarship from the *Fonds de la recherche en santé du Québec* (FRSQ).

## REFERENCES

- Bernatchez, P. N., Allen, B. G., Gelinas, D. S., Guillemette, G. and Sirois, M. G. (2001). Regulation of VEGF-induced endothelial cell PAF synthesis: role of p42/44 MAPK, p38 MAPK and PI3K pathways. *Br J Pharmacol*, 134(6), 1253-1262.
- Bernatchez, P. N., Rollin, S., Soker, S. and Sirois, M. G. (2002). Relative effects of VEGF-A and VEGF-C on endothelial cell proliferation, migration and PAF synthesis: Role of neuropilin-1. *J Cell Biochem*, 85(3), 629-639.
- Bernatchez, P. N., Soker, S. and Sirois, M. G. (1999). Vascular endothelial growth factor effect on endothelial cell proliferation, migration, and platelet-activating factor synthesis is Flk-1-dependent. *J Biol Chem*, 274(43), 31047-31054.
- Blanes, M. G., Oubaha, M., Rautureau, Y. and Gratton, J. P. (2007). Phosphorylation of tyrosine 801 of vascular endothelial growth factor receptor-2 is necessary for Akt-dependent endothelial nitric-oxide synthase activation and nitric oxide release from endothelial cells. *J Biol Chem*, 282(14), 10660-10669.
- Brkovic, A. and Sirois, M. G. (2007). Vascular permeability induced by VEGF family members in vivo: role of endogenous PAF and NO synthesis. *J Cell Biochem*, 100(3), 727-737.
- Brock, T. A., Dvorak, H. F. and Senger, D. R. (1991). Tumor-secreted vascular permeability factor increases cytosolic Ca<sup>2+</sup> and von Willebrand factor release in human endothelial cells. *Am J Pathol*, 138(1), 213-221.
- Busse, R. and Mulsch, A. (1990). Calcium-dependent nitric oxide synthesis in endothelial cytosol is mediated by calmodulin. *FEBS Lett*, 265(1-2), 133-136.
- Bussolino, F. and Camussi, G. (1995). Platelet-activating factor produced by endothelial cells. A molecule with autocrine and paracrine properties. *Eur J Biochem*, 229(2), 327-337.
- Carmeliet, P. (2000). Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med*, 6(4), 389-395.
- Cross, M. J., Dixelius, J., Matsumoto, T. and Claesson-Welsh, L. (2003). VEGF-receptor signal transduction. *Trends Biochem Sci*, 28(9), 488-494.
- Dayanir, V., Meyer, R. D., Lashkari, K. and Rahimi, N. (2001). Identification of tyrosine residues in vascular endothelial growth factor receptor-2/FLK-1 involved in activation of phosphatidylinositol 3-kinase and cell proliferation. *J Biol Chem*, 276(21), 17686-17692.

- Dougher-Vermazen, M., Hulmes, J. D., Bohlen, P. and Terman, B. I. (1994). Biological activity and phosphorylation sites of the bacterially expressed cytosolic domain of the KDR VEGF-receptor. *Biochem Biophys Res Commun*, 205(1), 728-738.
- Dougher, M. and Terman, B. I. (1999). Autophosphorylation of KDR in the kinase domain is required for maximal VEGF-stimulated kinase activity and receptor internalization. *Oncogene*, 18(8), 1619-1627.
- Ferrara, N. and Davis-Smyth, T. (1997). The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev*, 18(1), 4-25.
- Folkman, J. (1991). What is the evidence that tumors are angiogenesis-dependent? . *J. Natl*, 82, 4-6.
- Folkman, J. and Klagsbrun, M. (1987). Angiogenic factors. *Science*, 235(4787), 442-447.
- Fujisawa, H., Takagi, S. and Hirata, T. (1995). Growth-associated expression of a membrane protein, neuropilin, in *Xenopus* optic nerve fibers. *Dev Neurosci*, 17(5-6), 343-349.
- Gelinas, D. S., Bernatchez, P. N., Rollin, S., Bazan, N. G. and Sirois, M. G. (2002). Immediate and delayed VEGF-mediated NO synthesis in endothelial cells: role of PI3K, PKC and PLC pathways. *Br J Pharmacol*, 137(7), 1021-1030.
- Herrera, A. H., Xiang, L., Martin, S. G., Lewis, J. and Wilson, J. G. (1998). Analysis of complement receptor type 1 (CR1) expression on erythrocytes and of CR1 allelic markers in Caucasian and African American populations. *Clin Immunol Immunopathol*, 87(2), 176-183.
- Holmqvist, K., Cross, M. J., Rolny, C., Hagerkvist, R., Rahimi, N., Matsumoto, T., Claesson-Welsh, L. and Welsh, M. (2004). The adaptor protein shb binds to tyrosine 1175 in vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor-2 and regulates VEGF-dependent cellular migration. *J Biol Chem*, 279(21), 22267-22275.
- Huttenlocher, A., Sandborg, R. R. and Horwitz, A. F. (1995). Adhesion in cell migration. *Curr Opin Cell Biol*, 7(5), 697-706.
- Lamallice, L., Houle, F., Jourdan, G. and Huot, J. (2004). Phosphorylation of tyrosine 1214 on VEGFR2 is required for VEGF-induced activation of Cdc42 upstream of SAPK2/p38. *Oncogene*, 23(2), 434-445.



- Makinen, T., Olofsson, B., Karpanen, T., Hellman, U., Soker, S., Klagsbrun, M., Eriksson, U. and Alitalo, K. (1999). Differential binding of vascular endothelial growth factor B splice and proteolytic isoforms to neuropilin-1. *J Biol Chem*, 274(30), 21217-21222.
- Marchand, C., Favier, J. and Sirois, M. G. (2006). Role of MSK1 in the signaling pathway leading to VEGF-mediated PAF synthesis in endothelial cells. *J Cell Biochem*, 98(5), 1095-1105.
- Montrucchio, G., Lupia, E., Battaglia, E., Del Sorbo, L., Boccellino, M., Biancone, L., Emanuelli, G. and Camussi, G. (2000). Platelet-activating factor enhances vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell motility and neoangiogenesis in a murine matrigel model. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 20(1), 80-88.
- Neagoe, P. E., Lemieux, C. and Sirois, M. G. (2005). Vascular endothelial growth factor (VEGF)-A165-induced prostacyclin synthesis requires the activation of VEGF receptor-1 and -2 heterodimer. *J Biol Chem*, 280(11), 9904-9912.
- Petrova, T. V., Makinen, T. and Alitalo, K. (1999). Signaling via vascular endothelial growth factor receptors. *Exp Cell Res*, 253(1), 117-130.
- Rollin, S., Lemieux, C., Maliba, R., Favier, J., Villeneuve, L. R., Allen, B. G., Soker, S., Bazan, N. G., Merhi, Y. and Sirois, M. G. (2004). VEGF-mediated endothelial P-selectin translocation: role of VEGF receptors and endogenous PAF synthesis. *Blood*, 103(10), 3789-3797.
- Rousseau, S., Houle, F. and Huot, J. (2000). Integrating the VEGF signals leading to actin-based motility in vascular endothelial cells. *Trends Cardiovasc Med*, 10(8), 321-327.
- Rousseau, S., Houle, F., Kotanides, H., Witte, L., Waltenberger, J., Landry, J. and Huot, J. (2000). Vascular endothelial growth factor (VEGF)-driven actin-based motility is mediated by VEGFR2 and requires concerted activation of stress-activated protein kinase 2 (SAPK2/p38) and geldanamycin-sensitive phosphorylation of focal adhesion kinase. *J Biol Chem*, 275(14), 10661-10672.
- Sakurai, Y., Ohgimoto, K., Kataoka, Y., Yoshida, N. and Shibuya, M. (2005). Essential role of Flk-1 (VEGF receptor 2) tyrosine residue 1173 in vasculogenesis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(4), 1076-1081.
- Sato, Y., Kanno, S., Oda, N., Abe, M., Ito, M., Shitara, K. and Shibuya, M. (2000). Properties of two VEGF receptors, Flt-1 and KDR, in signal transduction. *Ann N Y Acad Sci*, 902, 201-205; discussion 205-207.

- Shibuya, M. (2006). Vascular endothelial growth factor receptor-1 (VEGFR-1/Flt-1): a dual regulator for angiogenesis. *Angiogenesis*, 9(4), 225-230; discussion 231.
- Sirois, M. G. and Edelman, E. R. (1997). VEGF effect on vascular permeability is mediated by synthesis of platelet-activating factor. *Am J Physiol*, 272(6 Pt 2), H2746-2756.
- Soker, S., Takashima, S., Miao, H. Q., Neufeld, G. and Klagsbrun, M. (1998). Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell*, 92(6), 735-745.
- Takahashi, T., Yamaguchi, S., Chida, K. and Shibuya, M. (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(11), 2768-2778.
- Wu, H. M., Yuan, Y., Zawieja, D. C., Tinsley, J. and Granger, H. J. (1999). Role of phospholipase C, protein kinase C, and calcium in VEGF-induced venular hyperpermeability. *Am J Physiol*, 276(2 Pt 2), H535-542.
- Xia, P., Aiello, L. P., Ishii, H., Jiang, Z. Y., Park, D. J., Robinson, G. S., Takagi, H., Newsome, W. P., Jirousek, M. R. and King, G. L. (1996). Characterization of vascular endothelial growth factor's effect on the activation of protein kinase C, its isoforms, and endothelial cell growth. *J Clin Invest*, 98(9), 2018-2026.

## FIGURE LEGENDS

### **Figure 1: Phosphorylation of Y<sup>801</sup>-VEGFR-2 residue in native and transfected BAEC.**

Confluent and quiescent native (non-transfected; NT) BAEC, and transfected with pcDNA, Y801F and VEGFR-2 plasmids (100-mm dishes) were stimulated with PBS (white column) or VEGF ( $10^{-9}$  M) (black column) for 7.5 minutes. Cell lysates were immunoblotted against an anti-p-Y<sup>801</sup>-VEGFR-2 antibody. Immunoreactive bands were visualized by LumiGlo, digitized using a 2-dimensional gel scanner and quantified using Quantity One software (lower bands). Membranes were subsequently stripped and reblotted against an anti-VEGFR-2 antibody and the immunoreactive bands were visualized as above (upper bands). Optical densities (OD) of the bands were measured and the OD of non-transfected (NT) BAEC treated with PBS was set to 1. The relative phosphorylation level (RP) of Y<sup>801</sup>-VEGFR-2 was expressed as a function of the protein expression level of VEGFR-2, and the results normalized as compared to NT-BAEC treated with PBS.

### **Figure 2: Phosphorylation of Y<sup>1059</sup>-VEGFR-2 residue in native and transfected BAEC.**

Cells were treated as described in Figure 1, cell lysates were immunoblotted against an anti-p-Y<sup>1059</sup>-VEGFR-2 antibody.

### **Figure 3: Phosphorylation of Y<sup>1175</sup>-VEGFR-2 residue in native and transfected BAEC.**

Cells were treated as described in Figure 1, cell lysates were immunoblotted against an anti-p-Y<sup>1175</sup>-VEGFR-2 antibody.

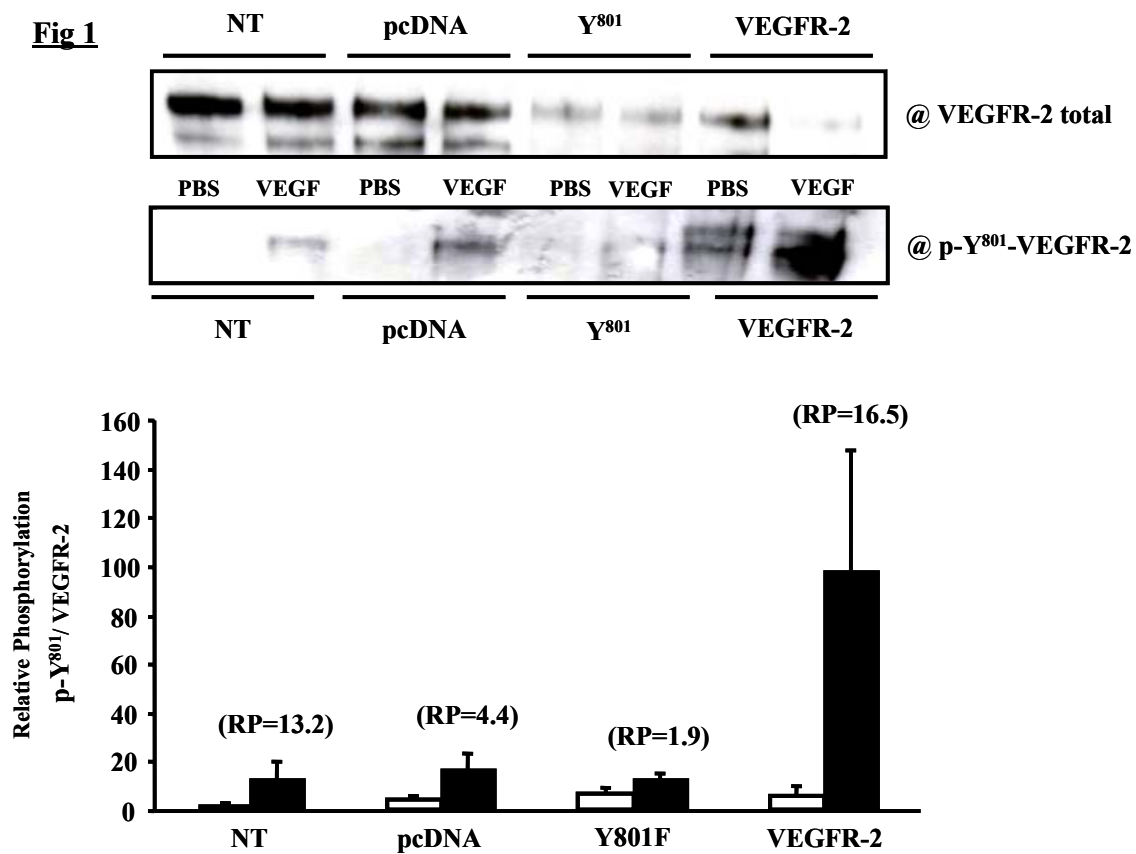
**Figure 4: Phosphorylation of Y<sup>1214</sup>-VEGFR-2 residue in native and transfected BAEC.**

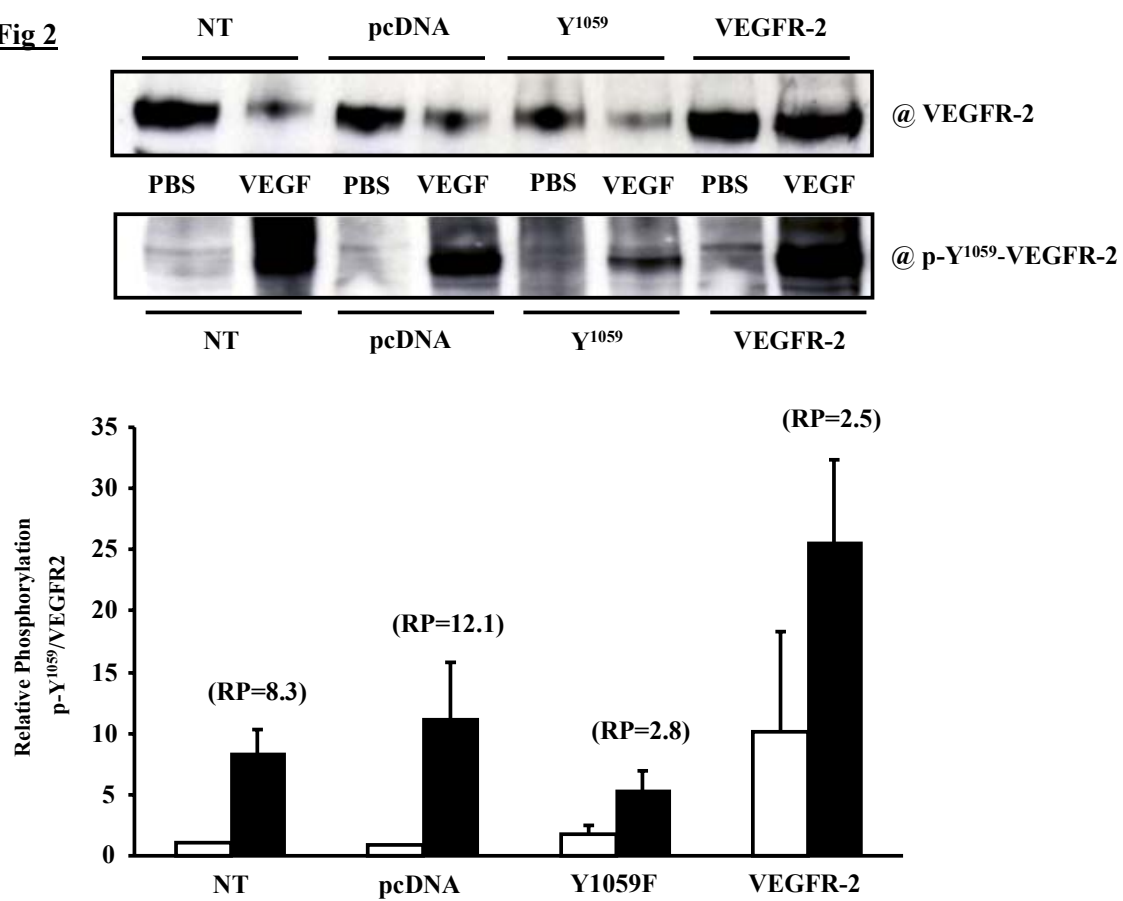
Cells were treated as described in Figure 1, cell lysates were immunoblotted against an anti-p-Y<sup>1214</sup>-VEGFR-2 antibody.

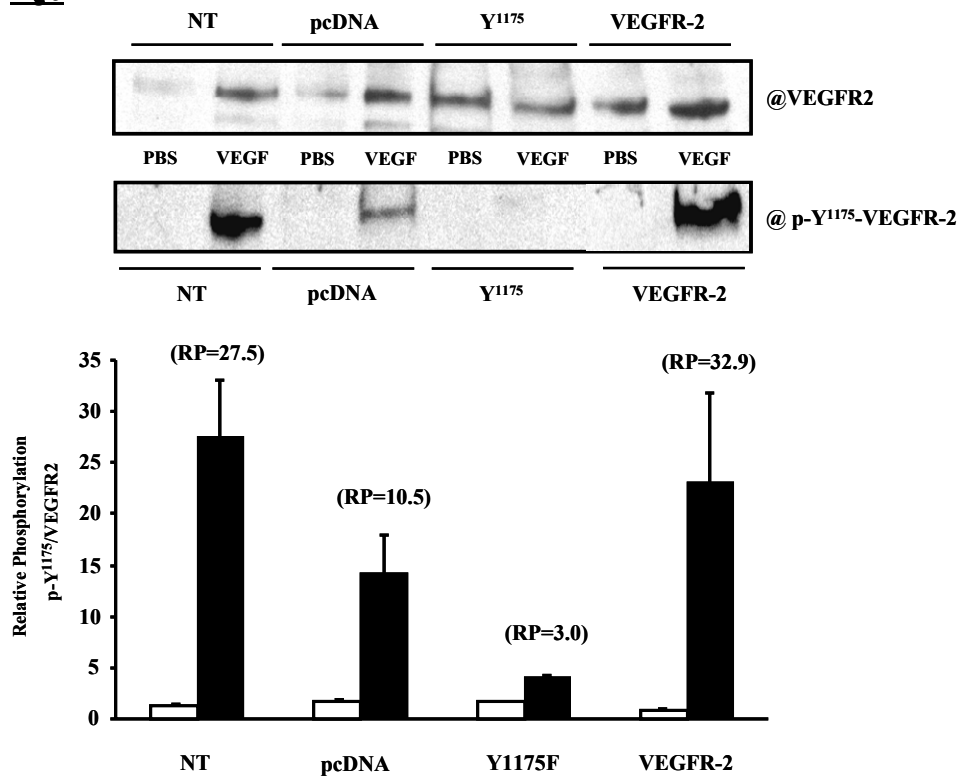
**Figure 5: Contribution of VEGFR-2 tyrosine residues on VEGF-mediated PAF**

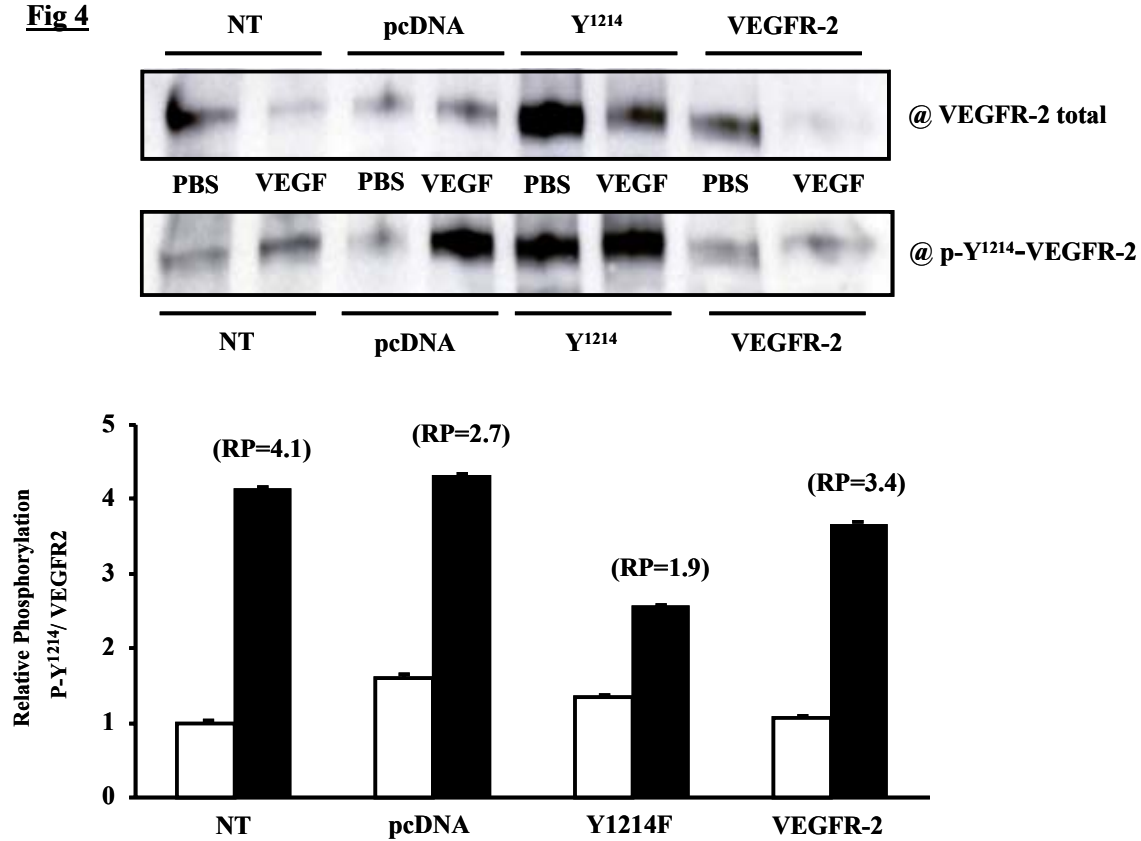
**synthesis.** Confluent native and transfected BAEC were stimulated with PBS (white column) or VEGF ( $10^{-9}$  M) (black column) for 15 minutes. Values are means  $\pm$  SEM of at least 6 experiments and represent the incorporation of tritiated acetate (<sup>3</sup>H-acetate) into lyso-PAF. FI: Fold of increase of PAF synthesis mediated by VEGF as compared to corresponding PBS-treated cells. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01 and \*\*\* p < 0.001 as compared to corresponding control-PBS treated cells.

## FIGURES

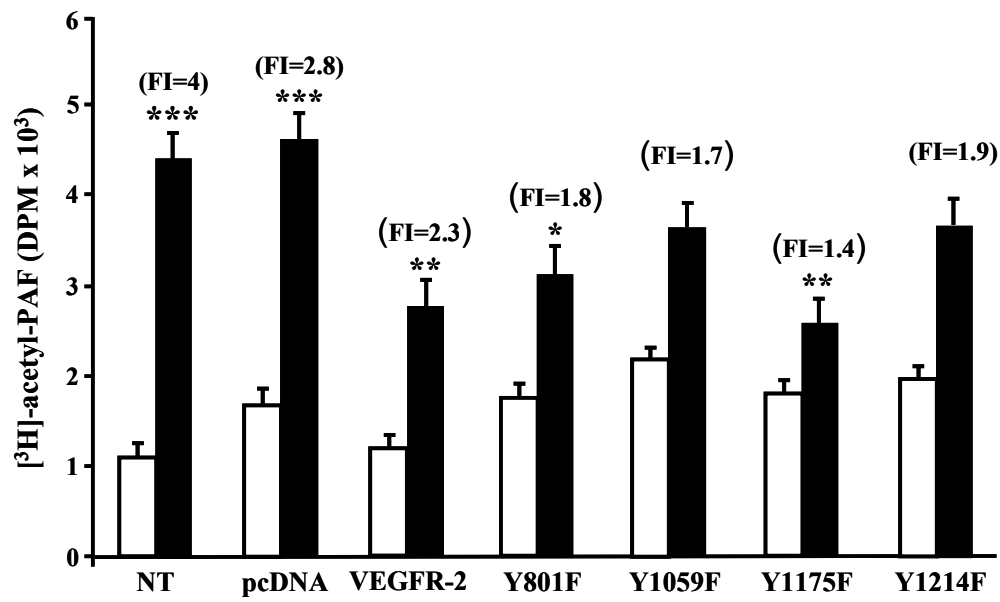
**Fig 1**

**Fig 2**

**Fig 3**

**Fig 4**



**Fig 5**

## **3.0 Discussion**

Le lien entre l'inflammation et l'angiogenèse pathologique a été démontré par plusieurs études [173, 238]. Avant la mise en évidence par notre laboratoire de l'effet pro-inflammatoire des angiopoïétines (Ang1 et Ang2), le VEGF était le seul facteur de croissance pro-angiogénique connu ayant la capacité d'induire une réponse pro-inflammatoire [31, 32]. Par conséquent, il est fort probable que l'inflammation induite par le VEGF soit essentielle à son potentiel angiogénique. Les docteurs Sirois et Edelman ont démontré que le VEGF induit sa réponse inflammatoire via la synthèse endothéliale du PAF [43]. Par la suite, notre laboratoire a démontré que la prolifération, la migration et la synthèse endothéliale du PAF induites par le VEGF chez les CE sont dépendantes de l'activation du VEGFR-2 [216]. Comme illustré antérieurement, le VEGFR-2 joue un rôle important dans la médiation des processus physiologiques et physiopathologiques induits par le VEGF [100, 239]. Ainsi, plusieurs résidus tyrosines (Y), dont la phosphorylation est essentielle au recrutement et à l'activation de protéines contenant des domaines d'homologie à Src 2 (SH2), sont impliqués dans la transmission de signaux intracellulaires. L'homodimérisation du VEGFR-2 provoquée par le VEGF entraîne une forte autophosphorylation du récepteur sur les résidus tyrosine. Jusqu'à maintenant, seulement huit de ces tyrosines ont été démontrées comme pouvant être phosphorylées en réponse au VEGF [117-119]. Cependant, les résidus tyrosine du VEGFR-2 impliqués dans la synthèse endothéliale du PAF étaient inconnus.

Afin d'identifier les résidus tyrosines impliqués dans la synthèse endothéliale du PAF, nous avons utilisé des versions mutantes du VEGFR-2 où les tyrosines 801, 1059, 1175 et 1214 ont été mutées en phénylalanine. Ces récepteurs mutants, le vecteur vide ainsi que le VEGFR-2 sauvage ont été transfectés dans des BAEC puis la synthèse du

PAF sous ces conditions a été mesurée. Nos résultats montrent que les résidus Tyr<sup>801</sup>, Tyr<sup>1059</sup>, Tyr<sup>1175</sup> et Tyr<sup>1214</sup> du VEGFR-2 sont tous impliqués dans la synthèse du PAF suite à la stimulation du VEGFR-2 par le VEGF. Ces résultats ont été confirmés par la mesure de l'expression et l'activation de ces mêmes résidus du VEGFR-2 impliqués dans les voies de signalisation menant à la synthèse endothéliale du PAF par immunobuvardage de type Western.

### **3.1 Le VEGF induit la synthèse du PAF par les BAEC**

Les premières études concernant les mécanismes de la synthèse du PAF ont démontré que le PAF pouvait être rapidement synthétisé suite à l'action de médiateurs inflammatoires [240]. Cette synthèse est médiée via la voie de remodelage des phospholipides qui consiste à convertir un phospholipide membranaire en lyso-PAF sous l'action d'une PLA<sub>2</sub> ou de la CoA-IT. Le lyso-PAF est converti ensuite en PAF par la lyso-PAF-AT. La CoA-IT a été initialement considérée comme étant un facteur essentiel pour la synthèse du PAF au niveau des macrophages [241]. Toutefois, il a été démontré que les CE n'expriment pas la CoA-IT, ce qui nous a amené à suggérer que le VEGF permet la synthèse du lyso-PAF suite à l'activation d'une PLA<sub>2</sub> [242]. Un prétraitement des CE a été effectué, dans notre laboratoire, à l'aide d'inhibiteurs des différents enzymes potentiellement impliqués dans la synthèse du PAF afin d'identifier celles requises par le VEGF pour médier cette synthèse. L'utilisation d'un inhibiteur de la CoA-IT et de la lyso-PAF-AT a complètement bloqué cette synthèse. Dans un deuxième temps, le prétraitement avec un inhibiteur spécifique de la CoA-IT n'a eu aucun impact sur la synthèse du PAF induite par le VEGF. Cela nous a amené à conclure indirectement que la

synthèse du PAF induite par le VEGF est initiée par une PLA<sub>2</sub>, et que le lyso-PAF ainsi synthétisé est converti en PAF par le lyso-PAF-AT.

Une stimulation des BAEC avec le VEGF dans un milieu dépourvu de calcium extracellulaire n'a pas induit d'augmentation significative de la synthèse basale du PAF, ce qui indique que cette réponse biologique est calcium-dépendante. Or, les sPLA<sub>2</sub> (phospholipase A<sub>2</sub> sécrétée) lient le calcium à des concentrations millimolaires permettant à cette dernière de positionner adéquatement le substrat et de stabiliser l'état de transition moléculaire pendant la réaction d'hydrolyse des phospholipides membranaires pour permettre la synthèse de l'acide arachidonique et de lyso-phospholipides [243]. Il est donc possible que la première étape vers la synthèse du PAF induite par le VEGF soit médiée par une sPLA<sub>2</sub> plutôt que par les autres PLA<sub>2</sub> qui sont calcium-indépendantes (iPLA<sub>2</sub>) ou dépendante du calcium en concentration micromolaire (cPLA<sub>2</sub>).

### **3.2 Régulation de la sPLA<sub>2</sub>-V et de la Lyso-PAF-AT par les p42/44, p38 MAPK et la PI3K**

Il est maintenant établi que les voies intracellulaires, notamment celles des p42/44 et p38 MAPK sont activées par le VEGF [107, 199]. Du moment que les études de l'équipe du Dr Sirois ont démontré que la synthèse du PAF induite par le VEGF est finement régulée, il est fort probable que les voies métaboliques intracellulaires activées par le VEGF soient responsables de la régulation de la synthèse endothéliale de PAF. Par

conséquent, notre laboratoire a prétraité des CE à l'aide d'inhibiteurs des différentes voies métaboliques afin de déterminer leurs rôles dans la synthèse du PAF induite par le VEGF.

La synthèse endothéliale du PAF suite à la stimulation au VEGF a été amplement bloquée lors du traitement des BAEC à l'aide d'un inhibiteur des récepteurs tyrosines-kinases (la Génistéine). Ceci démontre que l'effet du VEGF sur l'endothélium est médié à travers l'activation de récepteurs tyrosines-kinases comme le VEGFR-2 tel que démontré précédemment [216].

L'activation de récepteurs tyrosines-kinases est reconnue pour médier l'activation soit de la voie Ras-indépendante (PLC et PKC) ou de la voie Ras-dépendante. Notre laboratoire a donc étudié l'effet d'inhibition de ces deux voies de signalisation sur la synthèse de PAF induite par le VEGF. La synthèse endothéliale du PAF induite par le VEGF a été atténuée grandement suite au prétraitement des CE par des inhibiteurs (U73122 et GFX109203) de la voie Ras-indépendante. Ceci démontre que la synthèse du PAF par le VEGF est médiée via l'activation de la voie Ras-indépendante. Ces résultats concordent avec des études antérieures qui rapportent que le VEGF médie l'activation de la voie Ras-indépendante [107, 244]. De plus, d'autres études ont rapporté que la PKC participait directement à la régulation de la synthèse du PAF [245].

En revanche, des CE prétraitées avec un inhibiteur de l'enzyme Ras farnésyl transférase (BMS191563), responsable de la localisation de Ras à la membrane plasmique dans le but de permettre son activation, n'a eu qu'une inhibition non significative sur la synthèse du PAF induite par le VEGF [246]. Ce résultat suggère que

l'activation de la voie Ras-dépendante exerce un rôle minoritaire dans l'induction de la synthèse du PAF médiée par le VEGF.

Sachant que le VEGF active les voies p42/44 et p38 MAPK [107, 199], notre laboratoire a procédé au prétraitement des CE à l'aide d'inhibiteurs de ces deux voies métaboliques. L'inhibition de la MAPKK ou de la p38 MAPK à l'aide du PD98058 et du SB203580 respectivement, a complètement prévenu l'effet du VEGF sur la synthèse du PAF, ce qui propose que l'activation des voies p42/44 et p38 MAPK est essentielle à la synthèse du PAF induite par le VEGF. Puisque les travaux de notre laboratoire démontrent que cette synthèse est médiée via la sPLA<sub>2</sub>-V et la lyso-PAF-AT, il est par conséquent possible que l'activation de ces MAPK régule positivement l'activité de ces deux enzymes.

Il a été démontré que la p38 MAPK activée peut phosphoryler et activer directement la lyso-PAF-AT [247]. De plus, ces chercheurs rapportent qu'ils ont bloqué l'activation de la lyso-PAF-AT à l'aide du même inhibiteur de la p38 MAPK que notre laboratoire a utilisé, le SB203580. Par contre, ils montrèrent que les p42/44 MAPK sont incapable de médier une telle activité et que l'inhibiteur de cette voie de signalisation, le PD98059, n'a aucun effet sur la lyso-PAF-AT. La compilation de ces données avec celles de notre laboratoire suggèrent que l'activation de la p38 MAPK par le VEGF médie la phosphorylation et l'activation de la lyso-PAF-AT qui à son tour convertit le lyso-PAF en PAF.

Un aspect majeur des données démontrant le rôle des p42/44 et p38 MAPK lors de la synthèse du PAF induite par le VEGF vient du fait qu'elles sont les premières à suggérer un mécanisme de régulation de l'activité de la sPLA<sub>2</sub>-V, si l'on considère que

l'effet inflammatoire du VEGF est traduit via la synthèse du PAF. Il est connu depuis longtemps que l'activité des sPLA<sub>2</sub> est maximale une fois qu'elles sont secrétées dans le milieu extracellulaire [248]. Des données de notre laboratoire démontrent qu'il est possible de co-immunoprécipiter la p38 MAPK conjointement avec la sPLA<sub>2</sub>-V au niveau des BAEC et ce, de façon temps-dépendant suite à une stimulation au VEGF. Ces données proposent que le VEGF induit la formation d'un complexe stable entre la p38 MAPK et la sPLA<sub>2</sub>-V et que la p38 MAPK participe à l'induction de la synthèse de PAF par le VEGF pas uniquement en activant la lyso-PAF-AT mais également en interagissant avec la sPLA<sub>2</sub>-V.

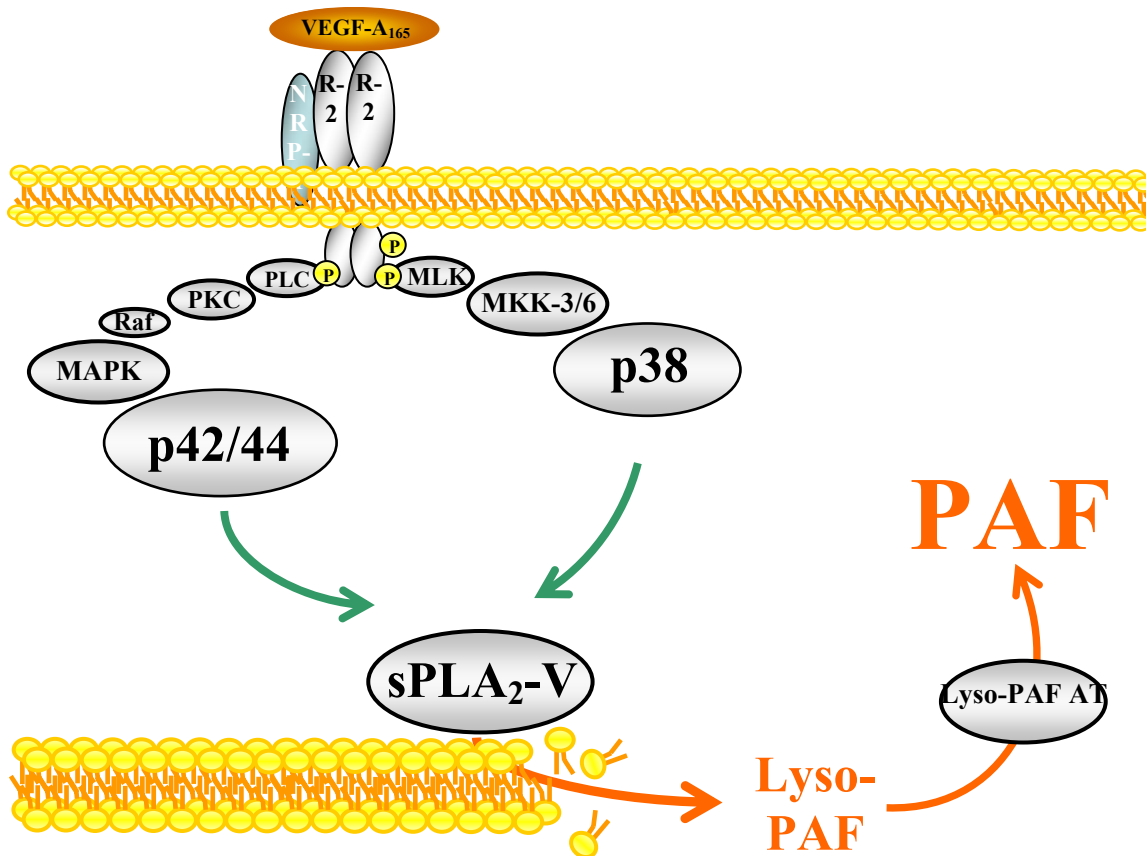
Des études réalisées dans notre laboratoire confirment davantage que les p42/44 et p38 MAPK sont impliquées dans la synthèse du PAF induite par le VEGF. Ainsi, la génération de BAEC dont les p42/44 et p38 MAPK ont été inactivées (à l'aide de transfection de plasmides codant pour des formes dominantes-négatives de ces kinases) a diminué de façon significative la capacité de ces cellules à induire la synthèse du PAF suite à une stimulation au VEGF.

Étant donnée que le VEGF médie également une activation rapide de la PI3K [249] et que cette dernière participe aux activités biologiques du VEGF, notre laboratoire a investigué le rôle de cette voie intracellulaire lors de la synthèse du PAF induite par le VEGF grâce à des inhibiteurs de la PI3K. Pour ceci, un prétraitement des CE par deux inhibiteurs de la PI3K n'ayant aucune ressemblance structurale (Wotmaninne et LY294002) a permis dans les deux cas d'augmenter la synthèse du PAF induite par le VEGF. Ces résultats démontrent que la PI3K régule négativement cette synthèse et par conséquent constitue un régulateur négatif endogène de la synthèse du PAF. Les résultats



de notre laboratoire démontrent aussi que la voie de la PI3K n'est pas activée par les voies des p42/44 et p38 MAPK puisque l'inhibition de la PLC, de la PKC, de la MAPKK ou de la p38 MAPK n'a pas affecté l'activation de la voie de la PI3K, représentée par la phosphorylation d'AKT. Donc, l'activation de la voie de la PI3K est indépendante des voies des p42/44 et p38 MAPK, et inversement.

L'ensemble des résultats de notre laboratoire suggère que le VEGF médie la synthèse du PAF suite à l'activation du VEGFR-2. À cette étape, la co-liaison du VEGF à la NRP-1 permet aussi bien la potentialisation de la synthèse du PAF via le VEGFR-2 que la migration cellulaire. Par la suite, il y a activation de trois voies intracellulaires suite à la stimulation du VEGFR-2. La première est la voie Ras-indépendante qui représente la PLC- $\gamma$  et la PKC. Cette dernière active Raf-1 qui à son tour active en cascade la MAPKK et les p42/44 MAPK. Le VEGFR-2 active également la voie des MLK (*Mixed Lineage Kinase*), des MKK-3/6 (*MAP Kinase Kinase*) qui à son tour active la p38 MAPK. Ces p42/44 et p38 MAPK régulent de façon directe l'activité de la sPLA<sub>2</sub>-V et de la lyso-PAF-AT, les enzymes activées par le VEGF responsables de la conversion des phospholipides membranaires en PAF. Enfin, le VEGFR-2 active la voie de la PI3K qui semble réguler de façon négative l'effet du VEGF sur la synthèse du PAF.



**Figure 5 : Mécanismes intracellulaires régissant la synthèse endothéliale du PAF induite par le VEGF.** Le VEGFR-2 active deux voies intracellulaires. La première est la voie Ras-indépendante (PLC- $\gamma$  et PKC). Elle active en cascade Raf, la MAPKK et les p42/44 MAPK. La deuxième voie est celle des MLK et des MKK-3/6 qui à leur tour activent la p38 MAPK. Ces p42/44 et p38 MAPK régulent l'activité de la sPLA<sub>2</sub>-V et de la lyso-PAF-AT, les enzymes activées par le VEGF et responsables de la conversion des phospholipides membranaires en PAF. (Am. J. Physiol. 272, H2746-56, 1997 / J. Biol. Chem. 274, 31047-56, 1999/ Br. J. Pharmacol. 134, 197-205, 2001/ Br. J. Pharmacol. 134, 1253-62, 2001/ J. Cell. Biochem. 85, 629-39, 2002/ Br. J. Pharmacol. 137, 1021-30, 2002)

### 3.3 Choix des mutants du VEGFR-2

Le VEGFR-2 dispose d'au moins 11 résidus tyrosines potentiellement phosphorylables [117]. La principale tâche de cette étude était donc de choisir les résidus tyrosines, en se basant sur la littérature, qui avaient le potentiel d'être impliqués dans la synthèse endothéliale du PAF par le VEGFR-2 sous l'action du VEGF. Ainsi les Tyr<sup>801</sup>, Tyr<sup>1059</sup>, Tyr<sup>1175</sup> et Tyr<sup>1214</sup> ont retenu notre attention comme des sites potentiellement importants d'autophosphorylation [117, 118, 120, 121]. Par mutagenèse dirigée, ces résidus ont été mutés en phénylalanine (F), un acide aminé de structure similaire à la tyrosine mais n'ayant pas la capacité d'être phosphorylé. Ceci préserve la structure tridimensionnelle du récepteur tout en le rendant non phosphorylable au site muté. Ainsi, la signalisation du récepteur mutant sera semblable à celle du récepteur sauvage sauf pour l'incapacité du mutant à induire les voies de signalisations partant de la tyrosine mutée. Par la suite, ces récepteurs mutants furent utilisés dans le but de déterminer les tyrosines du VEGFR-2 dont la phosphorylation est essentielle à la synthèse endothéliale du PAF suite à la stimulation au VEGF

La phosphorylation des résidus Tyr<sup>801</sup> et Tyr<sup>1175</sup> a été montré comme essentielle à l'activation des enzymes PLC- $\gamma$  et PI3K [118, 120, 121, 127]. En effet, la Tyr<sup>1175</sup> est entourée d'une séquence consensus pour la liaison de la PLC- $\gamma$ , ensuite sa phosphorylation a été montrée comme étant nécessaire au recrutement et à l'activation de cette enzyme par le VEGFR-2. D'autres études démontrent le lien entre la phosphorylation de ce résidu et l'activation de la voie de la PI3K [121] ainsi qu'au recrutement de la protéine adaptatrice Shb, cette dernière est connue pour son interaction

avec les enzymes PLC- $\gamma$  et/ou PI3K [131, 250]. Tel qu'évoqué précédemment, en utilisant des études de double hybride en levure, de co-transfection ou suite à l'utilisation d'un phospho-peptide Tyr<sup>1175</sup> synthétique en combinaison avec une protéine recombinante contenant les domaines SH2 de la PLC- $\gamma$ , il a été démontré que la Tyr<sup>1175</sup> joue un rôle important dans l'interaction VEGFR-2/PLC- $\gamma$  [118, 120, 126]. Il est à noter que la forme non phosphorylable du VEGFR-2 pour ce résidu montre une diminution de la phosphorylation de la PLC- $\gamma$ , de la p42/44 MAPK ainsi qu'une baisse de la synthèse d'ADN induite par le VEGF [118, 127]. Le VEGF médie la synthèse du PAF suite à l'activation du VEGFR-2, et cette activation fait intervenir la voie Ras-indépendante qui représente la PLC- $\gamma$  et la PKC. Notre étude a consisté en la mutation de la Tyr<sup>1175</sup> (Y1175F) et a montré une diminution de 68% de la synthèse endothéliale du PAF suite à une stimulation au VEGF (1 nM) en comparaison au pcDNA témoin. Ce résultat a été confirmé par la mesure de l'expression et l'activation de cette tyrosine du VEGFR-2 impliquée dans la synthèse du PAF par immunobuvardages de type Western et qui montre une diminution de 79% de la phosphorylation du récepteur VEGFR-2 muté par rapport au pcDNA témoin. Avec ces résultats, on peut conclure que la Tyr<sup>1175</sup> constitue bel et bien un site essentiel de phosphorylation du récepteur VEGFR-2 impliqué dans la synthèse du PAF.

Quand à la Tyr<sup>801</sup>, ce résidu se trouve aussi dans une séquence de liaison pour la PLC- $\gamma$ . De plus, sa mutation affecte le recrutement et l'activation de la PI3K par le VEGFR-2 (voir section 1.2.7.1). Toutefois, étant donné que l'autophosphorylation des Tyr<sup>1175</sup> et Tyr<sup>1214</sup> suite à la stimulation du VEGFR-2 avec le VEGF a été observé par des méthodes directes (cartographie triptyque/anticorps phospho-spécifiques) et indirectes

(identification d'une réponse cellulaire dépendante de leur phosphorylation), l'implication de la Tyr<sup>801</sup> dans ce contexte ne fut pas aussi évidente. Ainsi, malgré sa phosphorylation qui a été proposée comme importante pour l'activation des voies PLC- $\gamma$  et PI3K par le VEGFR-2, l'analyse de cartographie triptyque effectuée sur le VEGFR-2 n'a pu identifier de phosphorylation au niveau de ce résidu suite à une stimulation du récepteur avec le VEGF [117, 118]. Ceci est peut être dû à la position juxtamembranaire de la Tyr<sup>801</sup>, ce qui a rendu la cartographie triptyque difficile. Pour palier à ce fait, un anticorps reconnaissant uniquement la forme phosphorylée du VEGFR-2 à la Tyr<sup>801</sup> a été généré (J.P.Gratton, IRCM). Ceci a permis de montrer que ce résidu est un site important d'autophosphorylation du VEGFR-2 suite à une stimulation au VEGF, et par conséquent, peut participer à la signalisation intracellulaire assurée par ce récepteur. La mutation de ce résidu (Y801F) montre également une réduction de 54% de la synthèse endothéliale du PAF induite par le VEGF par rapport au pcDNA témoin. Ce résultat a été confirmé par la mesures de la phosphorylation du VEGFR-2 muté et impliqué dans la synthèse du PAF par immunobuvardage de type Western et qui montre une diminution de 80% de cette phosphorylation par rapport au pcDNA témoin. De là, on peut conclure que la Tyr<sup>801</sup> constitue bel et bien un site essentiel de phosphorylation du récepteur VEGFR-2 impliqué dans la synthèse du PAF.

La Tyr<sup>1059</sup> qui est située au niveau du domaine kinase du VEGFR-2 [122, 123] est impliquée dans l'activité tyrosine kinase du récepteur. Ceci est confirmé par la perte de cette activité suite à la mutation de la tyrosine en phénylalanine [122-124]. Ce résidu est clairement reconnu comme étant nécessaire à l'activité catalytique maximale du récepteur [122, 123]. En procédant à la mutation de ce site (Y1059F), notre étude montre une

réduction de 73% de la synthèse endothéliale du PAF et de 87% de la capacité de phosphorylation du récepteur induite par le VEGF par rapport au pcDNA témoin. Ceci montre clairement que la Tyr<sup>1059</sup> est l'un des sites essentiels de phosphorylation du récepteur VEGFR-2 impliqué dans la synthèse du PAF.

Finalement, la Tyr<sup>1214</sup> a été caractérisée comme responsable de l'activation de la Cdc42, qui active par la suite la SAPK2/3 /p38 MAPK, ces deux protéines sont indispensables au remodelage de l'actine dans les fibres de stress. L'activation de la MAPKAPK-2 et Hsp27 vient suite à l'activation de ces cascades enzymatiques, déclenchant un remodelage de l'actine et ainsi la mobilité cellulaire [133]. Cette activité signalétique permet la polymérisation de l'actine et le rassemblement d'adhésions focales, convergeant vers la formation de fibres de stress et la contraction des CE qui est indispensable pour induire la migration et la prolifération cellulaire. Il est à noter que la phosphorylation de la Tyr<sup>1214</sup> du VEGFR-2 favorise l'autophosphorylation du récepteur [134] et la régulation de la migration des CE induite par le VEGF [133]. En effet, il a été observé que l'utilisation d'une forme mutante du VEGFR-2 au niveau du résidu Tyr<sup>1214</sup> (Y1214F) entraîne une diminution importante de la phosphorylation totale du récepteur suite à une stimulation au VEGF. Ceci est produit en parallèle avec une diminution de l'activation de certaines protéines de signalisation telles que PLC- $\gamma$ , MAPK et Src [134]. Par contre, ces observations n'ont pu être confirmées, la plupart des études qui ont utilisé cette forme mutante du VEGFR-2 n'observent pas une telle diminution de l'activité catalytique du récepteur ni dans l'activation des enzymes PLC- $\gamma$ , ERK ou de la synthèse d'ADN [118, 133]. Notre étude vient confirmer la réduction importante de la phosphorylation du VEGFR-2 suite à la mutation effectuée au niveau du résidu Tyr<sup>1214</sup>

(Y1214F) par immunobuvardage de type Western qui est de 55%. De plus, cette mutation a entraîné une réduction de 57% de la synthèse endothéliale du PAF induite par le VEGF par rapport au pcDNA témoin. Par conséquent, la Tyr<sup>1214</sup> se montre comme un site essentiel de phosphorylation du récepteur VEGFR-2 implique dans la synthèse du PAF.

#### 4.0 Conclusion et perspectives futures

Les observations faites au cours de cette étude montrent clairement que les résidus Tyr<sup>801</sup>, Tyr<sup>1059</sup>, Tyr<sup>1175</sup> et Tyr<sup>1214</sup> sont bel et bien impliqués dans la synthèse endothéliale du PAF par le VEGFR-2 suite à une stimulation au VEGF. À l'aide de technique de mutagenèse dirigée, nous avons effectué des transfections transitoires de cellules endothéliales avec des plasmides codant pour le récepteur VEGFR-2 dont les tyrosines ciblées ont été remplacées de façon séquentielle par une phénylalanine. Un vecteur vide pcDNA a été utilisé comme contrôle négatif. De plus, la mesure de l'expression et l'activation des tyrosines du VEGFR-2 impliquées dans les voies de signalisation menant à la synthèse du PAF ont été confirmées par des immunobuvardages de type Western. Nos résultats suggèrent que les tyrosines ciblées du récepteur VEGFR-2 constituent des sites essentiels de phosphorylation du récepteur VEGFR-2 impliqués dans la synthèse du PAF induite par le VEGF.

La présente étude ajoute un élément nouveau dans la voie de signalisation menant à la synthèse endothéliale du PAF suite à la stimulation du VEGFR-2 par le VEGF. Notre laboratoire a également découvert que la synthèse aiguë de prostacycline (PGI<sub>2</sub>) induite par le VEGF-A<sub>165</sub> requiert l'activation des récepteurs hétérodimériques VEGFR-1 et VEGFR-2 (VEGFR-1/VEGFR-2). Ainsi, l'activation sélective des récepteurs du VEGF peut agir comme balance dans la synthèse de facteurs pro-(PAF) et anti-(PGI<sub>2</sub>) inflammatoire. Cette approche pourrait conduire au développement de molécule capable de réguler la formation de néovaisseaux lors de processus angiogéniques.



## **5.0 RÉFÉRENCES**

1. Wolinsky, H., *A proposal linking clearance of circulating lipoproteins to tissue metabolic activity as a basis for understanding atherogenesis*. *Circ Res*, 1980. **47**(3): p. 301-11.
2. Aird, W.C., *Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms*. *Circ Res*, 2007. **100**(2): p. 158-73.
3. Pober, J.S. and W.C. Sessa, *Evolving functions of endothelial cells in inflammation*. *Nat Rev Immunol*, 2007. **7**(10): p. 803-15.
4. Cines, D.B., E.S. Pollak, C.A. Buck, J. Loscalzo, G.A. Zimmerman, R.P. McEver, J.S. Pober, T.M. Wick, B.A. Konkle, B.S. Schwartz, E.S. Barnathan, K.R. McCrae, B.A. Hug, A.M. Schmidt, and D.M. Stern, *Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders*. *Blood*, 1998. **91**(10): p. 3527-61.
5. Cersosimo, E. and R.A. DeFronzo, *Insulin resistance and endothelial dysfunction: the road map to cardiovascular diseases*. *Diabetes Metab Res Rev*, 2006. **22**(6): p. 423-36.
6. van Haaren, P.M., E. VanBavel, H. Vink, and J.A. Spaan, *Localization of the permeability barrier to solutes in isolated arteries by confocal microscopy*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2003. **285**(6): p. H2848-56.
7. van Hinsbergh, V.W., *The endothelium: vascular control of haemostasis*. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2001. **95**(2): p. 198-201.
8. Shimokawa, H., H. Yasutake, K. Fujii, M.K. Owada, R. Nakaike, Y. Fukumoto, T. Takayanagi, T. Nagao, K. Egashira, M. Fujishima, and A. Takeshita, *The importance of the hyperpolarizing mechanism increases as the vessel size decreases in endothelium-dependent relaxations in rat mesenteric circulation*. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1996. **28**(5): p. 703-11.
9. Yanagisawa, M., H. Kurihara, S. Kimura, Y. Tomobe, M. Kobayashi, Y. Mitsui, Y. Yazaki, K. Goto, and T. Masaki, *A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells*. *Nature*, 1988. **332**(6163): p. 411-5.
10. Huggins, J.P., J.T. Pelton, and R.C. Miller, *The structure and specificity of endothelin receptors: their importance in physiology and medicine*. *Pharmacol Ther*, 1993. **59**(1): p. 55-123.
11. Risau, W. and I. Flamme, *Vasculogenesis*. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 1995. **11**: p. 73-91.
12. Ng, S.S. and W.D. Figg, *Upregulation of endogenous angiogenesis inhibitors: a mechanism of action of metronomic chemotherapy*. *Cancer Biol Ther*, 2004. **3**(12): p. 1212-3.
13. Millauer, B., L.K. Shawver, K.H. Plate, W. Risau, and A. Ullrich, *Glioblastoma growth inhibited in vivo by a dominant-negative Flk-1 mutant*. *Nature*, 1994. **367**(6463): p. 576-9.
14. Folkman, J., *Tumor angiogenesis: therapeutic implications*. *N Engl J Med*, 1971. **285**(21): p. 1182-6.
15. Bikfalvi, A., S. Klein, G. Pintucci, and D.B. Rifkin, *Biological roles of fibroblast growth factor-2*. *Endocr Rev*, 1997. **18**(1): p. 26-45.
16. Michaelson, I.C., *The mode of development of the vascular system of the retina with some observations on its significance for certain retinal disorders*. *Trans. Ophthalmol*, 1948. **68**: p. 137-180.

17. Risau, W., *Mechanisms of angiogenesis*. Nature, 1997. **386**(6626): p. 671-4.
18. Reynolds, L.P. and D.A. Redmer, *Angiogenesis in the placenta*. Biol Reprod, 2001. **64**(4): p. 1033-40.
19. Bonnet, C.S. and D.A. Walsh, *Osteoarthritis, angiogenesis and inflammation*. Rheumatology (Oxford), 2005. **44**(1): p. 7-16.
20. Kojda, G. and R. Hambrecht, *Molecular mechanisms of vascular adaptations to exercise. Physical activity as an effective antioxidant therapy?* Cardiovasc Res, 2005. **67**(2): p. 187-97.
21. Ferrara, N., *VEGF as a therapeutic target in cancer*. Oncology, 2005. **69 Suppl 3**: p. 11-6.
22. Movat, H.Z. and S. Wasi, *Severe microvascular injury induced by lysosomal releasates of human polymorphonuclear leukocytes. Increase in vasopermeability, hemorrhage, and microthrombosis due to degradation of subendothelial and perivascular matrices*. Am J Pathol, 1985. **121**(3): p. 404-17.
23. Maynard, M.A., A.J. Evans, W. Shi, W.Y. Kim, F.F. Liu, and M. Ohh, *Dominant-negative HIF-3 alpha 4 suppresses VHL-null renal cell carcinoma progression*. Cell Cycle, 2007. **6**(22): p. 2810-6.
24. Carmeliet, P., *Angiogenesis in life, disease and medicine*. Nature, 2005. **438**(7070): p. 932-6.
25. Folkman, J., *Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease*. Nat Med, 1995. **1**(1): p. 27-31.
26. Bicknell, R. and A.L. Harris, *Novel angiogenic signaling pathways and vascular targets*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2004. **44**: p. 219-38.
27. Hanahan, D. and J. Folkman, *Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis*. Cell, 1996. **86**(3): p. 353-64.
28. Folkman, J., E. Merler, C. Abernathy, and G. Williams, *Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis*. J Exp Med, 1971. **133**(2): p. 275-88.
29. Senger, D.R., S.J. Galli, A.M. Dvorak, C.A. Perruzzi, V.S. Harvey, and H.F. Dvorak, *Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid*. Science, 1983. **219**(4587): p. 983-5.
30. Ferrara, N. and W.J. Henzel, *Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells*. Biochem Biophys Res Commun, 1989. **161**(2): p. 851-8.
31. Connolly, D.T., D.M. Heuvelman, R. Nelson, J.V. Olander, B.L. Eppley, J.J. Delfino, N.R. Siegel, R.M. Leimgruber, and J. Feder, *Tumor vascular permeability factor stimulates endothelial cell growth and angiogenesis*. J Clin Invest, 1989. **84**(5): p. 1470-8.
32. Unemori, E.N., N. Ferrara, E.A. Bauer, and E.P. Amento, *Vascular endothelial growth factor induces interstitial collagenase expression in human endothelial cells*. J Cell Physiol, 1992. **153**(3): p. 557-62.
33. 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, *Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene*. Nature, 1996. **380**(6573): p. 439-42.
34. Carmeliet, P., V. Ferreira, G. Breier, S. Pollefeyt, L. Kieckens, M. Gertsenstein, M. Fahrig, A. Vandenhoeck, K. Harpal, C. Eberhardt, C. Declercq, J. Pawling, L. Moons, D. Collen, W. Risau, and A. Nagy, *Abnormal blood vessel development*

- and lethality in embryos lacking a single VEGF allele.* Nature, 1996. **380**(6573): p. 435-9.
35. Miquerol, L., B.L. Langille, and A. Nagy, *Embryonic development is disrupted by modest increases in vascular endothelial growth factor gene expression.* Development, 2000. **127**(18): p. 3941-6.
  36. Jussila, L. and K. Alitalo, *Vascular growth factors and lymphangiogenesis.* Physiol Rev, 2002. **82**(3): p. 673-700.
  37. Maglione, D., V. Guerriero, G. Viglietto, P. Delli-Bovi, and M.G. Persico, *Isolation of a human placenta cDNA coding for a protein related to the vascular permeability factor.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(20): p. 9267-71.
  38. Olofsson, B., K. Pajusola, A. Kaipainen, G. von Euler, V. Joukov, O. Saksela, A. Orpana, R.F. Pettersson, K. Alitalo, and U. Eriksson, *Vascular endothelial growth factor B, a novel growth factor for endothelial cells.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(6): p. 2576-81.
  39. Chilov, D., E. Kukk, S. Taira, M. Jeltsch, J. Kaukonen, A. Palotie, V. Joukov, and K. Alitalo, *Genomic organization of human and mouse genes for vascular endothelial growth factor C.* J Biol Chem, 1997. **272**(40): p. 25176-83.
  40. Olofsson, B., M. Jeltsch, U. Eriksson, and K. Alitalo, *Current biology of VEGF-B and VEGF-C.* Curr Opin Biotechnol, 1999. **10**(6): p. 528-35.
  41. Lyttle, D.J., K.M. Fraser, S.B. Fleming, A.A. Mercer, and A.J. Robinson, *Homologs of vascular endothelial growth factor are encoded by the poxvirus orf virus.* J Virol, 1994. **68**(1): p. 84-92.
  42. Camussi, G., G. Montrucchio, E. Lupia, A. De Martino, L. Perona, M. Arese, A. Vercellone, A. Toniolo, and F. Bussolino, *Platelet-activating factor directly stimulates in vitro migration of endothelial cells and promotes in vivo angiogenesis by a heparin-dependent mechanism.* J Immunol, 1995. **154**(12): p. 6492-501.
  43. Sirois, M.G. and E.R. Edelman, *VEGF effect on vascular permeability is mediated by synthesis of platelet-activating factor.* Am J Physiol, 1997. **272**(6 Pt 2): p. H2746-56.
  44. Fukumura, D., T. Gohongi, A. Kadambi, Y. Izumi, J. Ang, C.O. Yun, D.G. Buerk, P.L. Huang, and R.K. Jain, *Predominant role of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis and vascular permeability.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(5): p. 2604-9.
  45. Gratton, J.P., M.I. Lin, J. Yu, E.D. Weiss, Z.L. Jiang, T.A. Fairchild, Y. Iwakiri, R. Groszmann, K.P. Claffey, Y.C. Cheng, and W.C. Sessa, *Selective inhibition of tumor microvascular permeability by cavtratin blocks tumor progression in mice.* Cancer Cell, 2003. **4**(1): p. 31-9.
  46. Furchgott, R.F. and J.V. Zawadzki, *The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine.* Nature, 1980. **288**(5789): p. 373-6.
  47. Keck, P.J., S.D. Hauser, G. Krivi, K. Sanzo, T. Warren, J. Feder, and D.T. Connolly, *Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF.* Science, 1989. **246**(4935): p. 1309-12.

48. Leung, D.W., G. Cachianes, W.J. Kuang, D.V. Goeddel, and N. Ferrara, *Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen*. *Science*, 1989. **246**(4935): p. 1306-9.
49. Vincenti, V., C. Cassano, M. Rocchi, and G. Persico, *Assignment of the vascular endothelial growth factor gene to human chromosome 6p21.3*. *Circulation*, 1996. **93**(8): p. 1493-5.
50. Lange, T., N. Guttman-Raviv, L. Baruch, M. Machluf, and G. Neufeld, *VEGF162, a new heparin-binding vascular endothelial growth factor splice form that is expressed in transformed human cells*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(19): p. 17164-9.
51. Ferrara, N., H.P. Gerber, and J. LeCouter, *The biology of VEGF and its receptors*. *Nat Med*, 2003. **9**(6): p. 669-76.
52. Bates, D.O., T.G. Cui, J.M. Doughty, M. Winkler, M. Sugiono, J.D. Shields, D. Peat, D. Gillatt, and S.J. Harper, *VEGF165b, an inhibitory splice variant of vascular endothelial growth factor, is down-regulated in renal cell carcinoma*. *Cancer Res*, 2002. **62**(14): p. 4123-31.
53. Woolard, J., W.Y. Wang, H.S. Bevan, Y. Qiu, L. Morbidelli, R.O. Pritchard-Jones, T.G. Cui, M. Sugiono, E. Waive, R. Perrin, R. Foster, J. Digby-Bell, J.D. Shields, C.E. Whittles, R.E. Mushens, D.A. Gillatt, M. Ziche, S.J. Harper, and D.O. Bates, *VEGF165b, an inhibitory vascular endothelial growth factor splice variant: mechanism of action, in vivo effect on angiogenesis and endogenous protein expression*. *Cancer Res*, 2004. **64**(21): p. 7822-35.
54. Park, J.E., G.A. Keller, and N. Ferrara, *The vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms: differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of extracellular matrix-bound VEGF*. *Mol Biol Cell*, 1993. **4**(12): p. 1317-26.
55. Ferrara, N. and S. Bunting, *Vascular endothelial growth factor, a specific regulator of angiogenesis*. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 1996. **5**(1): p. 35-44.
56. 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, *VEGF is required for growth and survival in neonatal mice*. *Development*, 1999. **126**(6): p. 1149-59.
57. Bergers, G., R. Brekken, G. McMahon, T.H. Vu, T. Itoh, K. Tamaki, K. Tanzawa, P. Thorpe, S. Itohara, Z. Werb, and D. Hanahan, *Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis*. *Nat Cell Biol*, 2000. **2**(10): p. 737-44.
58. Inoue, M., J.H. Hager, N. Ferrara, H.P. Gerber, and D. Hanahan, *VEGF-A has a critical, nonredundant role in angiogenic switching and pancreatic beta cell carcinogenesis*. *Cancer Cell*, 2002. **1**(2): p. 193-202.
59. Tomisawa, M., T. Tokunaga, Y. Oshika, T. Tsuchida, Y. Fukushima, H. Sato, H. Kijima, H. Yamazaki, Y. Ueyama, N. Tamaoki, and M. Nakamura, *Expression pattern of vascular endothelial growth factor isoform is closely correlated with tumour stage and vascularisation in renal cell carcinoma*. *Eur J Cancer*, 1999. **35**(1): p. 133-7.
60. McDonald, N.Q. and W.A. Hendrickson, *A structural superfamily of growth factors containing a cystine knot motif*. *Cell*, 1993. **73**(3): p. 421-4.

61. Shalaby, F., J. Rossant, T.P. Yamaguchi, M. Gertsenstein, X.F. Wu, M.L. Breitman, and A.C. Schuh, *Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice*. Nature, 1995. **376**(6535): p. 62-6.
62. Freeman, M.R., F.X. Schneck, M.L. Gagnon, C. Corless, S. Soker, K. Niknejad, G.E. Peoples, and M. Klagsbrun, *Peripheral blood T lymphocytes and lymphocytes infiltrating human cancers express vascular endothelial growth factor: a potential role for T cells in angiogenesis*. Cancer Res, 1995. **55**(18): p. 4140-5.
63. BIKFALVI, A., *Tumor angiogenesis*. Bull Cancer, 2006: p. 154-64.
64. Bikfalvi, A. and R. Bicknell, *Recent advances in angiogenesis, anti-angiogenesis and vascular targeting*. Trends Pharmacol Sci, 2002. **23**(12): p. 576-82.
65. Carmeliet, P., Y.S. Ng, D. Nuyens, G. Theilmeier, K. Brusselmans, I. Cornelissen, E. Ehler, V.V. Kakkar, I. Stalmans, V. Mattot, J.C. Perriard, M. Dewerchin, W. Flameng, A. Nagy, F. Lupu, L. Moons, D. Collen, P.A. D'Amore, and D.T. Shima, *Impaired myocardial angiogenesis and ischemic cardiomyopathy in mice lacking the vascular endothelial growth factor isoforms VEGF164 and VEGF188*. Nat Med, 1999. **5**(5): p. 495-502.
66. Makinen, T., L. Jussila, T. Veikkola, T. Karpanen, M.I. Kettunen, K.J. Pulkkanen, R. Kauppinen, D.G. Jackson, H. Kubo, S. Nishikawa, S. Yla-Herttuala, and K. Alitalo, *Inhibition of lymphangiogenesis with resulting lymphedema in transgenic mice expressing soluble VEGF receptor-3*. Nat Med, 2001. **7**(2): p. 199-205.
67. Jeltsch, M., A. Kaipainen, V. Joukov, X. Meng, M. Lakso, H. Rauvala, M. Swartz, D. Fukumura, R.K. Jain, and K. Alitalo, *Hyperplasia of lymphatic vessels in VEGF-C transgenic mice*. Science, 1997. **276**(5317): p. 1423-5.
68. Carmeliet, P., L. Moons, A. Lutun, 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, *Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions*. Nat Med, 2001. **7**(5): p. 575-83.
69. Shibuya, M., *Structure and function of VEGF/VEGF-receptor system involved in angiogenesis*. Cell Struct Funct, 2001. **26**(1): p. 25-35.
70. Cross, M.J. and L. Claesson-Welsh, *FGF and VEGF function in angiogenesis: signalling pathways, biological responses and therapeutic inhibition*. Trends Pharmacol Sci, 2001. **22**(4): p. 201-7.
71. Shibuya, M. and L. Claesson-Welsh, *Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis*. Exp Cell Res, 2006. **312**(5): p. 549-60.
72. Folkman, J. and M. Klagsbrun, *Angiogenic factors*. Science, 1987. **235**(4787): p. 442-7.
73. Ferrara, N., *Vascular endothelial growth factor. The trigger for neovascularization in the eye*. Lab Invest, 1995. **72**(6): p. 615-8.
74. Bates, D.O. and S.J. Harper, *Regulation of vascular permeability by vascular endothelial growth factors*. Vascul Pharmacol, 2002. **39**(4-5): p. 225-37.

75. Takahashi, H. and M. Shibuya, *The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions*. Clin Sci (Lond), 2005. **109**(3): p. 227-41.
76. Fong, G.H., J. Rossant, M. Gertsenstein, and M.L. Breitman, *Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium*. Nature, 1995. **376**(6535): p. 66-70.
77. Belgore, F., A. Blann, D. Neil, A.S. Ahmed, and G.Y. Lip, *Localisation of members of the vascular endothelial growth factor (VEGF) family and their receptors in human atherosclerotic arteries*. J Clin Pathol, 2004. **57**(3): p. 266-72.
78. Bergsland, E.K., *Vascular endothelial growth factor as a therapeutic target in cancer*. Am J Health Syst Pharm, 2004. **61**(21 Suppl 5): p. S4-11.
79. Podar, K. and K.C. Anderson, *The pathophysiologic role of VEGF in hematologic malignancies: therapeutic implications*. Blood, 2005. **105**(4): p. 1383-95.
80. Enholm, B., L. Jussila, M. Karkkainen, and K. Alitalo, *Vascular endothelial growth factor-C: a growth factor for lymphatic and blood vascular endothelial cells*. Trends Cardiovasc Med, 1998. **8**(7): p. 292-7.
81. Conway, E.M., D. Collen, and P. Carmeliet, *Molecular mechanisms of blood vessel growth*. Cardiovasc Res, 2001. **49**(3): p. 507-21.
82. Carmeliet, P., *Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis*. Nat Med, 2000. **6**(4): p. 389-95.
83. Shibuya, M., *Differential roles of vascular endothelial growth factor receptor-1 and receptor-2 in angiogenesis*. J Biochem Mol Biol, 2006. **39**(5): p. 469-78.
84. de Vries, C., J.A. Escobedo, H. Ueno, K. Houck, N. Ferrara, and L.T. Williams, *The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor*. Science, 1992. **255**(5047): p. 989-91.
85. Park, J.E., H.H. Chen, J. Winer, K.A. Houck, and N. Ferrara, *Placenta growth factor. Potentiation of vascular endothelial growth factor bioactivity, in vitro and in vivo, and high affinity binding to Flt-1 but not to Flk-1/KDR*. J Biol Chem, 1994. **269**(41): p. 25646-54.
86. Olofsson, B., E. Korpelainen, M.S. Pepper, S.J. Mandriota, K. Aase, V. Kumar, Y. Gunji, M.M. Jeltsch, M. Shibuya, K. Alitalo, and U. Eriksson, *Vascular endothelial growth factor B (VEGF-B) binds to VEGF receptor-1 and regulates plasminogen activator activity in endothelial cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(20): p. 11709-14.
87. Autiero, M., A. Lutun, M. Tjwa, and P. Carmeliet, *Placental growth factor and its receptor, vascular endothelial growth factor receptor-1: novel targets for stimulation of ischemic tissue revascularization and inhibition of angiogenic and inflammatory disorders*. J Thromb Haemost, 2003. **1**(7): p. 1356-70.
88. Peters, K.G., C. De Vries, and L.T. Williams, *Vascular endothelial growth factor receptor expression during embryogenesis and tissue repair suggests a role in endothelial differentiation and blood vessel growth*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(19): p. 8915-9.
89. Nomura, M., S. Yamagishi, S. Harada, Y. Hayashi, T. Yamashima, J. Yamashita, and H. Yamamoto, *Possible participation of autocrine and paracrine vascular endothelial growth factors in hypoxia-induced proliferation of endothelial cells and pericytes*. J Biol Chem, 1995. **270**(47): p. 28316-24.

90. Dikov, M.M., J.E. Ohm, N. Ray, E.E. Tchekneva, J. Burlison, D. Moghanaki, S. Nadaf, and D.P. Carbone, *Differential roles of vascular endothelial growth factor receptors 1 and 2 in dendritic cell differentiation*. J Immunol, 2005. **174**(1): p. 215-22.
91. Fong, T.A., L.K. Shawver, L. Sun, C. Tang, H. App, T.J. Powell, Y.H. Kim, R. Schreck, X. Wang, W. Risau, A. Ullrich, K.P. Hirth, and G. McMahon, *SU5416 is a potent and selective inhibitor of the vascular endothelial growth factor receptor (Flk-1/KDR) that inhibits tyrosine kinase catalysis, tumor vascularization, and growth of multiple tumor types*. Cancer Res, 1999. **59**(1): p. 99-106.
92. Hiratsuka, S., Y. Maru, A. Okada, M. Seiki, T. Noda, and M. Shibuya, *Involvement of Flt-1 tyrosine kinase (vascular endothelial growth factor receptor-1) in pathological angiogenesis*. Cancer Res, 2001. **61**(3): p. 1207-13.
93. Hiratsuka, S., O. Minowa, J. Kuno, T. Noda, and M. Shibuya, *Flt-1 lacking the tyrosine kinase domain is sufficient for normal development and angiogenesis in mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(16): p. 9349-54.
94. Luttun, A., M. Tjwa, L. Moons, Y. Wu, A. Angelillo-Scherrer, F. Liao, J.A. Nagy, A. Hooper, J. Priller, B. De Klerck, V. Compennolle, 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, *Revascularization of ischemic tissues by PlGF treatment, and inhibition of tumor angiogenesis, arthritis and atherosclerosis by anti-Flt1*. Nat Med, 2002. **8**(8): p. 831-40.
95. Ferrara, N. and T. Davis-Smyth, *The biology of vascular endothelial growth factor*. Endocr Rev, 1997. **18**(1): p. 4-25.
96. Kendall, R.L., G. Wang, and K.A. Thomas, *Identification of a natural soluble form of the vascular endothelial growth factor receptor, FLT-1, and its heterodimerization with KDR*. Biochem Biophys Res Commun, 1996. **226**(2): p. 324-8.
97. Carmeliet, P. and A. Luttun, *The emerging role of the bone marrow-derived stem cells in (therapeutic) angiogenesis*. Thromb Haemost, 2001. **86**(1): p. 289-97.
98. 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, *Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth*. Nat Med, 2001. **7**(11): p. 1194-201.
99. Terman, B.I., M. Dougher-Vermazen, M.E. Carrion, D. Dimitrov, D.C. Armellino, D. Gospodarowicz, and P. Bohlen, *Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial cell growth factor*. Biochem Biophys Res Commun, 1992. **187**(3): p. 1579-86.
100. Neufeld, G., T. Cohen, S. Gengrinovitch, and Z. Poltorak, *Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors*. Faseb J, 1999. **13**(1): p. 9-22.
101. Dixelius, J., T. Makinen, M. Wirzenius, M.J. Karkkainen, C. Wernstedt, K. Alitalo, and L. Claesson-Welsh, *Ligand-induced vascular endothelial growth factor receptor-3 (VEGFR-3) heterodimerization with VEGFR-2 in primary lymphatic endothelial cells regulates tyrosine phosphorylation sites*. J Biol Chem, 2003. **278**(42): p. 40973-9.



102. Hutchings, H., N. Ortega, and J. Plouet, *Extracellular matrix-bound vascular endothelial growth factor promotes endothelial cell adhesion, migration, and survival through integrin ligation*. *Faseb J*, 2003. **17**(11): p. 1520-2.
103. Landry, J. and J. Huot, *Regulation of actin dynamics by stress-activated protein kinase 2 (SAPK2)-dependent phosphorylation of heat-shock protein of 27 kDa (Hsp27)*. *Biochem Soc Symp*, 1999. **64**: p. 79-89.
104. Abedi, H. and I. Zachary, *Signalling mechanisms in the regulation of vascular cell migration*. *Cardiovasc Res*, 1995. **30**(4): p. 544-56.
105. LeBoeuf F, H.F., and Huot J *Regulation of vascular endothelial factor receptor 2-mediated phosphorylation of focal adhesion kinase by heat shock protein 90 and Src kinase activities*  
*J Biol Chem*, 2004: p. 279.
106. Doanes, A.M., D.D. Hegland, R. Sethi, I. Kovesdi, J.T. Bruder, and T. Finkel, *VEGF stimulates MAPK through a pathway that is unique for receptor tyrosine kinases*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999. **255**(2): p. 545-8.
107. Takahashi, T., H. Ueno, and M. Shibuya, *VEGF activates protein kinase C-dependent, but Ras-independent Raf-MEK-MAP kinase pathway for DNA synthesis in primary endothelial cells*. *Oncogene*, 1999. **18**(13): p. 2221-30.
108. Gliki, G., R. Abu-Ghazaleh, S. Jezequel, C. Wheeler-Jones, and I. Zachary, *Vascular endothelial growth factor-induced prostacyclin production is mediated by a protein kinase C (PKC)-dependent activation of extracellular signal-regulated protein kinases 1 and 2 involving PKC-delta and by mobilization of intracellular Ca<sup>2+</sup>*. *Biochem J*, 2001. **353**(Pt 3): p. 503-12.
109. Meadows, K.N., P. Bryant, and K. Pumiglia, *Vascular endothelial growth factor induction of the angiogenic phenotype requires Ras activation*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(52): p. 49289-98.
110. Frisch, S.M. and E. Ruoslahti, *Integrins and anoikis*. *Curr Opin Cell Biol*, 1997. **9**(5): p. 701-6.
111. Gerber, H.P., A. McMurtrey, J. Kowalski, M. Yan, B.A. Keyt, V. Dixit, and N. Ferrara, *Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(46): p. 30336-43.
112. Thakker, G.D., D.P. Hajjar, W.A. Muller, and T.K. Rosengart, *The role of phosphatidylinositol 3-kinase in vascular endothelial growth factor signaling*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(15): p. 10002-7.
113. Brunet, A., A. Bonni, M.J. Zigmond, M.Z. Lin, P. Juo, L.S. Hu, M.J. Anderson, K.C. Arden, J. Blenis, and M.E. Greenberg, *Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor*. *Cell*, 1999. **96**(6): p. 857-68.
114. Levkau, B., B. Herren, H. Koyama, R. Ross, and E.W. Raines, *Caspase-mediated cleavage of focal adhesion kinase pp125FAK and disassembly of focal adhesions in human endothelial cell apoptosis*. *J Exp Med*, 1998. **187**(4): p. 579-86.
115. Abedi, H. and I. Zachary, *Vascular endothelial growth factor stimulates tyrosine phosphorylation and recruitment to new focal adhesions of focal adhesion kinase and paxillin in endothelial cells*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(24): p. 15442-51.

116. BZMBD, L., *Cell-to-cell Signaling*. W.H.Freeman and Company, 2000: p. 848-909.
117. Matsumoto, T., S. Bohman, J. Dixelius, T. Berge, A. Dimberg, P. Magnusson, L. Wang, C. Wikner, J.H. Qi, C. Wernstedt, J. Wu, S. Bruheim, H. Mugishima, D. Mukhopadhyay, A. Spurrkland, and L. Claesson-Welsh, *VEGF receptor-2 Y951 signaling and a role for the adapter molecule TSAd in tumor angiogenesis*. *Embo J*, 2005. **24**(13): p. 2342-53.
118. Takahashi, T., S. Yamaguchi, K. Chida, and M. Shibuya, *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*, 2001. **20**(11): p. 2768-78.
119. Dougher-Vermazen, M., J.D. Hulmes, P. Bohlen, and B.I. Terman, *Biological activity and phosphorylation sites of the bacterially expressed cytosolic domain of the KDR VEGF-receptor*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1994. **205**(1): p. 728-38.
120. Cunningham, S.A., M.P. Arrate, T.A. Brock, and M.N. Waxham, *Interactions of FLT-1 and KDR with phospholipase C gamma: identification of the phosphotyrosine binding sites*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997. **240**(3): p. 635-9.
121. Dayanir, V., R.D. Meyer, K. Lashkari, and N. Rahimi, *Identification of tyrosine residues in vascular endothelial growth factor receptor-2/FLK-1 involved in activation of phosphatidylinositol 3-kinase and cell proliferation*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(21): p. 17686-92.
122. Dougher, M. and B.I. Terman, *Autophosphorylation of KDR in the kinase domain is required for maximal VEGF-stimulated kinase activity and receptor internalization*. *Oncogene*, 1999. **18**(8): p. 1619-27.
123. Kendall, R.L., R.Z. Rutledge, X. Mao, A.J. Tebben, R.W. Hungate, and K.A. Thomas, *Vascular endothelial growth factor receptor KDR tyrosine kinase activity is increased by autophosphorylation of two activation loop tyrosine residues*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(10): p. 6453-60.
124. Zeng, H., S. Sanyal, and D. Mukhopadhyay, *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*, 2001. **276**(35): p. 32714-9.
125. Wilden, P.A., K. Siddle, E. Haring, J.M. Backer, M.F. White, and C.R. Kahn, *The role of insulin receptor kinase domain autophosphorylation in receptor-mediated activities. Analysis with insulin and anti-receptor antibodies*. *J Biol Chem*, 1992. **267**(19): p. 13719-27.
126. Ratcliffe, K.E., Q. Tao, B. Yavuz, K.V. Stoletov, S.C. Spring, and B.I. Terman, *Sck is expressed in endothelial cells and participates in vascular endothelial growth factor-induced signaling*. *Oncogene*, 2002. **21**(41): p. 6307-16.
127. Knight, E.L., A.J. Warner, A. Maxwell, and S.A. Prigent, *Chimeric VEGFRs are activated by a small-molecule dimerizer and mediate downstream signalling cascades in endothelial cells*. *Oncogene*, 2000. **19**(47): p. 5398-405.

128. Warner, A.J., J. Lopez-Dee, E.L. Knight, J.R. Feramisco, and S.A. Prigent, *The Shc-related adaptor protein, Sck, forms a complex with the vascular-endothelial-growth-factor receptor KDR in transfected cells*. *Biochem J*, 2000. **347**(Pt 2): p. 501-9.
129. Stoletov, K.V., K.E. Ratcliffe, S.C. Spring, and B.I. Terman, *NCK and PAK participate in the signaling pathway by which vascular endothelial growth factor stimulates the assembly of focal adhesions*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(25): p. 22748-55.
130. Pelicci, G., L. Lanfrancone, F. Grignani, J. McGlade, F. Cavallo, G. Forni, I. Nicoletti, F. Grignani, T. Pawson, and P.G. Pelicci, *A novel transforming protein (SHC) with an SH2 domain is implicated in mitogenic signal transduction*. *Cell*, 1992. **70**(1): p. 93-104.
131. Holmqvist, K., M.J. Cross, C. Rolny, R. Hagerkvist, N. Rahimi, T. Matsumoto, L. Claesson-Welsh, and M. Welsh, *The adaptor protein shb binds to tyrosine 1175 in vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor-2 and regulates VEGF-dependent cellular migration*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(21): p. 22267-75.
132. Sakurai, Y., K. Ohgimoto, Y. Kataoka, N. Yoshida, and M. Shibuya, *Essential role of Flk-1 (VEGF receptor 2) tyrosine residue 1173 in vasculogenesis in mice*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(4): p. 1076-81.
133. Lamalice, L., F. Houle, G. Jourdan, and J. Huot, *Phosphorylation of tyrosine 1214 on VEGFR2 is required for VEGF-induced activation of Cdc42 upstream of SAPK2/p38*. *Oncogene*, 2004. **23**(2): p. 434-45.
134. Meyer, R.D., V. Dayanir, F. Majnoun, and N. Rahimi, *The presence of a single tyrosine residue at the carboxyl domain of vascular endothelial growth factor receptor-2/FLK-1 regulates its autophosphorylation and activation of signaling molecules*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(30): p. 27081-7.
135. Kaipainen, A., J. Korhonen, T. Mustonen, V.W. van Hinsbergh, G.H. Fang, D. Dumont, M. Breitman, and K. Alitalo, *Expression of the fms-like tyrosine kinase 4 gene becomes restricted to lymphatic endothelium during development*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. **92**(8): p. 3566-70.
136. Partanen, T.A., J. Arola, A. Saaristo, L. Jussila, A. Ora, M. Miettinen, S.A. Stacker, M.G. Achen, and K. Alitalo, *VEGF-C and VEGF-D expression in neuroendocrine cells and their receptor, VEGFR-3, in fenestrated blood vessels in human tissues*. *Faseb J*, 2000. **14**(13): p. 2087-96.
137. Shakibaei, M., G. Schulze-Tanzil, A. Mobasheri, T. Beichler, J. Dressler, and W. Schwab, *Expression of the VEGF receptor-3 in osteoarthritic chondrocytes: stimulation by interleukin-1 beta and association with beta 1-integrins*. *Histochem Cell Biol*, 2003. **120**(3): p. 235-41.
138. Dumont, D.J., L. Jussila, J. Taipale, A. Lymboussaki, T. Mustonen, K. Pajusola, M. Breitman, and K. Alitalo, *Cardiovascular failure in mouse embryos deficient in VEGF receptor-3*. *Science*, 1998. **282**(5390): p. 946-9.
139. Hamada, K., Y. Oike, N. Takakura, Y. Ito, L. Jussila, D.J. Dumont, K. Alitalo, and T. Suda, *VEGF-C signaling pathways through VEGFR-2 and VEGFR-3 in vasculoangiogenesis and hematopoiesis*. *Blood*, 2000. **96**(12): p. 3793-800.
140. Clarijs, R., L. Schalkwijk, U.B. Hofmann, D.J. Ruiter, and R.M. de Waal, *Induction of vascular endothelial growth factor receptor-3 expression on tumor*

- microvasculature as a new progression marker in human cutaneous melanoma.* Cancer Res, 2002. **62**(23): p. 7059-65.
141. Valtola, R., P. Salven, P. Heikkila, J. Taipale, H. Joensuu, M. Rehn, T. Pihlajaniemi, H. Weich, R. deWaal, and K. Alitalo, *VEGFR-3 and its ligand VEGF-C are associated with angiogenesis in breast cancer.* Am J Pathol, 1999. **154**(5): p. 1381-90.
  142. Kubo, H., T. Fujiwara, L. Jussila, H. Hashi, M. Ogawa, K. Shimizu, M. Awane, Y. Sakai, A. Takabayashi, K. Alitalo, Y. Yamaoka, and S.I. Nishikawa, *Involvement of vascular endothelial growth factor receptor-3 in maintenance of integrity of endothelial cell lining during tumor angiogenesis.* Blood, 2000. **96**(2): p. 546-53.
  143. Irrthum, A., M.J. Karkkainen, K. Devriendt, K. Alitalo, and M. Vikkula, *Congenital hereditary lymphedema caused by a mutation that inactivates VEGFR3 tyrosine kinase.* Am J Hum Genet, 2000. **67**(2): p. 295-301.
  144. Karkkainen, M.J. and T.V. Petrova, *Vascular endothelial growth factor receptors in the regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis.* Oncogene, 2000. **19**(49): p. 5598-605.
  145. Walter, D.H. and S. Dimmeler, *Endothelial progenitor cells: regulation and contribution to adult neovascularization.* Herz, 2002. **27**(7): p. 579-88.
  146. Takagi, S., T. Hirata, K. Agata, M. Mochii, G. Eguchi, and H. Fujisawa, *The A5 antigen, a candidate for the neuronal recognition molecule, has homologies to complement components and coagulation factors.* Neuron, 1991. **7**(2): p. 295-307.
  147. Nakamura, F. and Y. Goshima, *Structural and functional relation of neuropilins.* Adv Exp Med Biol, 2002. **515**: p. 55-69.
  148. Neufeld, G., T. Cohen, N. Shraga, T. Lange, O. Kessler, and Y. Herzog, *The neuropilins: multifunctional semaphorin and VEGF receptors that modulate axon guidance and angiogenesis.* Trends Cardiovasc Med, 2002. **12**(1): p. 13-9.
  149. Soker, S., H. Fidler, G. Neufeld, and M. Klagsbrun, *Characterization of novel vascular endothelial growth factor (VEGF) receptors on tumor cells that bind VEGF165 via its exon 7-encoded domain.* J Biol Chem, 1996. **271**(10): p. 5761-7.
  150. Soker, S., S. Takashima, H.Q. Miao, G. Neufeld, and M. Klagsbrun, *Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor.* Cell, 1998. **92**(6): p. 735-45.
  151. Ellis, L.M., *The role of neuropilins in cancer.* Mol Cancer Ther, 2006. **5**(5): p. 1099-107.
  152. Miao, H.Q. and M. Klagsbrun, *Neuropilin is a mediator of angiogenesis.* Cancer Metastasis Rev, 2000. **19**(1-2): p. 29-37.
  153. Miao, H.Q., P. Lee, H. Lin, S. Soker, and M. Klagsbrun, *Neuropilin-1 expression by tumor cells promotes tumor angiogenesis and progression.* Faseb J, 2000. **14**(15): p. 2532-9.
  154. Klagsbrun, M. and A. Eichmann, *A role for axon guidance receptors and ligands in blood vessel development and tumor angiogenesis.* Cytokine Growth Factor Rev, 2005. **16**(4-5): p. 535-48.
  155. Stephenson, J.M., S. Banerjee, N.K. Saxena, R. Cherian, and S.K. Banerjee, *Neuropilin-1 is differentially expressed in myoepithelial cells and vascular smooth muscle cells in preneoplastic and neoplastic human breast: a possible*

- marker for the progression of breast cancer. *Int J Cancer*, 2002. **101**(5): p. 409-14.
156. Soker, S., S. Gollamudi-Payne, H. Fidler, H. Charmahelli, and M. Klagsbrun, *Inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF)-induced endothelial cell proliferation by a peptide corresponding to the exon 7-encoded domain of VEGF165*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(50): p. 31582-8.
  157. Broholm, H. and H. Laursen, *Vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor neuropilin-1's distribution in astrocytic tumors*. *Apmis*, 2004. **112**(4-5): p. 257-63.
  158. Fakhari, M., D. Pullirsch, D. Abraham, K. Paya, R. Hofbauer, P. Holzfeind, M. Hofmann, and S. Aharinejad, *Selective upregulation of vascular endothelial growth factor receptors neuropilin-1 and -2 in human neuroblastoma*. *Cancer*, 2002. **94**(1): p. 258-63.
  159. Straume, O. and L.A. Akslen, *Increased expression of VEGF-receptors (FLT-1, KDR, NRP-1) and thrombospondin-1 is associated with glomeruloid microvascular proliferation, an aggressive angiogenic phenotype, in malignant melanoma*. *Angiogenesis*, 2003. **6**(4): p. 295-301.
  160. Herzog, Y., C. Kalcheim, N. Kahane, R. Reshef, and G. Neufeld, *Differential expression of neuropilin-1 and neuropilin-2 in arteries and veins*. *Mech Dev*, 2001. **109**(1): p. 115-9.
  161. Klagsbrun, M., S. Takashima, and R. Mamluk, *The role of neuropilin in vascular and tumor biology*. *Adv Exp Med Biol*, 2002. **515**: p. 33-48.
  162. Oh, H., H. Takagi, A. Otani, S. Koyama, S. Kemmochi, A. Uemura, and Y. Honda, *Selective induction of neuropilin-1 by vascular endothelial growth factor (VEGF): a mechanism contributing to VEGF-induced angiogenesis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(1): p. 383-8.
  163. Zelzer, E., D.J. Glotzer, C. Hartmann, D. Thomas, N. Fukai, S. Soker, and B.R. Olsen, *Tissue specific regulation of VEGF expression during bone development requires Cbfa1/Runx2*. *Mech Dev*, 2001. **106**(1-2): p. 97-106.
  164. Gluzman-Poltorak, Z., T. Cohen, Y. Herzog, and G. Neufeld, *Neuropilin-2 is a receptor for the vascular endothelial growth factor (VEGF) forms VEGF-145 and VEGF-165*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(38): p. 29922.
  165. Gluzman-Poltorak, Z., T. Cohen, M. Shibuya, and G. Neufeld, *Vascular endothelial growth factor receptor-1 and neuropilin-2 form complexes*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(22): p. 18688-94.
  166. Whitaker, G.B., B.J. Limberg, and J.S. Rosenbaum, *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*, 2001. **276**(27): p. 25520-31.
  167. Soker, S., H.Q. Miao, M. Nomi, S. Takashima, and M. Klagsbrun, *VEGF165 mediates formation of complexes containing VEGFR-2 and neuropilin-1 that enhance VEGF165-receptor binding*. *J Cell Biochem*, 2002. **85**(2): p. 357-68.
  168. Rollin, S., C. Lemieux, R. Maliba, J. Favier, L.R. Villeneuve, B.G. Allen, S. Soker, N.G. Bazan, Y. Merhi, and M.G. Sirois, *VEGF-mediated endothelial P-selectin translocation: role of VEGF receptors and endogenous PAF synthesis*. *Blood*, 2004. **103**(10): p. 3789-97.

169. Bernatchez, P.N., S. Rollin, S. Soker, and M.G. Sirois, *Relative effects of VEGF-A and VEGF-C on endothelial cell proliferation, migration and PAF synthesis: Role of neuropilin-1*. J Cell Biochem, 2002. **85**(3): p. 629-39.
170. Shraga-Heled, N., O. Kessler, C. Prahst, J. Kroll, H. Augustin, and G. Neufeld, *Neuropilin-1 and neuropilin-2 enhance VEGF121 stimulated signal transduction by the VEGFR-2 receptor*. Faseb J, 2007. **21**(3): p. 915-26.
171. Yuan, L., D. Moyon, L. Pardanaud, C. Breant, M.J. Karkkainen, K. Alitalo, and A. Eichmann, *Abnormal lymphatic vessel development in neuropilin 2 mutant mice*. Development, 2002. **129**(20): p. 4797-806.
172. Frot, J.C., H. Hofmann, F. Muller, M.F. Benazet, and P. Giraudet, [*The concept of protein profile*]. Ann Biol Clin (Paris), 1984. **42**(1): p. 1-8.
173. Jackson, M.W., J.M. Bentel, and W.D. Tilley, *Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in prostate cancer and benign prostatic hyperplasia*. J Urol, 1997. **157**(6): p. 2323-8.
174. Henson, P.M., *Release of vasoactive amines from rabbit platelets induced by sensitized mononuclear leukocytes and antigen*. J Exp Med, 1970. **131**(2): p. 287-306.
175. Handley, D.A., C.M. Arbeeny, M.L. Lee, R.G. Van Valen, and R.N. Saunders, *Effect of platelet activating factor on endothelial permeability to plasma macromolecules*. Immunopharmacology, 1984. **8**(3-4): p. 137-42.
176. Wykle, R.L., B. Malone, and F. Snyder, *Enzymatic synthesis of 1-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine, a hypotensive and platelet-aggregating lipid*. J Biol Chem, 1980. **255**(21): p. 10256-60.
177. Barnes, P.J., K.F. Chung, and C.P. Page, *Platelet-activating factor as a mediator of allergic disease*. J Allergy Clin Immunol, 1988. **81**(5 Pt 1): p. 919-34.
178. Archer, C.B., C.P. Page, W. Paul, J. Morley, and D.M. MacDonald, *Inflammatory characteristics of platelet activating factor (PAF-acether) in human skin*. Br J Dermatol, 1984. **110**(1): p. 45-50.
179. Montrucchio, G., G. Alloatti, and G. Camussi, *Role of platelet-activating factor in cardiovascular pathophysiology*. Physiol Rev, 2000. **80**(4): p. 1669-99.
180. Snyder, F., *Platelet-activating factor and related lipids*,. Plenum Press, New York, 1987. **471**.
181. Ihida, K., D. Predescu, R.P. Czekay, and G.E. Palade, *Platelet activating factor receptor (PAF-R) is found in a large endosomal compartment in human umbilical vein endothelial cells*. J Cell Sci, 1999. **112 ( Pt 3)**: p. 285-95.
182. Humphrey, D.M., L.M. McManus, D.J. Hanahan, and R.N. Pinckard, *Morphologic basis of increased vascular permeability induced by acetyl glyceryl ether phosphorylcholine*. Lab Invest, 1984. **50**(1): p. 16-25.
183. Montrucchio, G., E. Lupia, E. Battaglia, L. Del Sorbo, M. Boccellino, L. Biancone, G. Emanuelli, and G. Camussi, *Platelet-activating factor enhances vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell motility and neoangiogenesis in a murine matrigel model*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2000. **20**(1): p. 80-8.
184. Lorant, D.E., M.K. Topham, R.E. Whatley, R.P. McEver, T.M. McIntyre, S.M. Prescott, and G.A. Zimmerman, *Inflammatory roles of P-selectin*. J Clin Invest, 1993. **92**(2): p. 559-70.

185. Andrade, S.P., L.B. Vieira, Y.S. Bakhle, and P.J. Piper, *Effects of platelet activating factor (PAF) and other vasoconstrictors on a model of angiogenesis in the mouse*. Int J Exp Pathol, 1992. **73**(4): p. 503-13.
186. Bussolino, F. and G. Camussi, *Platelet-activating factor produced by endothelial cells. A molecule with autocrine and paracrine properties*. Eur J Biochem, 1995. **229**(2): p. 327-37.
187. Sunderkotter, C., K. Steinbrink, M. Goebeler, R. Bhardwaj, and C. Sorg, *Macrophages and angiogenesis*. J Leukoc Biol, 1994. **55**(3): p. 410-22.
188. Bussolati, B., L. Biancone, P. Cassoni, S. Russo, M. Rola-Pleszczynski, G. Montrucchio, and G. Camussi, *PAF produced by human breast cancer cells promotes migration and proliferation of tumor cells and neo-angiogenesis*. Am J Pathol, 2000. **157**(5): p. 1713-25.
189. Brizzi, M.F., E. Battaglia, G. Montrucchio, P. Dentelli, L. Del Sorbo, G. Garbarino, L. Pegoraro, and G. Camussi, *Thrombopoietin stimulates endothelial cell motility and neoangiogenesis by a platelet-activating factor-dependent mechanism*. Circ Res, 1999. **84**(7): p. 785-96.
190. Camussi, G., G. Montrucchio, E. Lupia, R. Soldi, P.M. Comoglio, and F. Bussolino, *Angiogenesis induced in vivo by hepatocyte growth factor is mediated by platelet-activating factor synthesis from macrophages*. J Immunol, 1997. **158**(3): p. 1302-9.
191. Dentelli, P., L. Del Sorbo, A. Rosso, A. Molinar, G. Garbarino, G. Camussi, L. Pegoraro, and M.F. Brizzi, *Human IL-3 stimulates endothelial cell motility and promotes in vivo new vessel formation*. J Immunol, 1999. **163**(4): p. 2151-9.
192. Thurston, A.W., Jr., S.G. Rhee, and S.D. Shukla, *Role of guanine nucleotide-binding protein and tyrosine kinase in platelet-activating factor activation of phospholipase C in A431 cells: proposal for dual mechanisms*. J Pharmacol Exp Ther, 1993. **266**(2): p. 1106-12.
193. Ishii, S., M. Nakamura, I. Waga, K. Kume, T. Izumi, and T. Shimizu, *Cloning and characterization of a murine platelet-activating factor receptor gene*. Adv Exp Med Biol, 1997. **407**: p. 347-55.
194. Brown, L.F., B. Berse, R.W. Jackman, K. Tognazzi, E.J. Manseau, H.F. Dvorak, and D.R. Senger, *Increased expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in kidney and bladder carcinomas*. Am J Pathol, 1993. **143**(5): p. 1255-62.
195. Olson, T.A., D. Mohanraj, L.F. Carson, and S. Ramakrishnan, *Vascular permeability factor gene expression in normal and neoplastic human ovaries*. Cancer Res, 1994. **54**(1): p. 276-80.
196. Suzuki, K., N. Hayashi, Y. Miyamoto, M. Yamamoto, K. Ohkawa, Y. Ito, Y. Sasaki, Y. Yamaguchi, H. Nakase, K. Noda, N. Enomoto, K. Arai, Y. Yamada, H. Yoshihara, T. Tujimura, K. Kawano, K. Yoshikawa, and T. Kamada, *Expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor in human hepatocellular carcinoma*. Cancer Res, 1996. **56**(13): p. 3004-9.
197. Yoshiji, H., D.E. Gomez, M. Shibuya, and U.P. Thorgeirsson, *Expression of vascular endothelial growth factor, its receptor, and other angiogenic factors in human breast cancer*. Cancer Res, 1996. **56**(9): p. 2013-6.

198. Bussolino, F., G. Camussi, M. Aglietta, P. Braquet, A. Bosia, G. Pescarmona, F. Sanavio, N. D'Urso, and P.C. Marchisio, *Human endothelial cells are target for platelet-activating factor. I. Platelet-activating factor induces changes in cytoskeleton structures*. J Immunol, 1987. **139**(7): p. 2439-46.
199. Rousseau, S., F. Houle, J. Landry, and J. Huot, *p38 MAP kinase activation by vascular endothelial growth factor mediates actin reorganization and cell migration in human endothelial cells*. Oncogene, 1997. **15**(18): p. 2169-77.
200. Zimmerman, G.A., T.M. McIntyre, S.M. Prescott, and D.M. Stafforini, *The platelet-activating factor signaling system and its regulators in syndromes of inflammation and thrombosis*. Crit Care Med, 2002. **30**(5 Suppl): p. S294-301.
201. Tao, Y., H.E. Bazan, and N.G. Bazan, *Platelet-activating factor induces the expression of metalloproteinases-1 and -9, but not -2 or -3, in the corneal epithelium*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1995. **36**(2): p. 345-54.
202. Zucker, S., H. Mirza, C.E. Conner, A.F. Lorenz, M.H. Drews, W.F. Bahou, and J. Jesty, *Vascular endothelial growth factor induces tissue factor and matrix metalloproteinase production in endothelial cells: conversion of prothrombin to thrombin results in progelatinase A activation and cell proliferation*. Int J Cancer, 1998. **75**(5): p. 780-6.
203. Bernatchez, P.N., B.G. Allen, D.S. Gelinas, G. Guillemette, and M.G. Sirois, *Regulation of VEGF-induced endothelial cell PAF synthesis: role of p42/44 MAPK, p38 MAPK and PI3K pathways*. Br J Pharmacol, 2001. **134**(6): p. 1253-62.
204. Lee, T., D.J. Lenihan, B. Malone, L.L. Roddy, and S.I. Wasserman, *Increased biosynthesis of platelet-activating factor in activated human eosinophils*. J Biol Chem, 1984. **259**(9): p. 5526-30.
205. Jakeman, L.B., J. Winer, G.L. Bennett, C.A. Altar, and N. Ferrara, *Binding sites for vascular endothelial growth factor are localized on endothelial cells in adult rat tissues*. J Clin Invest, 1992. **89**(1): p. 244-53.
206. Albert, D.H. and F. Snyder, *Biosynthesis of 1-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine (platelet-activating factor) from 1-alkyl-2-acyl-sn-glycero-3-phosphocholine by rat alveolar macrophages. Phospholipase A2 and acetyltransferase activities during phagocytosis and ionophore stimulation*. J Biol Chem, 1983. **258**(1): p. 97-102.
207. Bernatchez, P.N., M.V. Winstead, E.A. Dennis, and M.G. Sirois, *VEGF stimulation of endothelial cell PAF synthesis is mediated by group V 14 kDa secretory phospholipase A2*. Br J Pharmacol, 2001. **134**(1): p. 197-205.
208. Snyder, F., V. Fitzgerald, and M.L. Blank, *Biosynthesis of platelet-activating factor and enzyme inhibitors*. Adv Exp Med Biol, 1996. **416**: p. 5-10.
209. Marrache, A.M., F. Gobeil, Jr., S.G. Bernier, J. Stankova, M. Rola-Pleszczynski, S. Choufani, G. Bkaily, A. Bourdeau, M.G. Sirois, A. Vazquez-Tello, L. Fan, J.S. Joyal, J.G. Filep, D.R. Varma, A. Ribeiro-Da-Silva, and S. Chemtob, *Proinflammatory gene induction by platelet-activating factor mediated via its cognate nuclear receptor*. J Immunol, 2002. **169**(11): p. 6474-81.
210. Agrawal, D.K., N. Ali, and T. Numao, *PAF receptors and G-proteins in human blood eosinophils and neutrophils*. J Lipid Mediat, 1992. **5**(2): p. 101-4.



211. Bazan, H.E., P. Braquet, S.T. Reddy, and N.G. Bazan, *Inhibition of the alkali burn-induced lipoxygenation of arachidonic acid in the rabbit cornea in vivo by a platelet activating factor antagonist*. J Ocul Pharmacol, 1987. **3**(4): p. 357-65.
212. Marcheselli, V.L. and N.G. Bazan, *Platelet-activating factor is a messenger in the electroconvulsive shock-induced transcriptional activation of c-fos and zif-268 in hippocampus*. J Neurosci Res, 1994. **37**(1): p. 54-61.
213. Mizgerd, J.P., H. Kubo, G.J. Kutkoski, S.D. Bhagwan, K. Scharffetter-Kochanek, A.L. Beaudet, and C.M. Doerschuk, *Neutrophil emigration in the skin, lungs, and peritoneum: different requirements for CD11/CD18 revealed by CD18-deficient mice*. J Exp Med, 1997. **186**(8): p. 1357-64.
214. Hynes, R.O., *Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion*. Cell, 1992. **69**(1): p. 11-25.
215. Muller, W.A., *The role of PECAM-1 (CD31) in leukocyte emigration: studies in vitro and in vivo*. J Leukoc Biol, 1995. **57**(4): p. 523-8.
216. Bernatchez, P.N., S. Soker, and M.G. Sirois, *Vascular endothelial growth factor effect on endothelial cell proliferation, migration, and platelet-activating factor synthesis is Flk-1-dependent*. J Biol Chem, 1999. **274**(43): p. 31047-54.
217. Giraudet, P., *La réaction inflammatoire: physiopathologie, exploration clinique*. Vigot, 1984.
218. Folkman, J., *What is the evidence that tumors are angiogenesis-dependent?* . J. Natl, 1991. **82**: p. 4-6.
219. Makinen, T., B. Olofsson, T. Karpanen, U. Hellman, S. Soker, M. Klagsbrun, U. Eriksson, and K. Alitalo, *Differential binding of vascular endothelial growth factor B splice and proteolytic isoforms to neuropilin-1*. J Biol Chem, 1999. **274**(30): p. 21217-22.
220. Fujisawa, H., S. Takagi, and T. Hirata, *Growth-associated expression of a membrane protein, neuropilin, in Xenopus optic nerve fibers*. Dev Neurosci, 1995. **17**(5-6): p. 343-9.
221. Shibuya, M., *Vascular endothelial growth factor receptor-1 (VEGFR-1/Flt-1): a dual regulator for angiogenesis*. Angiogenesis, 2006. **9**(4): p. 225-30; discussion 231.
222. Neagoe, P.E., C. Lemieux, and M.G. Sirois, *Vascular endothelial growth factor (VEGF)-A165-induced prostacyclin synthesis requires the activation of VEGF receptor-1 and -2 heterodimer*. J Biol Chem, 2005. **280**(11): p. 9904-12.
223. Sato, Y., S. Kanno, N. Oda, M. Abe, M. Ito, K. Shitara, and M. Shibuya, *Properties of two VEGF receptors, Flt-1 and KDR, in signal transduction*. Ann N Y Acad Sci, 2000. **902**: p. 201-5; discussion 205-7.
224. Rousseau, S., F. Houle, and J. Huot, *Integrating the VEGF signals leading to actin-based motility in vascular endothelial cells*. Trends Cardiovasc Med, 2000. **10**(8): p. 321-7.
225. Herrera, A.H., L. Xiang, S.G. Martin, J. Lewis, and J.G. Wilson, *Analysis of complement receptor type 1 (CRI) expression on erythrocytes and of CRI allelic markers in Caucasian and African American populations*. Clin Immunol Immunopathol, 1998. **87**(2): p. 176-83.

226. Petrova, T.V., T. Makinen, and K. Alitalo, *Signaling via vascular endothelial growth factor receptors*. *Exp Cell Res*, 1999. **253**(1): p. 117-30.
227. Huttenlocher, A., R.R. Sandborg, and A.F. Horwitz, *Adhesion in cell migration*. *Curr Opin Cell Biol*, 1995. **7**(5): p. 697-706.
228. Blanes, M.G., M. Oubaha, Y. Rautureau, and J.P. Gratton, *Phosphorylation of tyrosine 801 of vascular endothelial growth factor receptor-2 is necessary for Akt-dependent endothelial nitric-oxide synthase activation and nitric oxide release from endothelial cells*. *J Biol Chem*, 2007. **282**(14): p. 10660-9.
229. Cross, M.J., J. Dixelius, T. Matsumoto, and L. Claesson-Welsh, *VEGF-receptor signal transduction*. *Trends Biochem Sci*, 2003. **28**(9): p. 488-94.
230. Brkovic, A. and M.G. Sirois, *Vascular permeability induced by VEGF family members in vivo: role of endogenous PAF and NO synthesis*. *J Cell Biochem*, 2007. **100**(3): p. 727-37.
231. Marchand, C., J. Favier, and M.G. Sirois, *Role of MSK1 in the signaling pathway leading to VEGF-mediated PAF synthesis in endothelial cells*. *J Cell Biochem*, 2006. **98**(5): p. 1095-105.
232. Rousseau, S., F. Houle, H. Kotanides, L. Witte, J. Waltenberger, J. Landry, and J. Huot, *Vascular endothelial growth factor (VEGF)-driven actin-based motility is mediated by VEGFR2 and requires concerted activation of stress-activated protein kinase 2 (SAPK2/p38) and geldanamycin-sensitive phosphorylation of focal adhesion kinase*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(14): p. 10661-72.
233. Busse, R. and A. Mulsch, *Calcium-dependent nitric oxide synthesis in endothelial cytosol is mediated by calmodulin*. *FEBS Lett*, 1990. **265**(1-2): p. 133-6.
234. Brock, T.A., H.F. Dvorak, and D.R. Senger, *Tumor-secreted vascular permeability factor increases cytosolic Ca<sup>2+</sup> and von Willebrand factor release in human endothelial cells*. *Am J Pathol*, 1991. **138**(1): p. 213-21.
235. 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, *Characterization of vascular endothelial growth factor's effect on the activation of protein kinase C, its isoforms, and endothelial cell growth*. *J Clin Invest*, 1996. **98**(9): p. 2018-26.
236. Wu, H.M., Y. Yuan, D.C. Zawieja, J. Tinsley, and H.J. Granger, *Role of phospholipase C, protein kinase C, and calcium in VEGF-induced venular hyperpermeability*. *Am J Physiol*, 1999. **276**(2 Pt 2): p. H535-42.
237. Gelinas, D.S., P.N. Bernatchez, S. Rollin, N.G. Bazan, and M.G. Sirois, *Immediate and delayed VEGF-mediated NO synthesis in endothelial cells: role of PI3K, PKC and PLC pathways*. *Br J Pharmacol*, 2002. **137**(7): p. 1021-30.
238. Dvorak, H.F., J.A. Nagy, J.T. Dvorak, and A.M. Dvorak, *Identification and characterization of the blood vessels of solid tumors that are leaky to circulating macromolecules*. *Am J Pathol*, 1988. **133**(1): p. 95-109.
239. Ferrara, N., *The role of VEGF in the regulation of physiological and pathological angiogenesis*. *Exs*, 2005(94): p. 209-31.
240. Camussi, G., M. Aglietta, F. Malavasi, C. Tetta, W. Piacibello, F. Sanavio, and F. Bussolino, *The release of platelet-activating factor from human endothelial cells in culture*. *J Immunol*, 1983. **131**(5): p. 2397-403.
241. Robinson, M. and F. Snyder, *Metabolism of platelet-activating factor by rat alveolar macrophages: lyso-PAF as an obligatory intermediate in the formation*

- of alkylarachidonoyl glycerophosphocholine species*. *Biochim Biophys Acta*, 1985. **837**(1): p. 52-6.
242. Winkler, J.D., A.N. Fonteh, C.M. Sung, J.D. Heravi, A.B. Nixon, M. Chabot-Fletcher, D. Griswold, L.A. Marshall, and F.H. Chilton, *Effects of CoA-independent transacylase inhibitors on the production of lipid inflammatory mediators*. *J Pharmacol Exp Ther*, 1995. **274**(3): p. 1338-47.
243. Segelke, B.W., D. Nguyen, R. Chee, N.H. Xuong, and E.A. Dennis, *Structures of two novel crystal forms of Naja naja naja phospholipase A2 lacking Ca<sup>2+</sup> reveal trimeric packing*. *J Mol Biol*, 1998. **279**(1): p. 223-32.
244. Takahashi, T. and M. Shibuya, *The 230 kDa mature form of KDR/Flk-1 (VEGF receptor-2) activates the PLC-gamma pathway and partially induces mitotic signals in NIH3T3 fibroblasts*. *Oncogene*, 1997. **14**(17): p. 2079-89.
245. Heller, R., F. Bussolino, D. Ghigo, G. Garbarino, H. Schroder, G. Pescarmona, U. Till, and A. Bosia, *Protein kinase C and cyclic AMP modulate thrombin-induced platelet-activating factor synthesis in human endothelial cells*. *Biochim Biophys Acta*, 1991. **1093**(1): p. 55-64.
246. Bernatchez, P.N., F. Tremblay, S. Rollin, P.E. Neagoe, and M.G. Sirois, *Sphingosine 1-phosphate effect on endothelial cell PAF synthesis: role in cellular migration*. *J Cell Biochem*, 2003. **90**(4): p. 719-31.
247. Nixon, A.B., J.T. O'Flaherty, J.K. Salyer, and R.L. Wykle, *Acetyl-CoA:1-O-alkyl-2-lyso-sn-glycero-3-phosphocholine acetyltransferase is directly activated by p38 kinase*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(9): p. 5469-73.
248. Cho, W., *Structure, function, and regulation of group V phospholipase A(2)*. *Biochim Biophys Acta*, 2000. **1488**(1-2): p. 48-58.
249. Fulton, D., J.P. Gratton, T.J. McCabe, J. Fontana, Y. Fujio, K. Walsh, T.F. Franke, A. Papapetropoulos, and W.C. Sessa, *Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt*. *Nature*, 1999. **399**(6736): p. 597-601.
250. Lindholm, C.K., E. Gylfe, W. Zhang, L.E. Samelson, and M. Welsh, *Requirement of the Src homology 2 domain protein Shb for T cell receptor-dependent activation of the interleukin-2 gene nuclear factor for activation of T cells element in Jurkat T cells*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(39): p. 28050-7.