



HAL
open science

Phosphorylation sur tyrosine de la VE-cadhérine en réponse au VEGF : mécanismes moléculaires et implications physiopathologiques

Yann Wallez

► **To cite this version:**

Yann Wallez. Phosphorylation sur tyrosine de la VE-cadhérine en réponse au VEGF : mécanismes moléculaires et implications physiopathologiques. Biologie cellulaire. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2007. Français. NNT: . tel-00260975

HAL Id: tel-00260975

<https://theses.hal.science/tel-00260975>

Submitted on 5 Mar 2008

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université Joseph Fourier-Grenoble 1

Laboratoire Physiopathologies vasculaires : Interactions cellulaires,
signalisation et vieillissement

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ JOSEPH FOURIER

Discipline : Biologie cellulaire et moléculaire

Présentée et soutenue publiquement

Par

Yann WALLEZ

Le 27 mars 2007

Phosphorylation sur tyrosine de la VE-cadhérine en réponse au VEGF : mécanismes moléculaires et implications physiopathologiques

Directeur de thèse :

Isabelle VILGRAIN

Composition de jury :

Président :	M. Benoît POLACK
Rapporteurs :	M. Jean PLOUËT M. Kurt BALLMER-HOFER
Examineurs :	M. Francisco CRUZALEGUI Mme Isabelle VILGRAIN M. Philippe HUBER

Remerciements

Je souhaite remercier le Professeur Benoît Polack pour avoir accepté la présidence de ce jury.

Je remercie le Professeur Kurt Ballmer-Hofer et le Docteur Jean Plouët pour avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail, et Monsieur Francisco Cruzalegui pour sa collaboration et sa participation à ce jury.

Merci à Isabelle Vilgrain pour avoir encadré et orienté mon travail avec enthousiasme et discernement. Merci de m'avoir permis de voyager pour mener des recherches en collaboration et pour présenter nos résultats lors de colloques.

Merci à Philippe Huber pour m'avoir accueilli au sein de l'unité 882. Merci pour les discussions scientifiques et les conseils avisés. Merci encore pour m'avoir encadré à la paillasse avec beaucoup de pédagogie, aussi bien en biologie moléculaire qu'en biochimie (eg, collecte des fractions en chambre froide, broyage de placenta...).

Merci à Serhiy Souchelnytskyi pour m'avoir accueilli avec bienveillance au sein de son groupe au Ludwig Institute for Cancer Research à Uppsala.

Merci à Georges Christé de m'avoir familiarisé avec les cordons ombilicaux.

Aux membres de l'Unité 882, présents et passés, j'adresse mes sincères remerciements pour leur aide et leurs conseils précieux, pour les discussions scientifiques et amicales, mais aussi pour les bons moments autour de gâteaux toujours fameux. Cachées au fond de ma valise, j'en emporte quelques recettes, comme un trésor dont j'userai sans modération, pour survivre sur l'autre continent.

À ma famille à qui je dois d'être arrivé jusqu'ici, à mes amis auxquels si souvent encordé j'ai pu faire confiance, et qui par la nature même de notre passion ont su me hisser vers les hauteurs, merci du fond du cœur.

Je dédie cette thèse à la mémoire de mon père.

TABLE DES MATIÈRES

INDEX DES FIGURES	1
ABRÉVIATIONS	2
Introduction	4
I. Système vasculaire	5
I.1. Généralités sur l'appareil circulatoire	5
I.1.1. Les artères	6
I.1.2. Les veines	7
I.1.3. Les capillaires	7
I.1.4. Les vaisseaux lymphatiques	8
I.2. Structure générale des vaisseaux sanguins	9
I.2.1. L'intima	9
I.2.2. La média	10
I.2.3. L'adventice	10
I.2.4. Le vasa vasorum	11
I.2.5. Innervation	12
I.3. Développement	12
I.3.1. Vasculogenèse	12
I.3.2. Angiogenèse	13
I.3.2.1. Définitions et mécanismes	13
I.3.2.2. Facteurs angiogéniques	14
I.3.2.3. Les étapes de l'angiogenèse	14
I.3.3. Lymphangiogenèse	17
I.4. Développement vasculaire et pathologies	17
I.4.1. Généralités	17
I.4.2. Angiogenèse tumorale	18
I.4.3. Mécanismes moléculaires de l'angiogenèse tumorale	20
I.4.3.1. Stimulation directe par les cellules cancéreuses	20
I.4.3.2. Stimulation indirecte par les cellules cancéreuses	20

I.4.3.3. Recrutement de précurseurs endothéliaux.....	20
I.4.4. Caractéristiques des vaisseaux tumoraux.....	21
I.4.4.1. Un réseau vasculaire désorganisé	21
I.4.4.2. Un flux sanguin anormal	21
I.4.4.3. Des vaisseaux mosaïques	21
II. VEGF	22
II.1. Généralités	22
II.2. Fonctions	23
II.2.1. Perméabilité	23
II.2.2. Prolifération	24
II.2.3. Survie.....	26
II.2.4. Migration	27
II.3. Le VEGF dans l'angiogenèse tumorale.....	29
II.3.1. VEGF et tumeurs.....	29
II.3.1.1. Expression	29
II.3.1.2. Expression des récepteurs	29
II.3.1.3. Valeur pronostique.....	30
II.3.2. Thérapies anti-angiogéniques ciblant le VEGF	30
III. La cadhérine de l'endothélium vasculaire : VE-cadhérine.....	31
III.1. Les jonctions intercellulaires endothéliales.....	31
III.2. Généralités sur les cadhérines	33
III.2.1. La superfamille des cadhérines : fonctions, classification	33
III.2.2. Structure des cadhérines classiques	34
III.2.3. Cadhérines classiques et carcinogenèse	35
III.2.4. Les cadhérines de l'endothélium	36
III.3. Structure, fonctions de la VE-cadhérine	37
III.3.1. Structure	37
III.3.2. Architecture du lien homophile	38
III.3.3. Principaux partenaires, principales fonctions.....	39
III.3.3.1. Caténines associées	39
III.3.3.2. Fonctions.....	40

III.4. VE-cadhérine et Signalisation	42
III.4.1. Activité transcriptionnelle des caténines associées à la VE-cadhérine	42
III.4.2. Rôle de la VE-cadhérine dans l'inhibition de contact.....	45
III.4.2.1. Séquestration de la β -caténine aux jonctions	45
III.4.2.2. Déphosphorylation du VEGF-R2 par Dep-1	46
III.4.2.3. Inhibition dépendante de Shc	47
III.4.2.4. Inhibition dépendante de Csk.....	47
III.4.3. Implication de la VE-cadhérine dans la survie cellulaire.....	47
III.4.4. VE-cadhérine et réponse aux forces hémodynamiques.....	48
III.4.5. VE-cadhérine et protéines G.....	49
III.4.5.1. Rôles opposés de Rac et Rho	50
III.4.5.2. Rôle de Cdc42	52
III.4.5.3. Rôle de Rap1	52
IV. Protéines tyrosine kinases Src et angiogenèse.....	54
IV.1. Régulation	54
IV.2. Le rôle de Src dans la réponse au VEGF	55
IV.2.1. Un rôle prépondérant	55
IV.2.2. Un rôle complexe.....	56
Situation du sujet.....	58
I. VE-cadhérine et phosphorylation sur tyrosine	59
I.1. Généralités sur la phosphorylation des protéines.....	59
I.2. Phosphorylation des cadhérines	61
I.3. Phosphorylation de la VE-cadhérine.....	62
I.4. Rôle de Src dans la perméabilité vasculaire	63
II. Objectifs.....	63
Résultats	65
I. Article 1 : Vascular endothelial-cadherin tyrosine phosphorylation in angiogenic and quiescent adult tissues.	66

I.1. Introduction.....	66
I.2. Article.....	67
I.3. Discussion.....	68
I.3.1. Phosphorylation sur tyrosine de la VE-cadhérine dans le système vasculaire mature.....	68
I.3.2. Phosphorylation dans les tissus angiogéniques.....	68
I.3.3. Association VE-cadhérine-VEGF-R2.....	69
I.3.4. Association VE-cadhérine-Src.....	69
II. Article 2 : Src kinase phosphorylates vascular endothelial-cadherin in response to vascular endothelial growth factor : identification of tyrosine 685 as the unique target site.....	71
II.1. Introduction.....	71
II.2. Article.....	72
II.3. Discussion.....	73
II.3.1. La VE-cadhérine est phosphorylée par Src sur la tyrosine 685.....	73
II.3.2. Inhibition de la migration endothéliale par des bloqueurs de Src.....	74
III. Article 3 : Evidence for VE-cadherin acting as adhesion signaling receptor in breast cancers.....	75
III.1. Introduction.....	75
III.2. Article.....	75
III.3. Discussion.....	76
III.3.1. Augmentation de l'expression de VE-cadhérine dans les carcinomes mammaires.....	76
III.3.2. Détection d'une forme phosphorylée de la VE-cadhérine dans les tumeurs mammaires.....	76
III.3.3. Association d'une activité kinase de type Src à la VE-cadhérine dans les tumeurs mammaires.....	76
III.3.4. Association de la PI3K à la VE-cadhérine dans les tumeurs mammaires.....	77
Discussion et perspectives	79
I. Conséquences de la phosphorylation de la VE-cadhérine.....	80
I.1. Phosphorylation de la tyrosine 685 et rôle de la liaison avec Csk.....	80

I.2. Phosphorylation sur les tyrosines 658 et 731.....	81
I.3. Phosphorylation de la sérine 665	82
II. VE-cadhérine et PTP	83
II.1. SHP2.....	83
II.2. VE-PTP.....	83
II.3. Dep-1	84
II.4. PTP μ	84
III. Perspectives.....	84
IV. Article 4 (review) : Angiogenesis: The VE-cadherin Switch.....	86
Bibliographie.....	87

INDEX DES FIGURES

Figure 1 : Schéma général de la circulation.....	6
Figure 2 : Les différents types de vaisseaux sanguins	7
Figure 3 : Organisation du système lymphatique	9
Figure 4 : Mécanismes responsables de l'hétérogénéité des cellules endothéliales	11
Figure 5 : Les différentes étapes de l'angiogenèse	15
Figure 6 : Comparaison des réseaux vasculaires et lymphatiques normaux/ tumoraux.....	19
Figure 7 : Le VEGF, ses récepteurs et leurs effets biologiques.....	23
Figure 8 : VEGF et perméabilité.....	25
Figure 9 : VEGF et prolifération.....	26
Figure 10 : VEGF et survie.....	27
Figure 11 : VEGF et migration.....	28
Figure 12 : Organisation des jonctions intercellulaires endothéliales.....	33
Figure 13 : Le complexe cadhérine-caténine.....	35
Figure 14 : Représentation schématique des cadhérines classiques de type I et II.....	38
Figure 15 : Association de la VE-cadhérine aux filaments d'actine et aux filaments intermédiaires.....	41
Figure 16 : La β -caténine dans la voie Wnt.....	43
Figure 17 : Voies d'activation de Rap1 et stabilisation de la barrière endothéliale.....	53
Figure 18 : Mode d'activation de la tyrosine kinase Src.....	55
Figure 19 : Le kinome humain.....	60
Figure 20 : Séquence du domaine cytoplasmique de la VE-cadhérine.....	64
Figure 21 : Le recrutement de Csk par Dok-R neutralise l'action proliférative de l'EGF.....	81

ABRÉVIATIONS

AMPC	Adenosine monophosphate cyclique
Ang	Angiopoietin
APC	Adenomatou Polyposis Coli
ARN	Acide ribonucléique
CAR	Cell Adhesion Recognition
CHO	Chinese Hamster Ovary
CML	Cellule Musculaire Lisse
Csk	C-terminal Src kinase
Dep	Density-enhanced phosphatase
Dsh	Dishevelled
EGF	Epidermal Growth Factor
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
eNOS	NO synthase endothéliale
FAK	Focal adhesion kinase
FGFa, b	Fibroblaste Growth Factor acid, basic
Gas	Growth arrest-specific
G-CSF	Granulocyte Colony Stimulating Factor
GSK	Glycogen synthase kinase
HGF	Hepatocyte Growth Factor
HIF	Hypoxia Induced Factor
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cell
jpc	jours post-coïtum
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
MEC	Matrice extracellulaire
MLCK	Myosin Light Chain kinase
MMP	Matrix metalloproteinase
PAK	p21-activated kinase
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PDK	PtdIns(3,4,5)-dependant kinase

PECAM	Platelet/endothelial cell adhesion molecule
PH	Pleckstrin homology
PI3K	Phosphatidil inositol 3-kinase
PKC	Protein kinase C
PLC	Phospholipase C
PIGF	Placental Growth Factor
PD-ECGF	Platelet-derived endothelial cell growth factor
PTB	Phosphotyrosine binding domain
PTP	Protein tyrosine phosphatase
ROS	Reactive Oxygen Species
RTK	Receptor Tyrosine kinase
SFK	Src Family Kinase
SH	Src homology
Sos	Son of sevenless
TGF	Transforming Growth Factor
TNF	Tumor Necrosis Factor
uPA	urokinase Plasminogen Activator
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGF-R	Récepteur au VEGF

Introduction

I. Système vasculaire

Les cellules nécessitent pour leur survie un approvisionnement constant en oxygène et en nutriments. Chez les animaux primitifs comme le vers *Caenorhabditis elegans* ou la mouche *Drosophila melanogaster*, l'oxygène diffuse passivement dans tout l'organisme. Cependant, la diffusion passive de l'oxygène dans les tissus n'excède pas 150 μm , et l'apparition de vaisseaux sanguins au cours de l'évolution a permis l'émergence d'animaux de taille plus importante. La fonction primaire du système vasculaire est donc d'acheminer, par le sang, l'oxygène et les nutriments indispensables au fonctionnement des tissus.

Au sein d'un individu, le développement des vaisseaux sanguins (angiogenèse) permet la croissance des organes et la réparation des tissus. Pourtant, cette dépendance absolue envers le réseau vasculaire lui confère parfois un rôle néfaste. C'est le cas lorsque, trop fortement stimulé, ce réseau nourricier autorise le développement tumoral et la dissémination métastatique, ou à l'inverse lorsque, trop peu développé, il induit une dégénération tissulaire. L'espoir de développer des thérapies, pro ou anti-angiogéniques, a naturellement engendré ces dernières années un formidable essor des recherches dans ce domaine. Récemment, les progrès accomplis dans notre compréhension des mécanismes moléculaires de l'angiogenèse a permis l'approbation clinique des premiers agents antiangiogéniques.

Cependant, de nombreux progrès sont encore nécessaires pour minimiser les effets secondaires, pour éviter la résistance à ces nouveaux traitements, et pour développer des thérapies capables de revasculariser des tissus ischémiques.

I.1. Généralités sur l'appareil circulatoire

Outre l'approvisionnement constant en oxygène et en nutriments, l'appareil circulatoire prend en charge l'évacuation des déchets métaboliques. Il permet également la communication hormonale et véhicule les différents acteurs du système immunitaire.

Le cœur, muscle creux et cloisonné fonctionnant de façon rythmique, est responsable de la mise en mouvement du sang dans les vaisseaux. Le sang part du ventricule gauche, circule dans l'ensemble du corps par les artères puis les capillaires et passe dans les veines pour rejoindre le cœur au niveau de l'oreillette droite, c'est la circulation générale. De là, il passe dans le ventricule droit, puis dans l'artère pulmonaire, traverse les poumons et rejoint le cœur dans l'oreillette gauche par la veine pulmonaire, c'est la circulation pulmonaire (Cf. Figure 1 : Schéma général de la circulation).

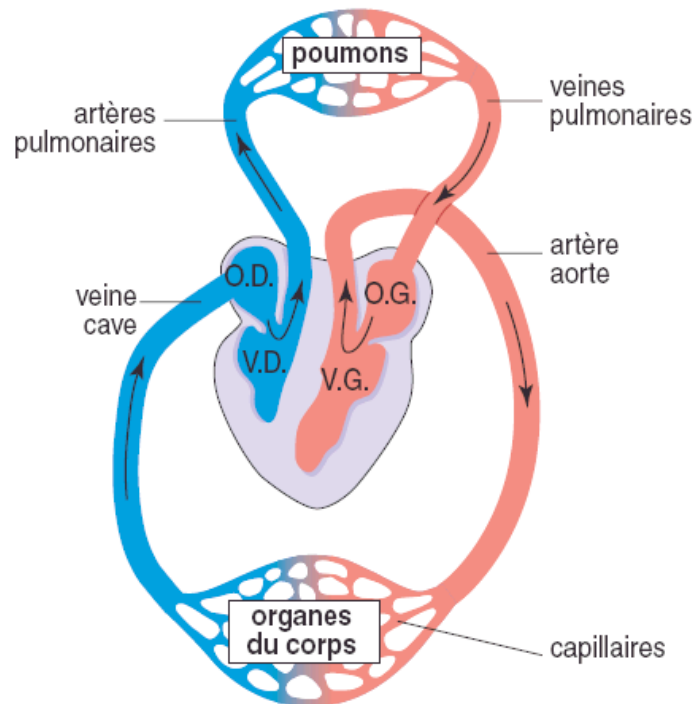
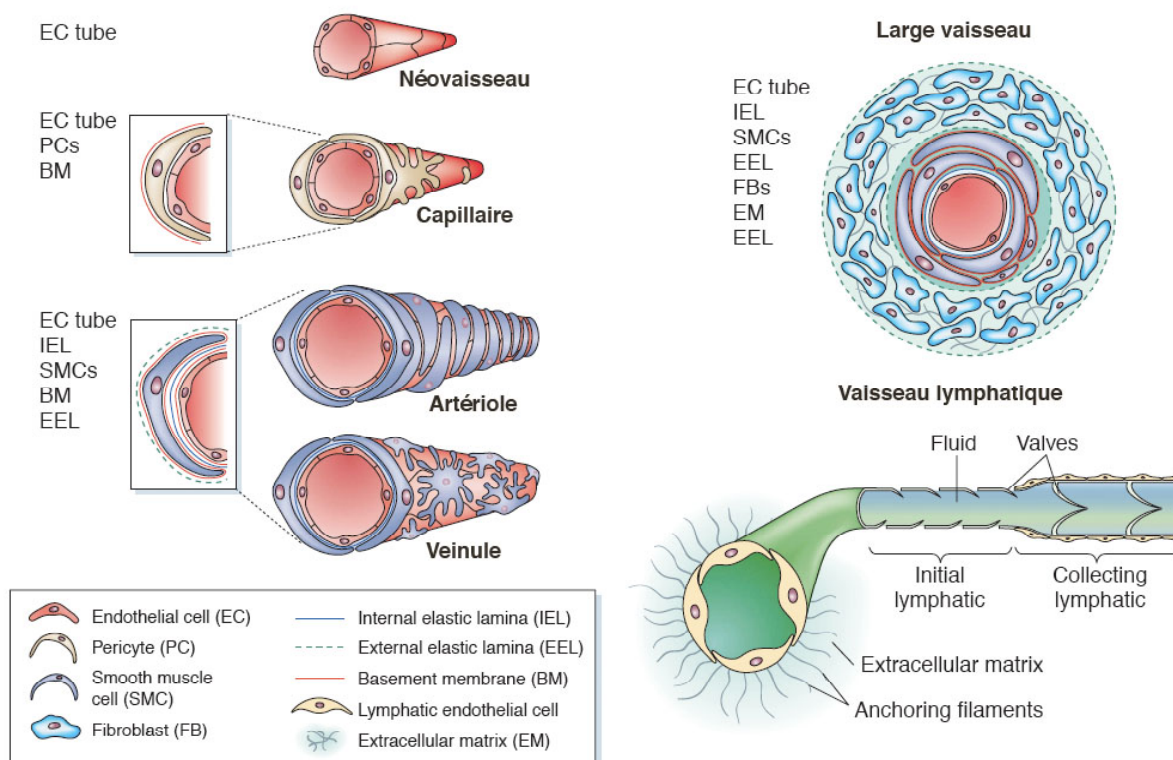


Figure 1 : Schéma général de la circulation

Chez les vertébrés, il existe trois types de vaisseaux sanguins : les artères les veines et les capillaires, auxquels on peut rajouter les vaisseaux lymphatiques qui contiennent non pas du sang mais de la lymphe (Cf. Figure 2 : Les différents types de vaisseaux sanguins).

I.1.1. Les artères

Les artères sont des gros vaisseaux qui partent du cœur et apportent le sang aux organes. À l'exception de l'artère pulmonaire, les artères contiennent du sang oxygéné. Les artères sont caractérisées par une forte pression sanguine, qui impose une paroi épaisse et musculeuse, et par une circulation pulsatile, résultat du battement cardiaque. La structure des artères évolue, à mesure qu'elles s'éloignent du cœur : la composante élastique, d'abord majoritaire, diminue en importance au profit de la couche musculaire. Cette particularité permet d'absorber la pulsativité de l'écoulement sanguin, et à l'entrée dans les capillaires, celui-ci est devenu parfaitement continu.



(D'après Rakesh K Jain, Nature Medicine, 2003)

Figure 2 : Les différents types de vaisseaux sanguins

I.1.2. Les veines

Les veines sont les vaisseaux sanguins qui ramènent le sang au cœur. Elles sont caractérisées par une faible pression sanguine qui est accentuée par le fait qu'il y a deux fois plus de veines que d'artères. Le sang y circule grâce aux pressions environnantes générées par le travail des muscles striés, et avec le concours de nombreuses valvules qui constituent un mécanisme anti-reflux. L'une des principales fonctions des veines, en dehors du retour du sang vers le cœur, est la régulation du volume sanguin. En effet, les veines de la circulation systémique sont des vaisseaux dits capacitifs, car elles peuvent contenir jusqu'à 70% du volume sanguin total. Leur composante musculaire leur permet de mobiliser ce volume sanguin, ce qui a pour effet d'augmenter le remplissage du cœur et le volume d'éjection systolique.

I.1.3. Les capillaires

Les capillaires sont des vaisseaux sanguins extrêmement ténus, dont la structure se limite à un endothélium, une lame basale, et une couche incomplète de péricytes. Cette finesse leur permet de remplir leur fonction d'échange entre le sang et le milieu intérieur. Contrairement aux veines, les capillaires ne peuvent contenir qu'un très faible volume de sang

et leur section étroite produit une forte résistance à l'écoulement sanguin, les capillaires sont dits résistifs. Les capillaires sont organisés en réseaux très interconnectés. Une artériole alimente le réseau et une veinule le draine. Des anastomoses artérioveineuses (ou shunts) permettent de court-circuiter le réseau. En effet, les artérioles possèdent plusieurs couches de cellules musculaires lisses, autorisant une fonction de régulation sphinctérienne placée sous la dépendance du système nerveux végétatif et d'hormones circulantes. Ces anastomoses ont une grande importance pour l'ajustement de la circulation locale.

Il existe trois types de capillaires qui assurent une adéquation entre la perméabilité et les besoins physiologiques des tissus irrigués :

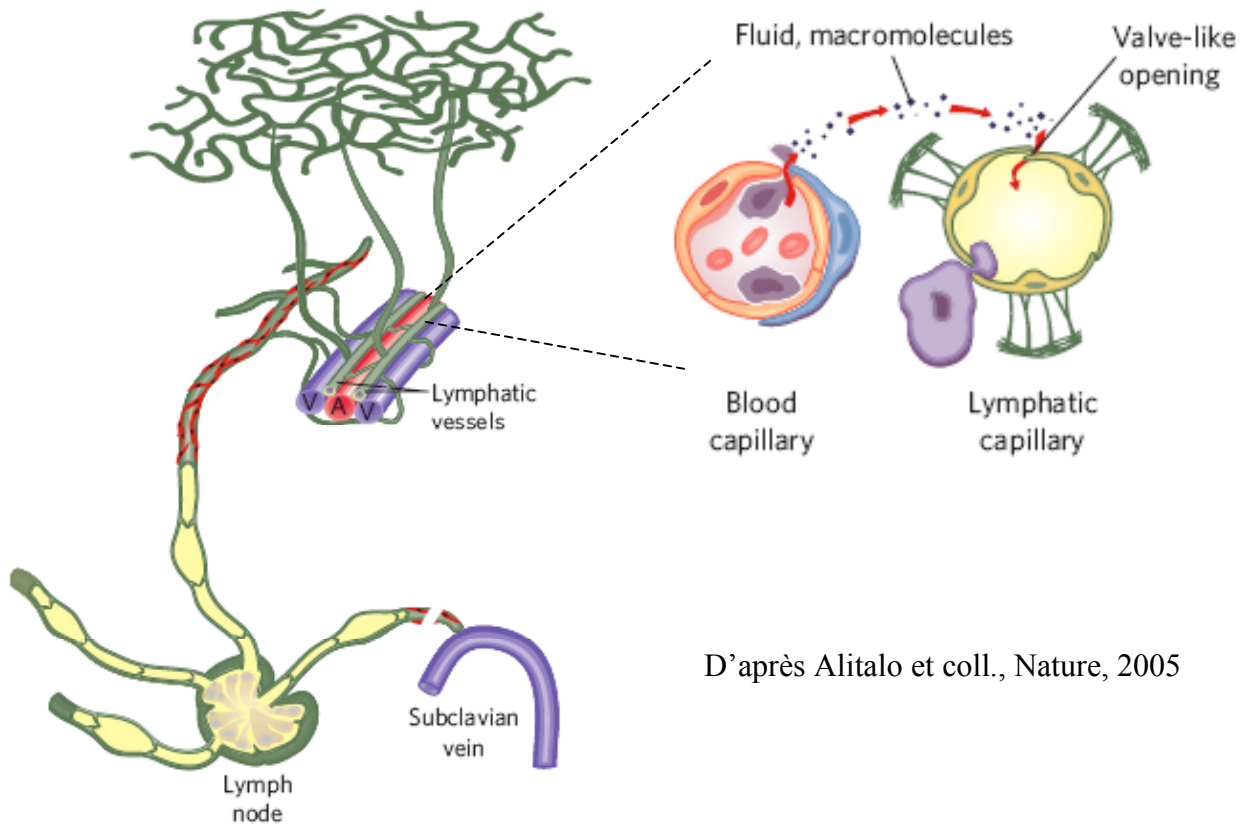
- Les capillaires continus, formés d'un endothélium et d'une lame basale continue. Les cellules endothéliales sont en contact étroit les unes avec les autres, établissant des jonctions ne laissant qu'une fente étroite entre deux membranes plasmiques. Ces jonctions jouent un rôle crucial dans les échanges qui s'établissent entre le sang et les tissus.
- Les capillaires fenestrés, formés d'un endothélium traversé par des pores très nombreux ou des fenestrations et d'une lame basale continue.
- Les capillaires discontinus possédant un endothélium et une lame basale discontinue.

I.1.4. Les vaisseaux lymphatiques

La pression sanguine engendre une fuite continue du plasma des capillaires vers l'espace interstitiel. La fonction principale du système vasculaire lymphatique consiste à drainer ce fluide riche en protéine vers la circulation sanguine (au niveau de la veine jugulaire gauche essentiellement). Il ne s'agit donc pas au sens propre d'une circulation, mais bien d'un drainage unidirectionnel (Cf. Figure 3 : Organisation du système lymphatique). Les vaisseaux lymphatiques ont par ailleurs une fonction primordiale dans la défense immunitaire. En effet, outre le fluide et les macromolécules, des bactéries, des virus, des débris cellulaires et des cellules cancéreuses entrent aussi dans ces capillaires, ainsi que des cellules comme les leucocytes extravasés et les cellules présentatrices d'antigène. De là, la lymphe est transportée vers les vaisseaux lymphatiques collecteurs et réintroduite dans la circulation sanguine au niveau de l'axe jugulaire. En chemin, elle est filtrée par les ganglions lymphatiques, qui concentrent de manière favorable les antigènes et les cellules de l'immunité pour initier la réponse immunitaire spécifique.

Les capillaires lymphatiques se distinguent des capillaires sanguins par plusieurs points. Ils ne sont pas recouverts de péricytes, ils ont des extrémités borgnes, leur calibre est

plus grand et plus irrégulier, leur lame basale est très discontinue ou absente, et des filaments d'ancrage les relient à la matrice extracellulaire, prévenant ainsi le collapsus en cas de haute pression interstitielle. La structure des vaisseaux collecteurs lymphatiques est voisine de celle des veines, mais leur paroi est un peu plus mince et les valvules sont plus nombreuses.



D'après Alitalo et coll., Nature, 2005

Figure 3 : Organisation du système lymphatique

I.2. Structure générale des vaisseaux sanguins

Les vaisseaux sanguins sont constitués de trois tuniques morphologiquement distinctes, de l'intérieur vers l'extérieur du vaisseau : l'intima, la média et l'adventice. L'importance et la complexité de ces trois tuniques dépendent du vaisseau sanguin et peuvent être très grandes ou réduites à une simple monocouche cellulaire. Certains vaisseaux possèdent également leur propre vascularisation et innervation.

I.2.1. L'intima

L'intima est composée de l'intérieur vers l'extérieur, de l'endothélium vasculaire, qui est un épithélium simple pavimenteux tapissant la paroi interne de tous les vaisseaux sanguins

et lymphatiques, et de la lame basale, qui est une fine couche de tissu conjonctif. Les cellules endothéliales couvrent une large surface estimée en totalité à 3000 m² chez l'adulte. Les cellules endothéliales des capillaires représentent la plus grande partie de cette surface en contact avec le sang, et les échanges y sont facilités, puisqu'il existe à ce niveau plus de 5000 cm² d'endothélium par mL de sang, contre moins de 10 cm².mL⁻¹ dans les artères et les veines (van Hinsbergh, V.W. 2001). Une autre fonction majeure de l'endothélium est de maintenir la fluidité en prévenant la formation de thrombus. Les cellules endothéliales provenant de différents sites du réseau vasculaire diffèrent dans leur fonction, et ceci se traduit par une grande hétérogénéité moléculaire et phénotypique de ces cellules (Aird, W.C. 2006; Page, C. *et al.* 1992). Les facteurs microenvironnementaux (ie, biochimiques et biomécaniques) ainsi que les modifications épigénétiques sont les mécanismes qui sous-tendent cette hétérogénéité (Cf. Figure 4 : Mécanismes responsables de l'hétérogénéité des cellules endothéliales). La figure 4 nous montre que le phénotype des cellules endothéliales artérielles est surtout dirigé par des facteurs épigénétiques et biomécaniques (flux sanguin élevé et parfois turbulent). À l'inverse, les cellules endothéliales sont guidées vers un phénotype capillaire (flux sanguin très faible) essentiellement par des facteurs biochimiques (cellules en contact avec le tissu sous-jacent). Les trois types de facteurs interviennent pour le phénotype veineux.

I.2.2. La média

La média contient exclusivement des cellules musculaires lisses (CML) et des constituants extracellulaires : fibres élastiques, fibrilles d'élastine, faisceaux et fibrilles de collagène, protéoglycanes. Cette couche est très variable selon les différents territoires vasculaires, et la présence et l'organisation aussi bien des fibres élastiques que des CML, varient selon la fonction des vaisseaux.

I.2.3. L'adventice

L'adventice est peu ou très présente selon le type de vaisseaux. En général elle est constituée de fibres de collagène et contient également quelques fibres élastiques épaisses et des fibroblastes. Son organisation est à peu près la même quel que soit le type de vaisseau. Cependant, dans les veines, très souvent la média et l'adventice sont très difficiles à distinguer.

I.2.4. Le vasa vasorum

Les vaisseaux, comme tous les autres organes, sont constitués de cellules (endothéliales, musculaires, fibroblastes), qui doivent recevoir des nutriments et de l'oxygène, et rejeter des déchets. La proximité immédiate du sang circulant permet aux cellules vasculaires d'effectuer directement leurs échanges avec celui-ci. Pour les vaisseaux de gros diamètre, la nutrition des cellules constituant la paroi vasculaire est assurée à la fois par le sang circulant dans le vaisseau, mais aussi à partir d'un système capillaire : le vasa vasorum.

	Epigenetics	Microenvironment	
		Biomechanical	Biochemical
Artery	+++	+++	+
Major role in mediating phenotypic heterogeneity between arteries and veins Possible role in mediating phenotypic heterogeneity between different arteries ----- May increase propensity for atherosclerosis		Major role in mediating phenotypic heterogeneity between arteries and veins/capillaries Major role in mediating phenotypic heterogeneity between areas of disturbed and undisturbed flow within a given artery ----- Disturbed flow increases propensity for atherosclerosis	Possible role in mediating phenotypic heterogeneity between arteries and veins/capillaries, owing to differences in oxygen content, pH, CO ₂ (luminal) and composition of blood vessel wall (abluminal) Minor role in mediating phenotypic heterogeneity between arterial ECs since content of circulating blood and underlying vessel wall is relatively constant across the arterial circulation ----- Cardiovascular risk factors (e.g. smoke toxins, hyperlipidemia, hyperglycemia) increase propensity for atherosclerosis
Vein	+++	++	++
Major role in mediating phenotypic heterogeneity between veins and arteries Possible role in mediating phenotypic heterogeneity between different veins		Major role for low (and/or lack of high) flow rates in mediating phenotypic heterogeneity between veins and arteries/capillaries	Possible role in mediating phenotypic heterogeneity between veins and arteries/capillaries, owing to differences in oxygen content, pH, CO ₂ (luminal) and composition of blood vessel wall (abluminal) Likely role in mediating phenotypic heterogeneity between venous ECs since content of circulating blood depends on net exchange of substances that has occurred in preceding capillaries
Capillary	+	+	++++++
Likely major role in mediating phenotypic heterogeneity between nascent/naïve capillaries and large vessels Possible role in mediating phenotypic heterogeneity between different capillary beds		Major role for very low (and/or lack of high) flow rates in mediating phenotypic heterogeneity between capillaries and arteries/veins	Major role in mediating phenotypic heterogeneity between macrovessels and microvessels, since capillary endothelium is uniquely exposed to underlying tissue parenchyma Major role in mediating phenotypic heterogeneity between different capillary beds since the microenvironment varies significantly between organs

Mechanisms of endothelial cell heterogeneity. Relative importance of epigenetics and microenvironment in mediating site-specific phenotypes is indicated by +. The table is designed to provide a conceptual framework; the scores are largely speculative and will require ongoing experimental validation.

D'après Aird WC, Circ Res, 2006.

Figure 4 : Mécanismes responsables de l'hétérogénéité des cellules endothéliales

I.2.5. Innervation

Les vaisseaux sont innervés par des fibres nerveuses dont les afférences aboutissent à la limite de la média et de l'adventice (Burnstock, G. *et al.* 1970). L'arborisation terminale de l'axone forme un réseau périvasculaire, qui permet une unité fonctionnelle à la tunique vasculaire. Les fibres nerveuses agissent directement sur les CML de la couche la plus externe de la media, puis la transmission de l'excitation se fait de proche en proche, par couplage électrique entre les cellules. La densité de l'innervation est directement corrélée à la taille du vaisseau. Ainsi, ce sont les petites artérioles pré-capillaires qui sont le plus innervées, ce qui en fait les principales responsables de la résistance vasculaire périphérique.

I.3. Développement

Le système cardiovasculaire est la première structure organisée à se mettre en place chez les embryons de vertébrés (Coultas, L. *et al.* 2005). L'architecture finale du réseau vasculaire résulte de deux processus morphogénétiques majeurs : la vasculogénèse et l'angiogénèse.

Le système lymphatique se met en place par un processus appelé lymphangiogénèse.

I.3.1. Vasculogénèse

La vasculogénèse est la différenciation des précurseurs endothéliaux appelés angioblastes et leur assemblage en un réseau vasculaire primitif (Risau, W. *et al.* 1995).

Le premier site de vasculogénèse se trouve dans le sac vitellin. Dès 6,5 jpc, la gastrulation entraîne la migration de cellules mésenchymateuses splanchniques et leur agrégation dans cette structure extraembryonnaire (Drake, C.J. *et al.* 2000). Vers 7 jpc, ces agrégats, alors appelés îlots sanguins, engagent un processus de différenciation et fusionnent pour former une lumière et constituer un réseau vasculaire primitif (Risau, W. 1997). Dans l'embryon, un tel réseau vasculaire se met en place par différenciation *in situ* d'angioblastes. Les angioblastes embryonnaires expriment les marqueurs précoces CD34, VEGF-R2 et VE-cadhérine (Moore, M.A. 2002). La vascularisation de certains organes (eg, les poumons) est effectuée initialement par vasculogénèse, avant d'être étendue par angiogénèse (Risau, W. 1997), tandis que d'autres (eg, système nerveux central) sont vascularisés uniquement par un processus d'angiogénèse.

Longtemps considérée comme mécanisme intervenant uniquement dans la formation des néovaisseaux de l'embryon, la vasculogénèse a aujourd'hui un rôle avéré également dans le

développement vasculaire physiologique et pathologique de l'adulte. Ce sont des expériences de greffes qui ont suggéré que des cellules endothéliales circulantes pouvaient participer au processus de néovascularisation (Kennedy, L.J., Jr. *et al.* 1971; Stump, M.M. *et al.* 1963). Les cellules endothéliales circulantes ont depuis été isolées et caractérisées chez l'adulte (Asahara, T. *et al.* 1997; Gehling, U.M. *et al.* 2000; Lin, Y. *et al.* 2000; Peichev, M. *et al.* 2000; Shi, Q. *et al.* 1998; Takahashi, T. *et al.* 1999). *In vitro*, ces cellules se différencient en cellules endothéliales. *In vivo*, elles intègrent les sites de néovascularisation, comme les tumeurs et les territoires ischémiques, où elles sont incorporées dans les néovaisseaux (Asahara, T., Masuda, H. *et al.* 1999; Cogle, C.R. *et al.* 2004; Urbich, C. *et al.* 2004, 2004). En outre, le processus de néovascularisation chez l'adulte semble impliquer des cellules progénitrices endothéliales circulantes (Urbich, C. *et al.* 2004, 2004). De telles cellules ont pu être isolées à partir d'embryons de souris et leur capacité à former des tubes a été démontré *in vitro* et *in vivo* (Cherqui, S. *et al.* 2006; Vajkoczy, P. *et al.* 2003). Le potentiel thérapeutique important de ces cellules encourage aujourd'hui de nombreuses recherches, visant notamment à évaluer à quel point elles participent à la vascularisation, tant physiologique que pathologique, chez l'adulte.

I.3.2. Angiogenèse

I.3.2.1. Définitions et mécanismes

L'angiogenèse est définie comme l'extension et le remodelage du réseau vasculaire primitif, afin d'établir un système circulatoire mature et fonctionnel. Ce sont les cellules endothéliales des petits vaisseaux ou des capillaires qui sont impliquées dans la croissance des nouveaux vaisseaux. L'angiogenèse peut se dérouler suivant plusieurs mécanismes :

- Le bourgeonnement des cellules endothéliales (Coultas, L. *et al.* 2005), processus important au cours de la vascularisation de tissus avasculaires (eg, croissance vasculaire du corps jaune après l'ovulation).
- L'intussusception, processus par lequel la lumière d'un vaisseau est divisée en deux par migration vers l'intérieur des cellules endothéliales, conduisant à la formation de vaisseaux intimement liés ou parallèles (Burri, P.H. *et al.* 2004). Ce processus a lieu lors du développement des poumons (Risau, W. 1997). Deux vaisseaux immatures peuvent aussi fusionner pour n'en former qu'un seul de plus gros diamètre (Wilting, J. *et al.* 1995).
- L'élongation et l'élargissement des vaisseaux, par mitose des cellules endothéliales, lors de la croissance de tissus en restructuration déjà vascularisés.

- Enfin, par incorporation de cellules endothéliales circulantes.

Au cours du développement, le réseau vasculaire primitif va subir une étape d'élongation et de remodelage conduisant, dès 8,5 jpc, à l'établissement d'un réseau vasculaire fonctionnel et mature. Dès lors, l'organogenèse se déroule de manière concomitante avec l'angiogenèse.

Chez l'adulte, les cellules endothéliales ont un faible taux de renouvellement et sont considérées comme quiescentes, puisque le pourcentage de celles en division est estimé à 0,01 (Carmeliet, P. *et al.* 2000). Cependant, l'angiogenèse peut avoir lieu dans des conditions physiologiques. Chez la femme, elle participe chaque mois, avant la menstruation, à l'élaboration de la muqueuse qui tapisse l'utérus et, après la fécondation, à la formation du placenta. L'angiogenèse intervient également dans la cicatrisation, la réparation osseuse et à la suite d'une ischémie, dans la réparation des lésions tissulaires.

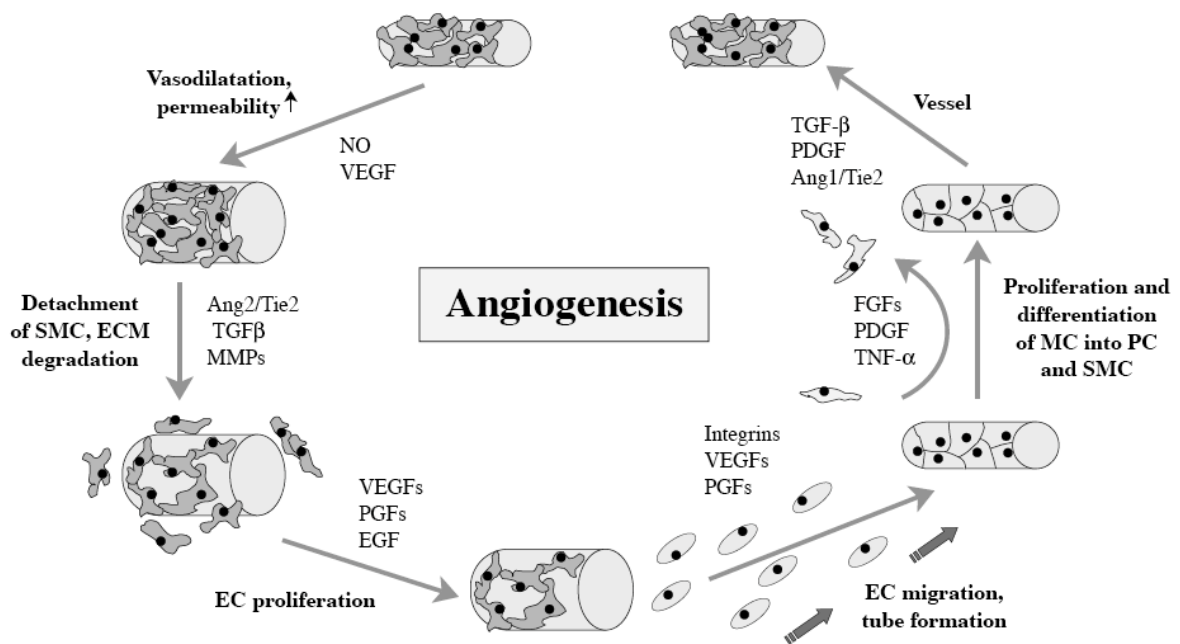
1.3.2.2. Facteurs angiogéniques

Il existe un grand nombre de facteurs régulateurs de l'angiogenèse, soit angiogéniques, soit angiostatiques. dont l'action coordonnée, maintient chez l'adulte l'endothélium dans un état quiescent. L'équilibre peut-être basculé en faveur de l'angiogenèse par excès des facteurs angiogéniques et/ou déficit des facteurs angiostatiques (switch angiogénique).

Durant les vingt dernières années, nombres de ces facteurs angiogéniques ont été identifiés. Les premiers furent le FGFa et le FGFb, qui sont des facteurs de croissance pleiotropes. D'autres facteurs identifiés incluent le TGF- α et le TGF- β , le PDGF, l'HGF, le G-CSF, le TNF- α , le PD-ECGF, l'interleukine-8 et les prostaglandines PGE1 et PGE2. Tous ces facteurs ont fait l'objet d'études poussées et leur pouvoir angiogénique a été démontré (Folkman, J. *et al.* 1992), mais aucun d'eux n'est spécifique des cellules endothéliales. Le seul facteur de croissance reconnu pour être spécifique des cellules endothéliales est le VEGF ; un chapitre lui sera consacré (Cf. Chapitre II).

1.3.2.3. Les étapes de l'angiogenèse

L'angiogenèse est un processus invasif impliquant la migration des cellules endothéliales à travers les tissus environnants. La cellule endothéliale capillaire doit donc acquérir de manière séquentielle et coordonnée, un ensemble de nouvelles propriétés et de fonctions indispensables pour effectuer les différentes étapes du processus angiogénique (Cf. Figure 5 : Les différentes étapes de l'angiogenèse). Cette transformation est souvent appelée transition épithélio-mésenchymateuse.



D'après Distler JH, QJ Nucl Med, 2003

Figure 5 : Les différentes étapes de l'angiogènèse

EC : Endothelial cell
 SMC : Smooth Muscle Cell
 PC : Pericyte
 ECM : Extracellular Matrix

-Dégradation de la membrane basale :

Ceci requiert en premier lieu la dégradation de la membrane basale des vaisseaux préexistants, afin de permettre aux cellules endothéliales de quitter la structure organisée que constitue la paroi vasculaire. De nombreuses enzymes protéolytiques sont impliquées dans la dégradation de la matrice extracellulaire. Les plus importantes sont l'activateur du plasminogène (uPA) et les métalloprotéases (MMPs) (Lakka, S.S. *et al.* 2003).

-Migration à travers la MEC :

Durant la formation de nouveaux bourgeons vasculaires, les cellules endothéliales migrent et se dirigent vers le stimulus chimioattractant. Elles adaptent alors leur forme, devenant étirées et émettant de multiples pseudopodes. Leur surface se trouve donc largement augmentée et elles développent davantage de contacts avec la matrice extracellulaire (MEC). Dans ce contexte, l'expression des récepteurs responsables de l'adhérence cellule-matrice est naturellement augmentée. Les intégrines sont les principaux récepteurs de la MEC. Ce sont

des hétérodimères transmembranaires composés d'une chaîne α , et d'une chaîne β . Cette famille comporte actuellement vingt membres, issus de l'association de 18 chaînes α et de 9 chaînes β . Les intégrines jouent un rôle clef dans l'angiogenèse embryonnaire et post-natale (Serini, G. *et al.* 2006). L'intégrine la plus étudiée, dans l'angiogenèse, est l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ (Eliceiri, B.P. and Cheresh, D.A. 1999). Cette intégrine est surexprimée dans les vaisseaux des tumeurs, au cours de la réparation tissulaire et de la néovascularisation de la rétine. L'angiogenèse est inhibée par un anticorps monoclonal spécifique (LM609), bloquant la liaison de cette intégrine à la MEC. Une forme humanisée de cet anticorps LM609 (Vitaxin) est en cours d'essais cliniques. Des données récentes révèlent que les vaisseaux et les axones utilisent les mêmes signaux et les mêmes mécanismes pour naviguer à travers le corps. Dans le système vasculaire, l'extrémité libre du capillaire en croissance porte une cellule motile spécialisée, appelée « tip cell », qui régule l'extension du bourgeon en répondant à des signaux attractifs ou répulsifs. Quatre facteurs majeurs de guidance neuronale, auxquels sont sensibles les cônes de croissance des axones, ont été identifiés : Semaphorines, Ephrins, Slits et Netrines, ainsi que leurs récepteurs neuropilin, Eph, roundabouts (Robo) et uncoordinated-5 (UNC-5). Ces ligands/récepteurs sont maintenant reconnus pour jouer un rôle dans l'angiogenèse développementale et tumorale (Klagsbrun, M. *et al.* 2005).

-Prolifération :

Une autre étape importante de l'angiogenèse est la prolifération des cellules endothéliales, puisqu'elles doivent couvrir la surface interne des nouveaux vaisseaux. De nombreux facteurs angiogéniques ont effectivement une action mitogène (eg, bFGF, VEGF). Des expériences d'incorporation de thymidine radiomarquée ont permis d'évaluer le temps de renouvellement des cellules endothéliales chez l'adulte à environ mille jours. Cependant, le taux de prolifération des cellules endothéliales des tumeurs humaines est trente fois supérieur au taux de prolifération des tissus normaux.

-Maturation :

Finalement, l'assemblage du vaisseau et sa maturation aboutit à un conduit fonctionnel pour le flux sanguin. Ceci se réalise par anastomose des pousses capillaires et recrutement de péricytes. Les péricytes proviennent de cellules mésenchymateuses locales, induites à se différencier en péricytes par les cellules endothéliales. Ces cellules émettent de longs processus qui entourent le vaisseau, et sécrètent des facteurs, comme le TGF- β , qui stabilisent

les cellules endothéliales et préviennent leur prolifération. Le tissu local est également capable de libérer de l'angiopoiétine-1 (Ang-1) qui est un facteur stabilisant les vaisseaux. Ang-1 agit sur le récepteur à activité tyrosine kinase Tie-2, principalement exprimé par les cellules endothéliales. L'angiopoiétine-2 (Ang-2) agit comme un antagoniste d'Ang-1 sur le récepteur Tie-2. Durant le développement, Ang-1 et Ang-2 sont exprimés dans l'ensemble de la vasculature. Ang-2 antagonise la fonction de maturation et de stabilisation des vaisseaux de Tie-2, et permet la vasculogénèse et l'angiogénèse. Ang-1 continue d'être exprimé chez l'adulte, tandis que l'expression d'Ang-2 ne subsiste que dans les zones de remodelage vasculaire. Ang-2 apparaît donc comme un facteur permissif à l'angiogénèse, permettant la déstabilisation des vaisseaux, processus nécessaire au bourgeonnement (Lauren, J. *et al.* 1998). Sans stimulus angiogénique, les vaisseaux soumis à l'influence de Ang-2 régressent (Holash, J. *et al.* 1999).

I.3.3. Lymphangiogenèse

Chez la souris, le développement des vaisseaux lymphatiques commence vers le dixième jour embryonnaire (E10). Les données expérimentales suggèrent que les cellules endothéliales lymphatiques proviennent d'un bourgeonnement, à partir des veines embryonnaires de l'aire jugulaire et périmésonephrique. De là, elles migrent pour former des sacs et un plexus lymphatique primaire. Le facteur de transcription à homéodomaine Prox1 et le VEGF-C sont essentiels durant ces étapes initiales de développement. Une synthèse de ce processus et de son implication dans diverses pathologies a récemment été réalisé par Alitalo et coll. (Alitalo, K. *et al.* 2005).

I.4. Développement vasculaire et pathologies

I.4.1. Généralités

Bien que chez l'adulte, la plupart des vaisseaux soient quiescents, les cellules endothéliales gardent la faculté remarquable de se diviser rapidement en réponse à un stimulus, que ce soit l'hypoxie pour les vaisseaux sanguins ou l'inflammation pour les vaisseaux lymphatiques. Cependant, les néovaisseaux ainsi formés diffèrent des vaisseaux normaux par bien des aspects (Cf. Figure 6 : Comparaison des réseaux vasculaires et lymphatiques normaux/ tumoraux).

Un grand nombre de pathologies sont associées à une prolifération endothéliale débridée. Les mieux connus sont les rétinopathies diabétiques, les pathologies inflammatoires comme la

polyarthrite rhumatoïde ou l'athérosclérose, le développement tumoral et la formation de métastases.

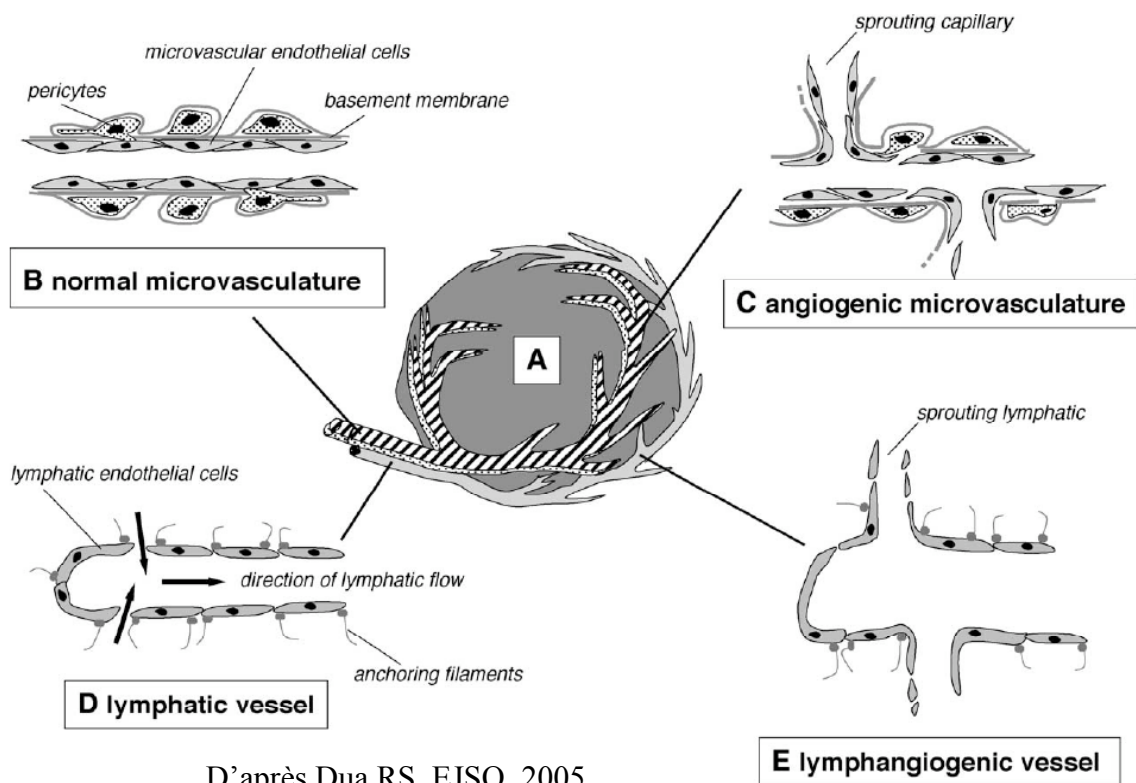
À l'inverse, dans le cas des maladies ischémiques comme celles du cœur ou du cerveau, le switch angiogénique est insuffisant, causant un dysfonctionnement endothélial, une malformation ou une régression des vaisseaux, ou empêchant la revascularisation, la cicatrisation et la régénération.

Les vaisseaux lymphatiques ont également un rôle important dans la pathogenèse de plusieurs maladies comme le cancer, les lymphoedèmes, et certaines situations inflammatoires.

I.4.2. Angiogenèse tumorale

L'observation d'une angiogenèse à proximité de tumeurs a été rapportée il y a environ cent ans (Goldman E, Lancet, 1907). L'hypothèse que ces tumeurs produisent une substance angiogénique diffusible est émise en 1968 (Greenblatt, M. *et al.* 1968). En 1971, Judah Folkman postule que la croissance tumorale et la dissémination métastatique sont dépendantes de l'angiogenèse, et que bloquer celle-ci serait une stratégie antitumorale (Folkman, J. 1992).

Il est maintenant avéré que la croissance tumorale est dépendante de l'angiogenèse, pour l'apport en oxygène, en nutriments et en divers facteurs de croissance. À partir d'une masse critique d'environ 0,2 à 2 mm de diamètre, l'apparition de nouveaux vaisseaux est indispensable à la poursuite du développement tumoral (Li, C.Y. *et al.* 2000). Cependant, la capacité des cellules tumorales à induire l'angiogenèse n'est pas toujours corrélée à leur malignité. Ainsi, beaucoup de tumeurs endocrines, comme l'adénome de la surrénale, sont des tumeurs bénignes fortement vascularisées. Par ailleurs, certaines populations de cellules tumorales peuvent échapper aux exigences de la vascularisation en croissant d'une façon diffuse ou sous forme de mince couche, sur les méninges, la plèvre ou autour des gaines nerveuses (Folkman, J. 1992).



D'après Dua RS, EJSO, 2005

Figure 6 : Comparaison des réseaux vasculaires et lymphatiques normaux/ tumoraux

(A) Schéma d'une tumeur solide avec des vaisseaux sanguins et lymphatiques associés. (B) Le réseau vasculaire normal est constitué de capillaires formés d'un monocouche de cellules endothéliales portée par une lame basale et associée à des péricytes. (C) Le réseau vasculaire angiogénique diffère du réseau vasculaire normal par un plus grand nombre de branchements, moins stables à cause de la fragmentation de la lame basale, de la perte d'association avec les péricytes et de la dissociation des jonctions interendothéliales. (D) Les vaisseaux lymphatiques diffèrent des vaisseaux sanguins par le fait qu'ils sont très perméables, avec des extrémités fermées et peu ou pas de péricytes. (E) Les vaisseaux lymphangiogéniques ont une large lumière, un nombre augmenté d'espaces intercellulaires et des bourgeonnements de cellules endothéliales augmentés.

Une fois la tumeur primaire vascularisée, la probabilité de dissémination et d'apparition des métastases augmente (Folkman, J. *et al.* 1987). En effet, la vascularisation permet aux cellules tumorales de rentrer dans la circulation et d'initier la formation de métastases à distance. Les tumeurs vont emprunter quatre voies de propagation : l'invasion tissulaire locale, la voie lymphatique, la voie sanguine et l'ensemencement direct des cavités et des surfaces corporelles. Les moyens de dissémination les plus courants étant les vaisseaux lymphatiques, ce qui donne lieu à des métastases lymphogènes ganglionnaires ou extraganglionnaires (lymphangite), et les vaisseaux sanguins, à l'origine de métastases hémotogènes dans un organe filtre cible à distance du site primitif.

I.4.3. Mécanismes moléculaires de l'angiogenèse tumorale

Les facteurs responsables du switch angiogénique (Carmeliet, P. *et al.* 2000) peuvent être produits par les cellules tumorales, endothéliales, fibroblastiques, les cellules inflammatoires, ou libérés de la MEC qui sert de lieu de stockage. Trois mécanismes différents ont été identifiés.

I.4.3.1. Stimulation directe par les cellules cancéreuses

Les cellules cancéreuses, qui se multiplient activement, stimulent l'angiogenèse pour répondre à leurs besoins métaboliques. De plus, les cellules au cœur du foyer tumoral sont en condition d'hypoxie et synthétisent des facteurs proangiogéniques, dont principalement le VEGF par la voie de HIF1 α , qui stimulent la prolifération des cellules endothéliales et leur migration.

Des mutations oncogéniques des cellules cancéreuses peuvent aussi induire un déséquilibre de la balance entre les facteurs pro et antiangiogéniques. Ainsi, une mutation inhibitrice de p53, ou une mutation activatrice de l'oncogène Ha-Ras, stimule les voies de signalisation favorables à l'angiogenèse.

I.4.3.2. Stimulation indirecte par les cellules cancéreuses

Outre la stimulation directe de l'endothélium, les cellules cancéreuses peuvent aussi stimuler le phénotype angiogénique de la tumeur en stimulant la synthèse de facteurs angiogéniques comme l'EGF, le FGF, le TGF α , le TNF α et le VEGF par les cellules stromales (Fukumura, D. *et al.* 1998).

Les monocytes et autres cellules inflammatoires sont fréquemment observés dans le stroma de tissus néoplasiques (Mantovani, A. *et al.* 1993). Ces cellules sont normalement chargées de reconnaître le processus tumoral et de l'éliminer. Toutefois, il semble que l'activité de ces cellules puisse être détournée par les cellules cancéreuses au profit de la croissance tumorale. Dans certains types de cancers, il est bien établi que la réaction inflammatoire a une signification très pathologique. Dans les tumeurs mammaires, l'infiltrat inflammatoire est un facteur de mauvais pronostic (Leek, R.D. *et al.* 1996).

I.4.3.3. Recrutement de précurseurs endothéliaux

Il a été montré que des cellules précurseurs de cellules endothéliales circulantes issues de la moelle osseuse existent également chez l'adulte (Asahara, T., Takahashi, T. *et al.* 1999; Shi, Y. *et al.* 1998). Ces cellules sont recrutées au niveau des sites où la néovascularisation est

intense et peuvent être incorporées dans les néovaisseaux (Asahara, T., Takahashi, T. *et al.* 1999). L'hypoxie et le VEGF sont les principaux médiateurs de ce recrutement (Asahara, T., Takahashi, T. *et al.* 1999; Hattori, K. *et al.* 2001). L'importance de ce phénomène dépend de la nature de la tumeur et de l'espèce (Lyden, D. *et al.* 2001; Ribatti, D. *et al.* 1999).

I.4.4. Caractéristiques des vaisseaux tumoraux

Les vaisseaux tumoraux se forment par bourgeonnement ou intussusception de vaisseaux préexistants. La structure des vaisseaux tumoraux diffère par bien des aspects de celle des vaisseaux normaux.

I.4.4.1. Un réseau vasculaire désorganisé

Les vaisseaux sanguins tumoraux ont des structures vasculaires irrégulières et désorganisées. Ils sont dilatés, hémorragiques, tortueux, et tendent à éclater (McDonald, D.M. *et al.* 2002). Ils ont une taille de pores augmentée comparé à un réseau vasculaire normal, ce qui a une conséquence sur la perméabilité de ces vaisseaux. En outre ces vaisseaux sont fragiles, puisque leurs cellules endothéliales forment des jonctions de type fenestré avec de larges espaces intercellulaires, une lame basale discontinue et peu de péricytes. Par conséquent, ce type de réseau vasculaire très perméable favorise le phénomène d'extravasation plasmatique. Les dépôts de fibrine et fibronectine dans le stroma tumoral, ainsi que l'apport de facteurs de croissance qui en résultent, servent alors de matrice à la prolifération cellulaire. En outre, la perméabilité vasculaire accrue des vaisseaux tumoraux favorise le passage de cellules tumorales dans le flux sanguin et l'apparition de foyers métastatiques secondaires (Folkman, J. 1975).

I.4.4.2. Un flux sanguin anormal

Ce réseau désorganisé engendre un flux sanguin anormal, avec des zones de stagnation du sang dû à des vaisseaux qui ne sont pas complètement constitués, ou des désordres de flux dus à des connections anormales entre les vaisseaux (Bergers, G. *et al.* 2003). Cela crée des zones hypoxiques qui stimulent le relargage de VEGF, qui à son tour entraîne des désorganisations vasculaires.

I.4.4.3. Des vaisseaux mosaïques

Les vaisseaux tumoraux sont constitués de cellules endothéliales, mais aussi, parfois de cellules tumorales (Chang, Y.S. *et al.* 2000). En effet, les cellules tumorales peuvent aller

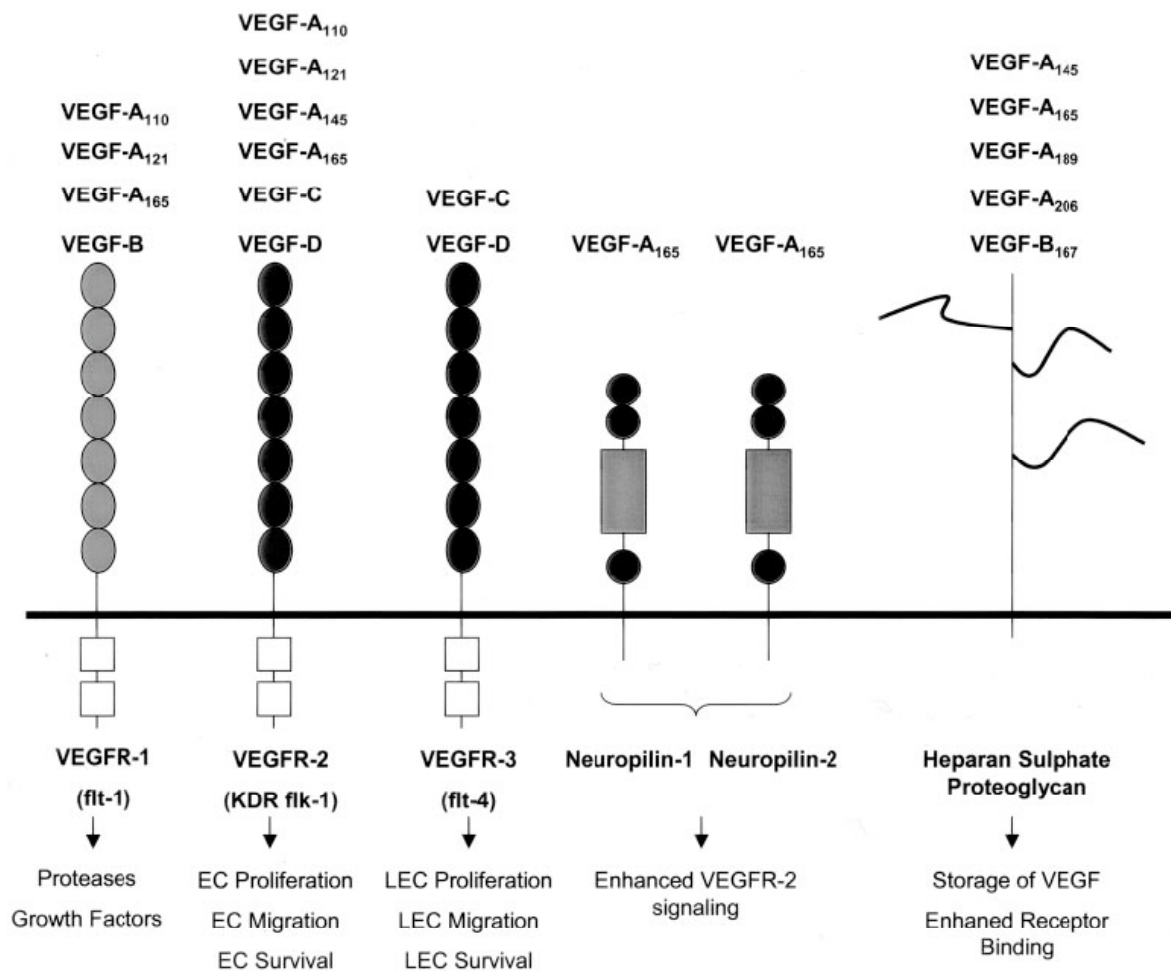
jusqu'à présenter un mimétisme vasculogénique. Ainsi, des cellules de mélanomes sont capables de former un réseau de type plexus primitif, observé lors de l'angiogenèse au cours du développement (Hendrix, M.J. *et al.* 2003).

II. VEGF

II.1. Généralités

Le VEGF a été identifié initialement dans le milieu conditionné de cellules d'hépatocarcinome de cobaye, comme une molécule capable d'augmenter la perméabilité de microvaisseaux, de petites veines et de veines postcapillaires primaires pour favoriser la circulation de macromolécules (Senger, D.R. *et al.* 1983). Ce facteur, initialement appelé facteur de perméabilité vasculaire (VPF) (Keck, P.J. *et al.* 1989) ou vasculotropin (Plouet, J. *et al.* 1989), a été purifié à partir de milieux conditionnés de différents types cellulaires, incluant des cellules folliculo-stellaires de l'hypophyse bovine (Ferrara, N. *et al.* 1989), des lignées cellulaires tumorales hypophysaires de souris (Plouet, J. *et al.* 1989), et des lignées cellulaires de gliome de rat (Conn, G. *et al.* 1990). L'étude de cette molécule a révélé son importance considérable dans l'angiogenèse et plus généralement dans l'ensemble des processus de formation des vaisseaux. En effet, l'inactivation d'un seul allèle du VEGF chez la souris résulte en une mort embryonnaire entre le 10^{ème} et le 12^{ème} jour, due à des défauts de vascularisation importants (Carmeliet, P. *et al.* 1996; Ferrara, N. *et al.* 1996).

Le premier membre identifié de cette famille fut le VEGF-A, qui existe sous plusieurs isoformes. Les autres membres incluent le VEGF-B à E et le PlGF-1, -2 et -3. Les membres de la famille du VEGF sont des protéines homodimériques qui agissent via l'activation de récepteurs à activité tyrosine kinase (VEGFR-1 à 3), qui sont presque exclusivement exprimés par les cellules endothéliales. Le VEGFR-1 (flt-1, fms-like kinase-1) lie le VEGF-A, le VEGF-B et le PlGF avec une forte affinité, alors que le VEGFR-2 (flk-1, foetal liver kinase-1, KDR) lie le VEGF-A, C et D avec une affinité moins importante. Le VEGFR-3 (flt-4) est seulement exprimé par les cellules endothéliales lymphatiques, et lie le VEGF-C. Le VEGF-D est un ligand additionnel du VEGFR-3. Le VEGF-E semble agir principalement via le VEGFR-2. Les neuropilines-1 et 2 et les protéoglycanes à héparanes sulfates sont également capables de lier certaines formes du VEGF (Cf. Figure 7 : Le VEGF, ses récepteurs et leurs effets biologiques).



D'après Ann Hoeben et coll., Pharmacological Reviews, 2004

Figure 7 : Le VEGF, ses récepteurs et leurs effets biologiques

II.2. Fonctions

L'ensemble des effets décrits dans ce chapitre concerne le VEGF-A, également appelé VEGF (dénomination qui sera utilisée par la suite dans ce manuscrit).

II.2.1. Perméabilité

Le VEGF a été initialement découvert comme facteur de perméabilité vasculaire, permettant la diffusion de macromolécules (Bates, D.O. *et al.* 2002), avec un effet 10 000 fois plus puissant que l'histamine. L'augmentation de cette perméabilité est souvent observée dans des conditions d'angiogenèse pathologique dans les tumeurs solides, au cours de la cicatrisation ou lors de l'inflammation. Le VEGF s'accumule dans les ascites malignes (Luo, J.C. *et al.* 1998) et les effusions pleurales (Zebrowski, B.K. *et al.* 1999). Cette augmentation de perméabilité est en lien avec une induction par le VEGF de la fenestration endothéliale

(Dvorak, A.M. *et al.* 2001; Esser, S., Wolburg, K. *et al.* 1998) et la désorganisation des jonctions endothéliales, avec notamment des modifications de la VE-cadhérine (Cf. chapitre III) et de l'occludine (Kevil, C.G. *et al.* 1998). L'augmentation de la perméabilité induit en conséquence une augmentation de la pression interstitielle (Carmeliet, P. 2005).

L'augmentation de perméabilité en réponse au VEGF fait intervenir plusieurs voies (Cf. Figure 8 : VEGF et perméabilité) :

- L'activation des kinases de la famille Src et la dissociation du complexe VEGF-R2/cadhérine/caténine (Weis, S., Shintani, S. *et al.* 2004) (Cf. chapitre I.4 p63).
- L'activation de la NO synthase endothéliale (eNOS) et la production de monoxyde d'azote. En effet la eNOS joue un rôle déterminant dans l'angiogenèse induite par le VEGF et dans la perméabilité vasculaire (Fukumura, D. *et al.* 2001; Fukumura, D. *et al.* 1997).
- L'activation de la voie p38 MAPK, démontrée *in vitro* et *in vivo* (Issbrucker, K. *et al.* 2003).
- L'endocytose de la VE-cadhérine dans des vésicules de clathrine par l'intermédiaire de la β -arrestine (Gavard, J. *et al.* 2006).

II.2.2. Prolifération

Le VEGF stimule la synthèse d'ADN et la prolifération des cellules endothéliales via le VEGF-R2 et la voie Ras-Raf-MEK-ERK (Parenti, A. *et al.* 1998; Pedram, A. *et al.* 1998). L'activation de la voie PI3K (phosphatidyl inositol kinase) /p70 S6K et de la PLC γ par le VEGF-R2 est également impliquée dans l'induction de la prolifération des cellules endothéliales par le VEGF (Vinals, F. *et al.* 1999; Wu, L.W. *et al.* 2000) (Cf. Figure 9 : VEGF et prolifération).

Le VEGF induit l'autophosphorylation du VEGF-R2 sur plusieurs résidus tyrosines (Cross, M.J. *et al.* 2003). Une étude récente a montré que les tyrosines 1175 et 1214 sont fortement autophosphorylées en réponse au VEGF, et que la tyrosine 1175 est cruciale pour l'induction de la prolifération cellulaire via la voie PLC γ /PKC/MAPK (Takahashi, T. *et al.* 2001). Très récemment, le rôle clé de cette tyrosine 1175 a été confirmé *in vivo* grâce à des souris knock-in substituant les tyrosines 1173 et 1212 du gène *Flk-1* (correspondant aux Y 1175 et 1214 du VEGF-R2 humain) en phénylalanine. Les souris homozygotes *Flk-1*^{1173F} meurent au cours du développement embryonnaire entre E8,5 et E9,5 de défauts des cellules endothéliales et hématopoïétique très similaires aux défauts observés chez les souris *Flk-1*^{-/-}

(Sakurai, Y. *et al.* 2005). À l'inverse, les souris homozygotes *Flk-1^{I212F}* sont viables et fertiles.

Le VEGF a également été décrit comme mitogénique pour les lymphocytes (Praloran, V. *et al.* 1991), les cellules épithéliales pigmentaires de la rétine (Guerrin, M. *et al.* 1995) et les cellules de Schwann (Sondell, M. *et al.* 1999).

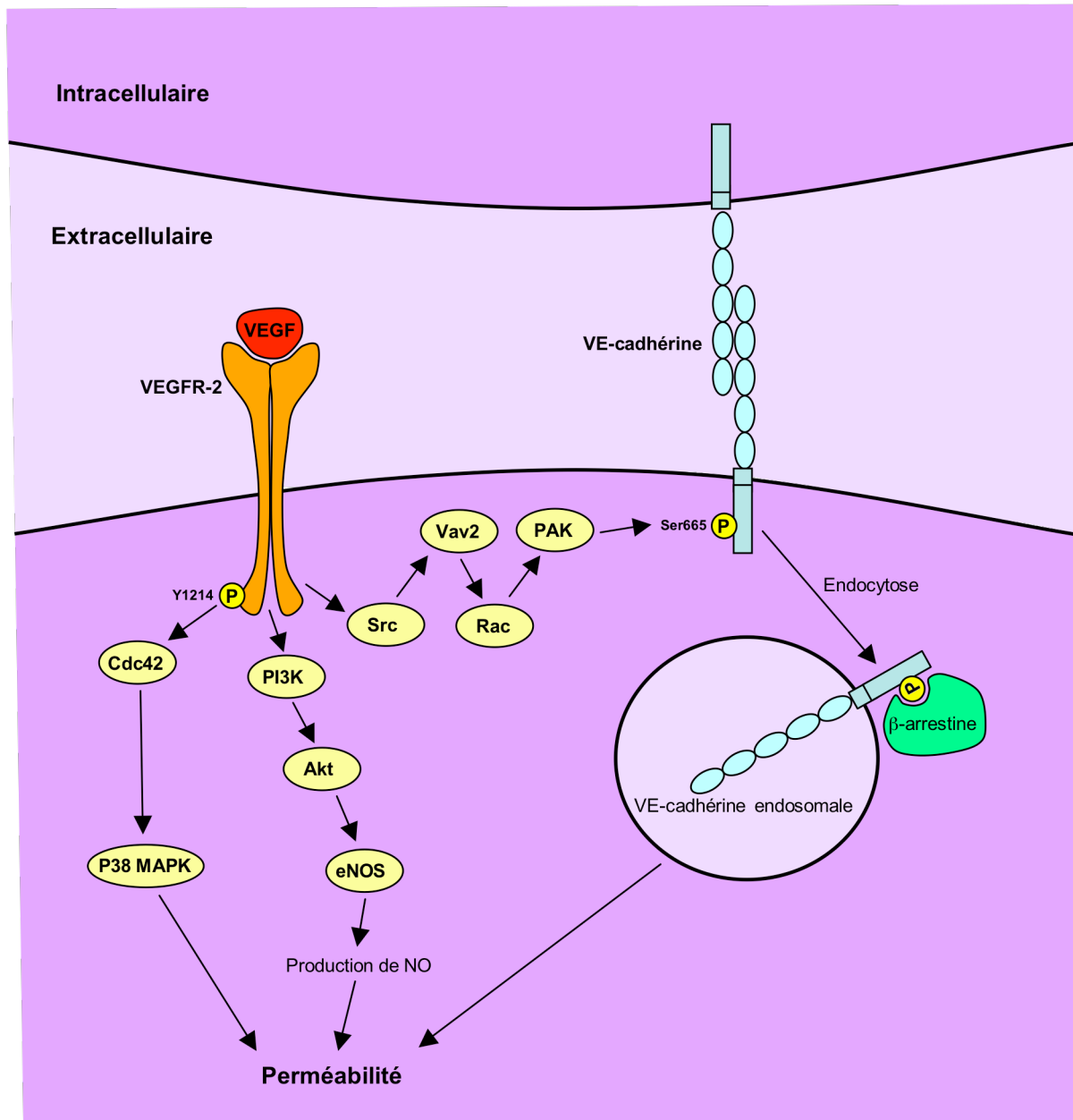


Figure 8 : VEGF et perméabilité

L'autophosphorylation du VEGFR-2 sur la tyrosine 1214 permet l'activation subséquente de Cdc42 et de p38 MAPK, dont l'activité est nécessaire à l'ouverture des jonctions. La production de NO par la NO synthase endothéliale (eNOS) est déclenchée par la voie PI3K/ Akt et aboutit également à l'augmentation de la perméabilité vasculaire. Le VEGF augmente aussi la perméabilité en provoquant l'endocytose de la VE-cadhérine.

II.2.3. Survie

Un mécanisme fondamental par lequel le VEGF peut exercer son effet de protection vasculaire est son rôle dans la survie des cellules endothéliales. Ceci a d'abord été montré pour des cellules endothéliales de rétine (Alon, T. *et al.* 1995). *In vitro*, les cellules endothéliales ensemencées sur une couche matricielle de gélatine sont protégées par le VEGF de l'apoptose induite par le TNF α (Spyridopoulos, I. *et al.* 1997) ou les radiations ionisantes (Katoh, O. *et al.* 1995).

Dans les cellules endothéliales en condition de stress, par exemple en l'absence de sérum, le VEGF lie le VEGFR-2 qui active la voie de la PI3K et la phosphorylation de la protéine Akt/protéine kinase B impliquées dans les signaux anti-apoptotiques (Cf. Figure 10 : VEGF et survie). Un complexe impliquant la VE-cadhérine, la β -caténine, le VEGFR-2 et la PI3K intervient dans la survie des cellules endothéliales (Cf. chapitre III.4.3 p47). Le VEGFR-1, par contre, n'est pas impliqué dans la voie de survie de ces cellules, il n'induit pas Akt (Gerber, H.P., McMurtry, A. *et al.* 1998; Thakker, G.D. *et al.* 1999) et ne s'associe pas avec le complexe VE-cadhérine (Carmeliet, P. *et al.* 1999). Les effets à long terme du VEGF sur la survie des cellules peuvent être induits par la régulation positive de protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et A1 (Gerber, H.P., Dixit, V. *et al.* 1998). Un autre mécanisme par lequel le VEGF peut maintenir la survie des cellules endothéliales est la phosphorylation de FAK (*focal adhesion kinase*) (Zachary, I. *et al.* 2001; Zachary, I. *et al.* 1992).

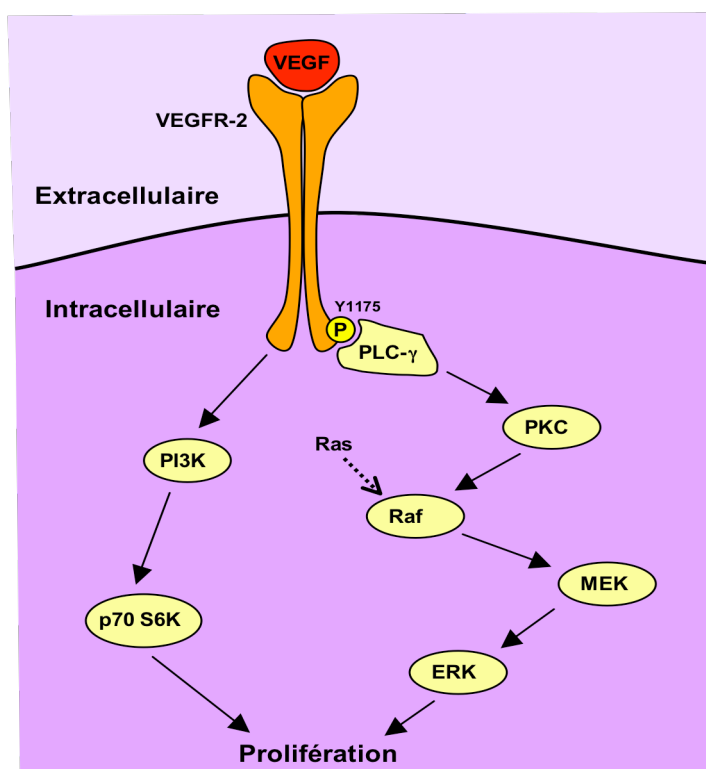


Figure 9 : VEGF et prolifération

L'autophosphorylation du VEGFR-2 sur la tyrosine 1175 recrute et active la phospholipase C γ (PLC γ), qui engendre alors la voie PKC/ERK. L'activation de la voie PI3K/ p70 S6K par le VEGFR-2 est également impliquée dans la prolifération des cellules endothéliales induite par le VEGF.

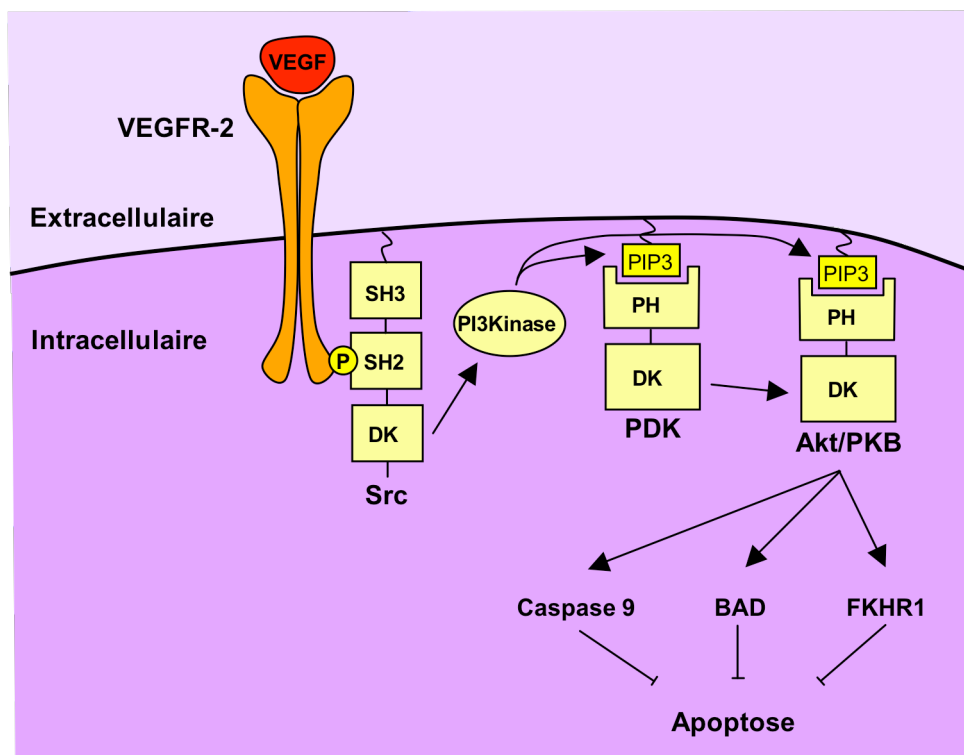


Figure 10 : VEGF et survie

L'autophosphorylation du VEGFR-2 conduit au recrutement et à l'activation de Src. L'activation de la PI3K, une des cibles de Src, permet la production de PtdIns(3, 4, 5) triphosphate (PIP3). Ce phospholipide sert de site de liaison au domaines Pleckstrin homology (PH) des kinases PDK et Akt/PKB. Après son ciblage à la membrane et sa phosphorylation par PDK, Akt/PKB activé va phosphoryler la Caspase-9, BAD et FKHR1, aboutissant à l'inhibition de l'apoptose et la stimulation de la survie cellulaire.

II.2.4. Migration

Le VEGF joue un rôle chimioattractant sur les cellules endothéliales de cerveau de souris (Soga, N. *et al.* 2001) et de veine ombilicale humaine (Abu-Ghazaleh, R. *et al.* 2001). Le fait que le VEGF soit chimioattractant pour les cellules endothéliales suggère qu'il joue un rôle dans la migration et l'invasion de ces cellules. Le VEGF induit par ailleurs la migration des cellules musculaires lisses, des monocytes, des polynucléophiles (Hoeben, A. *et al.* 2004; Park, J.E. *et al.* 1994) et également la migration et l'invasion de cellules cancéreuses (sein, colon). Les récepteurs VEGF-R1, VEGF-R2 et la NRP-1 sont impliqués dans cet effet biologique (Barleon, B. *et al.* 1996; Dias, S. *et al.* 2000; Grosskreutz, C.L. *et al.* 1999; Price, D.J. *et al.* 2001).

Le VEGF stimule la migration des cellules par la voie de FAK et de PI3K/Akt (Cf. Figure 11 : VEGF et migration). Une étude récente a montré que la protéine adaptatrice Shb se lie à la tyrosine 1175 du VEGF-R2 et régule l'activation de FAK et de la PI3K en réponse

au VEGF (Holmqvist, K. *et al.* 2004). L'activation de la voie p38/MAPK est également impliquée dans la migration (Rousseau, S. *et al.* 1997). Des expériences utilisant des récepteurs mutants montrent que seul le VEGF-R2 est capable d'induire une phosphorylation de la p38 dans les HUVECs, ce qui laisse penser qu'il est le principal médiateur induisant la migration (Gille, H. *et al.* 2001). Cependant, des cellules CHO exprimant le VEGFR-1, mais pas celles exprimant le VEGFR-2, migrent en réponse au VEGF (Jonca, F. *et al.* 1997). Pourtant, l'activation du VEGF-R1 sur des cellules endothéliales d'aortes bovines (BAEC), n'induit pas de migration (Bernatchez, P.N. *et al.* 1999; Gille, H. *et al.* 2001). L'induction de la migration par le VEGF sur des cellules non endothéliales est due au VEGF-R1.

Ainsi, un même récepteur peut activer différentes voies de signalisation, et certains, comme la p38 MAPK, peuvent être impliqués dans plusieurs voies. De plus, le VEGF-R2 est le médiateur principal des effets mitogéniques, angiogéniques et de perméabilité du VEGF.

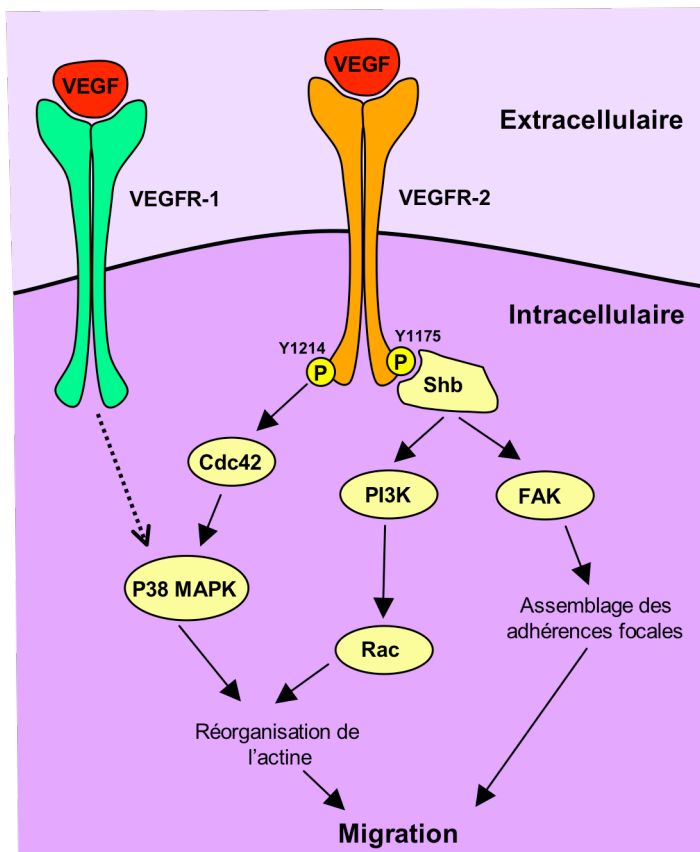


Figure 11 : VEGF et migration

L'autophosphorylation du VEGFR-2 sur la tyrosine 1214 est nécessaire à l'activation de Cdc42 et de p38 MAPK, qui induisent la migration via la réorganisation de l'actine corticale. L'autophosphorylation de la tyrosine 1175 recrute la protéine adaptatrice Shb par son domaine SH2. Cette interaction permet l'activation de FAK (Focal Adhesion Kinase), directement impliqué dans la formation des adhérences focales nécessaires à la migration, mais aussi celle de la PI3K qui va activer Rac. L'activation du VEGFR-1 dans des cellules non endothéliales est également capable de favoriser la migration via la p38 MAPK.

II.3. Le VEGF dans l'angiogenèse tumorale

II.3.1. VEGF et tumeurs

II.3.1.1. Expression

Le VEGF est exprimé par un grand nombre de tumeurs, et son expression est corrélée à la progression tumorale. Ce sont les cellules tumorales adjacentes aux zones nécrotiques qui transcrivent le plus de VEGF (Ferrara, N. *et al.* 1997), ce qui indique que l'induction du VEGF par l'hypoxie dans les tumeurs en croissance peut modifier la balance des inhibiteurs et activateurs de l'angiogenèse et conduire à la formation de nouveaux vaisseaux tumoraux (Takahashi, H. *et al.* 2005).

Des facteurs sécrétés par les tumeurs comme le PDGF, Le FGF, le TNF et l'IL-1, régulent positivement l'expression du gène du VEGF (Ferrara, N. 2004). De plus, des études récentes montrent que certaines lignées cellulaires tumorales expriment le VEGF et ses récepteurs, suggérant que le VEGF peut agir de façon autocrine et paracrine sur les cellules tumorales elles-mêmes (Masood, R. *et al.* 2001). Cet effet autocrine du VEGF est retrouvé dans différents cancers tels que les mélanomes (Cohen, T. *et al.* 1995; Liu, Y. *et al.* 1995), les cellules leucémiques (Dias, S. *et al.* 2000), les carcinomes de prostate (Qi, L. *et al.* 2003), du colon (Bates, R.C. *et al.* 2003), les cancers de la vessie (Wu, W. *et al.* 2003) et le cancer du sein (Bachelder, R.E. *et al.* 2001; Bachelder, R.E. *et al.* 2003; de Jong, J.S. *et al.* 1998; Kranz, A. *et al.* 1999; Price, D.J. *et al.* 2001; Speirs, V. *et al.* 1999).

II.3.1.2. Expression des récepteurs

Le VEGF joue un rôle dans la croissance tumorale notamment en protégeant les néovaisseaux formés de l'apoptose par l'induction de facteurs anti-apoptotiques tels que Bcl-2 (Harmey, J.H. *et al.* 2002) et la survivine (Tran, J. *et al.* 1999).

L'importance du VEGF-R2 dans l'invasion tumorale et les métastases a été montré de façon indirecte par blocage pharmacologique. En effet, son inhibition provoque une stabilisation de la barrière endothéliale et une forte diminution de l'extravasation de cellules tumorales *in vivo* (Weis, S., Cui, J. *et al.* 2004).

Le signal induit par le VEGF-R1 est également impliqué dans les métastases tumorales, en relation avec l'induction de la MMP-9 dans les cellules endothéliales du poumon. De plus, il facilite les métastases poumon-spécifiques (Hiratsuka, S. *et al.* 2002).

Les vaisseaux angiogéniques tumoraux peuvent aussi exprimer le récepteur Flt-4, dont l'expression est normalement restreinte à l'endothélium des vaisseaux lymphatiques chez l'adulte (Dumont, D.J. *et al.* 1998; Valtola, R. *et al.* 1999).

II.3.1.3. Valeur pronostique

Le VEGF est présent dans les tumeurs mammaires à un niveau sept fois supérieur en moyenne que dans le tissu normal adjacent (Yoshiji, H. *et al.* 1996). Le VEGF semble requis pour les étapes initiales de la croissance tumorale mammaire et cet effet initial est lié au développement d'un stroma vasculaire (Yoshiji, H. *et al.* 1997). Une série d'études a montré l'importance du VEGF comme indicateur pronostique de la malignité de cancer du sein (Gasparini, G. *et al.* 1997; Obermair, A. *et al.* 1997). Dans le cancer du sein avec une infiltration abondante de macrophages, ceux-ci fournissent une source supplémentaire de VEGF, en étant notamment stimulés par l'hypoxie (Scott, P.A. *et al.* 1998). Chez les patients atteints d'un cancer du sein métastatique, la surexpression du VEGF conduit à des tumeurs plus volumineuses, indépendantes des hormones, avec mutation de p53 (Rugo, H.S. 2004). Des études quantitatives indiquent que la densité microvasculaire intratumorale est un indicateur pronostique dans les cancers ganglions positifs et négatifs (Gasparini, G. 2000; Gasparini, G. *et al.* 1997; Hlatky, L. *et al.* 2002; Toi, M. *et al.* 1995; Weidner, N. *et al.* 1991). Des études rapportent une augmentation de l'expression du VEGF et du récepteur VEGF-R2 dans les carcinomes mammaires (Kranz, A. *et al.* 1999), alors que l'expression du VEGF-R1 ne semble pas augmenter. De même, il semble que dans ce type de cancer, le nombre de métastases dépend de l'expression du VEGF et du récepteur VEGF-R2, mais pas du récepteur VEGF-R1 (Claffey, K.P. *et al.* 1996).

Cependant, certains articles récents insistent plutôt sur l'absence de valeur pronostique du VEGF (Bolat, F. *et al.* 2006; Kostopoulos, I. *et al.* 2006).

II.3.2. Thérapies anti-angiogéniques ciblant le VEGF

Des essais cliniques de phase III menés sur deux molécules visant le VEGF-R ont démontré leur efficacité en termes de survie sur des patients ayant des cancers métastatiques. Une approche consistant à combiner le bevacizumab, un anticorps dirigé contre le VEGF, à une chimiothérapie standard, a augmenté la survie totale de patients atteints de cancers colorectaux et du poumon ainsi que la survie sans progression de la maladie dans le cas des cancers du sein. Une autre approche utilisant plusieurs inhibiteurs de tyrosine kinases, bloquant le VEGF-R mais aussi d'autres kinases à la fois des cellules endothéliales et

tumorales (e.g. sorafenib, sunitinib), a apporté un bénéfice en termes de survie aux patients atteints de tumeurs gastrointestinales et de carcinomes rénaux.

Les thérapies anti-VEGF ont pour effet de réduire le nombre de vaisseaux tumoraux, et ceci a été observé pour le bevacizumab (Willett, C.G. *et al.* 2005). Ce faisant, ces nouveaux outils peuvent antagoniser la chimio- et la radiothérapie en diminuant la délivrance des molécules thérapeutiques et des radio-sensibilisants. (Jain, R.K. 2005, 2005). Pourtant, thérapies cytotoxiques et anti-angiogéniques ont été combinées avec succès dans un grand nombre d'essais cliniques ou précliniques. Ce paradoxe a été résolu en 2001 en observant que les thérapies anti-VEGF peuvent « normaliser » le système vasculaire des tumeurs (Jain, R.K. 2001), augmentant au moins transitoirement leur perfusion (Winkler, F. *et al.* 2004). Cet effet pourrait expliquer pourquoi le bevacizumab est efficace en combinaison avec une chimiothérapie, alors qu'il ne l'est pas en monothérapie. De nombreuses recherches doivent être menées pour comprendre les mécanismes impliqués et le meilleur moyen de combiner les thérapies disponibles, mais ces succès récents soulèvent de grands espoirs et valident le concept de thérapies visant à asphyxier les tumeurs.

III. La cadhérine de l'endothélium vasculaire : VE-cadhérine

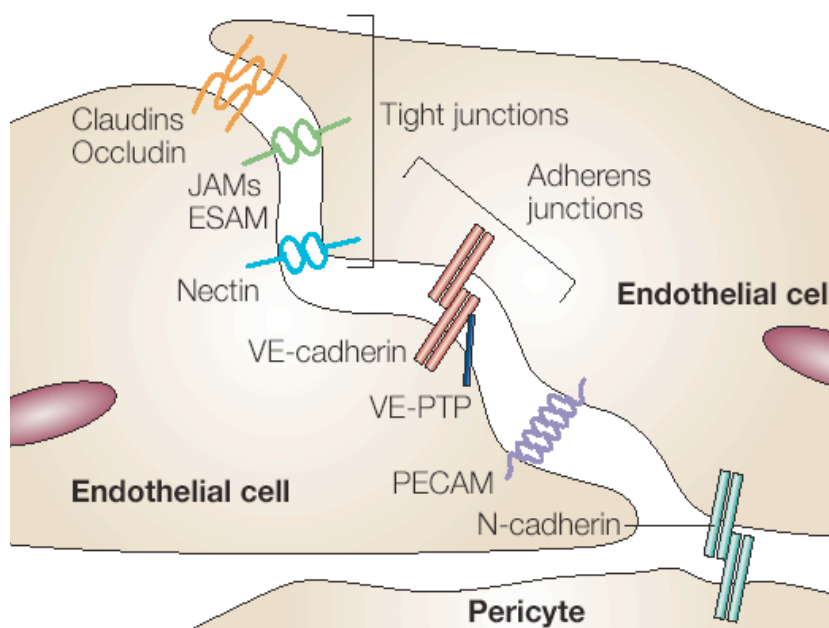
III.1. Les jonctions intercellulaires endothéliales

Les cellules endothéliales adhèrent les unes aux autres par l'intermédiaire de structures jonctionnelles, qui sont formées de protéines transmembranaires responsables de l'adhésion homotypique intercellulaire. Ces protéines transmembranaires lient des partenaires cytoplasmiques spécifiques qui les ancrent au cytosquelette d'actine, stabilisant ainsi la jonction. Les jonctions des cellules endothéliales et des cellules épithéliales partagent certaines caractéristiques. En effet, dans les deux types cellulaires, deux types majeurs de jonctions ont été décrites : les jonctions adhérentes ou *zonula adhaerens*, et les jonctions étanches, appelées également jonctions serrées ou *zonula occludens*. Outre les jonctions adhésives intercellulaires, un autre type de jonctions, les jonctions de communication, permet la communication intercellulaire. Ce type de jonctions est également retrouvé à la fois dans les cellules épithéliales et les cellules endothéliales. Cependant, alors que dans la plupart des épithéliums, les jonctions étanches sont concentrées au pôle apical, dans l'endothélium, elles sont régulièrement entremêlées avec des jonctions adhérentes. De plus, à la différence des

cellules épithéliales, les cellules endothéliales sont dépourvues de desmosomes. Cependant, certains types de cellules endothéliales, comme celles du système lymphatique ou des veines, possèdent des structures proches, appelées *complexus adhaerentes* (Schmelz, M. *et al.* 1993; Schmelz, M. *et al.* 1994), qui contiennent certains des composants des desmosomes (plakoglobine et desmoplakine associées à la VE-cadhérine).

De par leur fonction, les jonctions intercellulaires endothéliales contrôlent différents paramètres de l'homéostasie vasculaire. Ainsi, la perméabilité aux solutés plasmatiques est en bonne partie contrôlée par les jonctions. L'extravasation des leucocytes et leur infiltration au niveau du site inflammatoire requiert une régulation fine de l'ouverture et de la fermeture des contacts intercellulaires. De façon très importante, les protéines jonctionnelles peuvent aussi transférer des signaux intracellulaires capables de moduler aussi bien la croissance que l'apoptose des cellules endothéliales (Lampugnani, M.G. and Dejana, E. 1997).

L'organisation des jonctions endothéliales varie le long de l'arbre vasculaire en fonction des besoins spécifiques des organes. Les jonctions adhérentes sont ubiquitaires dans tous les types de vaisseaux. En revanche, les jonctions étanches montrent plus de variabilité. Ainsi, dans le cerveau, où un contrôle strict de la perméabilité entre le sang et le système nerveux est nécessaire, les jonctions sont très développées, avec une forte proportion de jonctions étanches. À l'inverse, les veinules post-capillaires, qui permettent un trafic dynamique de cellules circulantes et de protéines plasmatiques en possèdent peu. Plusieurs protéines adhésives transmembranaires interviennent dans l'organisation moléculaire des jonctions endothéliales (Cf. Figure 12 : Organisation des jonctions intercellulaires endothéliales). La VE- et la N-cadhérine pour les jonctions adhérentes, l'occludine et les membres de la famille des claudines, ainsi que la famille des protéines JAM pour les jonctions serrées. PECAM-1 ou la S-endo/Muc 18/CD146 ne sont pas des composants des jonctions adhérentes ou serrées, mais elles s'insèrent le long de la zone de contact. La VE-cadhérine, la claudine-5, ou PECAM-1 sont présents uniquement dans les cellules endothéliales et non dans les cellules épithéliales.



D'après Dejana E, Nature Reviews, 2004

Figure 12 : Organisation des jonctions intercellulaires endothéliales

III.2. Généralités sur les cadhérines

III.2.1. La superfamille des cadhérines : fonctions, classification

La régulation des contacts adhésifs entre les cellules joue un rôle crucial dans de nombreux processus morphogénétiques, à la fois durant le développement de nouveaux tissus, mais aussi durant la croissance et le renouvellement des tissus adultes. Les cadhérines constituent une large superfamille de molécules d'adhérence intercellulaires, qui contrôle la séparation des feuillets tissulaires au cours du développement, la formation de frontière entre les différents tissus, la transition d'états histologiques (épithélium versus mésenchyme), la migration de cellules ou de neurites, et la formation de synapses entre les neurones. Les cadhérines développent des interactions homophiles dépendantes du calcium, et sont responsables de l'adhérence cellulaire homotypique. Les types de cadhérines exprimées déterminent la spécificité et les propriétés des interactions cellulaires (Nose, A. *et al.* 1988).

Les membres de cette superfamille sont caractérisés par leur domaine extracellulaire unique constitué de répétitions d'un motif spécifique. Ce motif structural (EC = ectodomaine), d'environ cent dix acides aminés, est répété entre cinq et trente-quatre fois. Il se distingue par de multiples acides aminés spécifiques et par de courtes séquences

peptidiques hautement conservées. Les cadhérines, en raison de leur domaine extracellulaire, peuvent être séparées en sous-groupes (Suzuki, S.T. 1996) :

- La famille des cadhérines classiques :
 - Les cadhérines classiques de type I et II,
 - Les cadhérines des desmosomes (desmocollines et desmoglénines),
 - Les cadhérines avec une partie cytoplasmique très courte ou absente (HPT/LI).
- La famille des cadhérines non classiques ou protocadhérines :
 - Les protocadhérines (pcdhs),
 - Les produits de gènes renfermant des domaines EC (le gène suppresseur de tumeur *fat* de la drosophile, le gène *dachsous*, le proto-oncogène *ret...*).

Le sous-groupe le plus étudié à ce jour, et qui sera abordé brièvement ici, est celui des cadhérines classiques. Presque tous les tissus solides de l'organisme expriment ces cadhérines, qui tirèrent initialement leur nom du tissu qui les exprimait majoritairement. Les séquences peptidiques de ces cadhérines ont permis un classement en deux types (Takeichi, M. 1990; Tanihara, H. *et al.* 1994). Le type I inclut la E-, la M-, la N-, la P- et la R-cadhérine. Les cadhérines de type I partagent toutes une séquence commune de trois acides aminés dans leur domaine EC1, His-Ala-Val (HAV), appelée séquence CAR (cell adhesion recognition), qui est indispensable à l'adhérence intercellulaire (Blaschuk, O.W. *et al.* 1990). Le type II contient les cadhérines -5 à -12. Ces cadhérines de type II, découvertes plus récemment, présentent moins d'homologie dans leur domaine cytoplasmique que les cadhérines de type I. En outre, elles n'ont pas de séquence HAV dans leur domaine extracellulaire, bien qu'elles possèdent un site CAR potentiel contenant une alanine centrale, mais entourée de résidus différents pour chaque sous-famille.

III.2.2. Structure des cadhérines classiques

Les cadhérines classiques sont des protéines transmembranaires de type I qui interagissent avec un grand nombre de protéines cytoplasmiques participant à leurs fonctions. Les cadhérines classiques s'associent en dimères parallèles (*cis*). Leur domaine cytoplasmique d'environ 200 acides aminés, hautement conservé, interagit avec les caténines. L' α -caténine interagit, via la β -caténine, avec la partie distale du domaine cytoplasmique, tandis que la caténine p120 interagit avec une région juxtamembranaire (Yap, A.S. *et al.* 1998). Ces protéines sont universellement présentes dans tous les complexes cadhérines. L' α -caténine permet le lien au cytosquelette d'actine, soit par liaison directe des filaments d'actine (Rimm, D.L. *et al.* 1995), soit indirectement, via d'autres protéines comme la vinculine, l' α -

actinine ou la formine-1. Le domaine extracellulaire des cadhérines classiques contient cinq EC (EC1 à EC5), qui ménagent entre eux des sites de liaison aux ions calcium (Cf. Figure 13 : Le complexe cadhérine-caténine).

III.2.3. Cadhérines classiques et carcinogénèse

Outre leur implication dans les mouvements cellulaires précoces, lors du développement ou lors de la mise en place et du maintien des connexions neuronales, les cadhérines ont un rôle crucial dans la carcinogénèse. En effet, les cellules tumorales sont très souvent caractérisées par des capacités adhésives cellule/cellule ou cellule/matrice faibles. Cette diminution de l'activité adhésive est corrélée à l'invasion tumorale et aux métastases (Cavallaro, U. *et al.* 2001; Conacci-Sorrell, M. *et al.* 2002). Les molécules adhésives les plus impliquées dans la malignité sont les cadhérines et les CAMs.

D'après Gumbiner BM, Nature Reviews, 2005

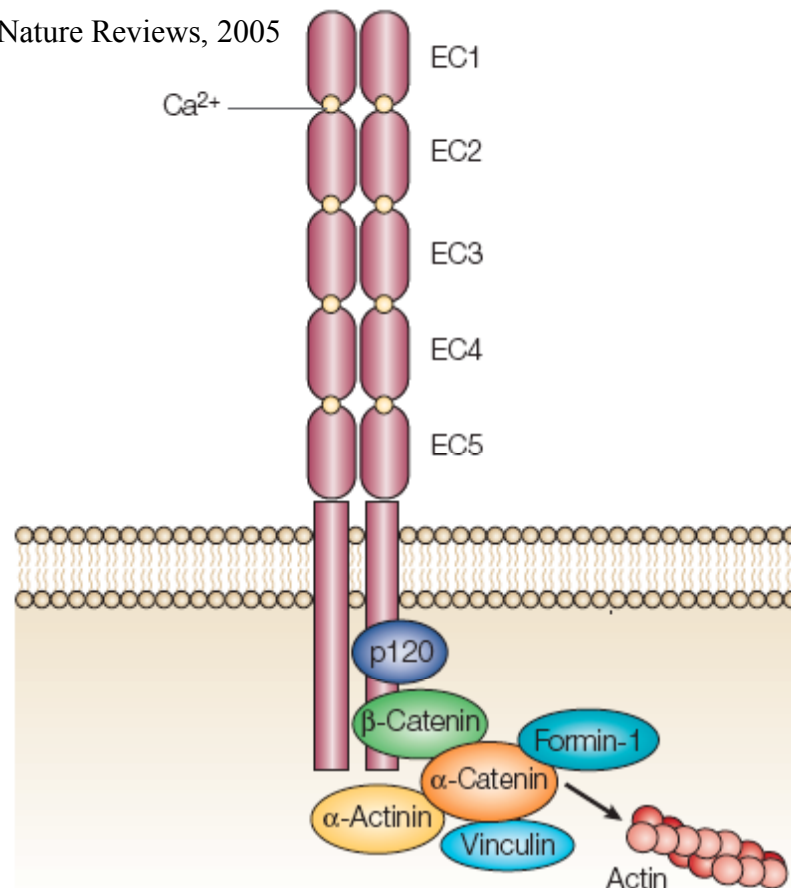


Figure 13 : Le complexe cadhérine-caténine

La perte de E-cadhérine est corrélée à une augmentation de l'invasion tumorale et au nombre de métastases (Beavon, I.R. 2000; Bracke, M.E. *et al.* 1996; Perl, A.K. *et al.* 1998; Vos, C.B. *et al.* 1997). Cette cadhérine est d'ailleurs considérée comme un suppresseur de tumeur (Berx, G. *et al.* 2001; Bremnes, R.M. *et al.* 2002). La P-cadhérine peut être utilisée comme marqueur des carcinomes invasifs de haut grade (Kovacs, A. *et al.* 2003). Parallèlement à cette diminution de E-cadhérine dans les cellules tumorales, la N-cadhérine et les cadhérines -4, -6 et -11 voient leur expression augmenter (Islam, S. *et al.* 1996; Shimazui, T. *et al.* 1996). L'invasion tumorale et les métastases seraient rendues possibles grâce au passage d'un état pro-adhésif avec expression de cadhérines épithéliales (comme la E-cadhérine), à un état pro-migratoire avec expression de cadhérines mésenchymateuses (comme la N-cadhérine et la cadhérine-11) (Cavallaro, U. *et al.* 2001). Dans les cellules de carcinomes rénaux, une corrélation a pu être mise en évidence entre une expression aberrante de cadhérine-6 et un mauvais pronostic (Paul, R. *et al.* 1997).

III.2.4. Les cadhérines de l'endothélium

La VE-cadhérine n'est pas la seule cadhérine exprimée par les cellules endothéliales. En effet, l'expression de P-cadhérine a été détectée par analyse PCR, mais n'a pu être mise en évidence par immunomarquage (Rubin, L.L. 1992).

L'expression de T-cadhérine a également été mise en évidence au niveau des vaisseaux dans des sections de tissus (Ivanov, D. *et al.* 2001).

La N-cadhérine est également exprimée par les cellules endothéliales à un niveau comparable à la VE-cadhérine. Pourtant, en dépit de son niveau d'expression élevé, en présence de VE-cadhérine la N-cadhérine ne se localise pas au niveau des jonctions adhérentes, mais reste distribuée de façon diffuse à la membrane (Navarro, P. *et al.* 1998). Cette particularité ne semble pas due au type cellulaire, mais plutôt à des propriétés intrinsèques à ces deux cadhérines, puisque leur cotransfection dans des cellules CHO (Chinese hamster ovary) entraîne l'exclusion de la N-cadhérine des jonctions. Ces observations suggèrent que VE- et N-cadhérine exercent des fonctions différentes dans les cellules endothéliales. Une hypothèse intéressante propose que la N-cadhérine pourrait promouvoir l'adhésion et la communication des cellules endothéliales avec des cellules mésenchymales exprimant aussi la N-cadhérine, comme les péricytes, les cellules musculaires lisses et les astrocytes. La N-cadhérine est effectivement ségréguée au niveau du pôle basal des cellules endothéliales en contact avec des péricytes et des astrocytes dans le cerveau (Liebner, S. *et al.* 2000). Des données récentes indiquent que la délétion spécifique de

la N-cadhérine dans les cellules endothéliales chez la souris, induit une diminution de l'expression de VE-cadhérine et un phénotype vasculaire sévère, qui ressemble à celui des embryons VE-cadhérine ^{-/-} (Luo, Y. *et al.* 2005). Le mécanisme par lequel la N-cadhérine régulerait l'expression de la VE-cadhérine n'est pas connu. Cependant des expériences *in vitro* sur des cellules endothéliales dépourvues de N-cadhérine confirment que la molécule est responsable de l'adhérence hétérotypique entre cellules endothéliales et péricytes, événement indispensable durant la maturation et la stabilisation des vaisseaux (Tillet, E. *et al.* 2005).

À la recherche d'autres cadhérines exprimées par les cellules endothéliales, Telo et collaborateurs ont réalisé des expériences de PCR à l'aide d'oligonucléotides dégénérés correspondants aux parties constantes des domaines cadhérines (Telo, P. *et al.* 1998). La VE-cadhérine 2 a ainsi été clonée, et s'est avérée être une protocadhérine, la protocadhérine 12.

III.3. Structure, fonctions de la VE-cadhérine

Les jonctions adhérentes, ubiquitaires le long de l'arbre vasculaire, sont présentes à la fois dans les vaisseaux sanguins et lymphatiques. Les cellules endothéliales expriment une cadhérine spécifique, appelé vascular endothelial (VE)-cadhérine. Cette protéine n'est présente dans aucun autre type cellulaire, même dans les cellules sanguines ou les cellules souches hématopoïétiques. Au cours du développement, l'expression de la VE-cadhérine signe l'engagement des cellules dans le lignage endothélial. Cette molécule d'adhérence intercellulaire est présente dans toutes les cellules endothéliales de tous les types de vaisseaux. Il s'agit d'une glycoprotéine transmembranaire de type I de 125 kDa, pour 784 acides aminés.

III.3.1. Structure

La VE-cadhérine est un membre inhabituel de la sous-famille des cadhérines classiques (Dejana, E. *et al.* 1999). En effet, son domaine extracellulaire, composé de cinq domaines EC, ne contient pas de poche hydrophobe constituée par le motif HAV, mais possède à l'extrémité N-terminale deux résidus tryptophane (W2 et W4). De ce fait, la VE-cadhérine est classée dans le sous-groupe des cadhérines classiques de type 2 (Cf. Figure 14 : Représentation schématique des cadhérines classiques de type I et II). De façon intéressante, la VE-cadhérine est une des deux seules cadhérines à ne pas posséder l'alanine centrale dans la région correspondant au site CAR des autres cadhérines.

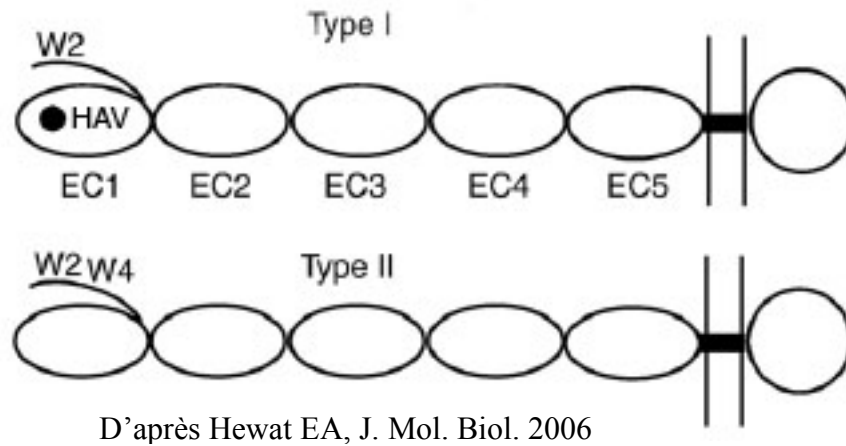


Figure 14 : Représentation schématique des cadhérines classiques de type I et II

La VE-cadhérine contient d'autre part un court segment transmembranaire (27 aa) et un domaine cytoplasmique (163 aa) très homologue à celui des autres cadhérines classiques (Angst, B.D. *et al.* 2001). Par son extrémité C-terminale, le domaine intracellulaire lie la β -caténine et la plakoglobine (γ -caténine). Ces deux protéines se lient à l' α -caténine qui ancre le complexe aux filaments d'actine. D'autre part, la partie juxtamembranaire du domaine cytoplasmique de la VE-cadhérine est capable de lier la caténine p120.

III.3.2. Architecture du lien homophile

Pour élucider les mécanismes de régulation des jonctions adhérentes, il semble nécessaire de mettre à jour l'architecture moléculaire de la liaison homophile. Jusqu'ici, les bases moléculaires de l'association homophile des cadhérines classiques de type I ont été intensément explorées, notamment par des études *in vitro* de fragments protéiques recombinants purifiés. La structure cristalline des domaines extracellulaires de plusieurs cadhérines a ainsi pu être analysé, et de nombreuses études biochimiques et biophysiques ont aidé à mettre en place des modèles de liaison homophiles (Gumbiner, B.M. 2005). Bien que la structure moléculaire et le mécanisme du lien s'établissant entre des cadhérines de type II soient moins bien caractérisés, il semble qu'ils soient similaires à ceux décrits pour les cadhérines de type I. En effet, en dépit d'une faible homologie de séquence (~25%), les cadhérines de type II présentent une forte homologie de structure avec les cadhérines de type I (Patel, S.D. *et al.* 2006). Cependant, les cadhérines de type II possèdent deux résidus tryptophane conservés (W2 et W4), qui sont tous deux nécessaires à l'interaction homotypique entre VE-cadhérine (May, C. *et al.* 2005), suggérant des mécanismes d'interaction différents. Différentes techniques biophysiques ont permis de démontrer que le

domaine extracellulaire de la VE-cadhérine forme des hexamères *in vitro* (Lambert, O. *et al.* 2005). Le groupe de Gulino-Debrac a proposé un modèle consistant en un trimère de dimères (Hewat, E.A. *et al.* 2006). Dans ce modèle, chaque module N-terminal EC1 forme un contact dimérique antiparallèle, tandis que les modules EC4 permettent une interaction trimérique. Par ailleurs, une étude récente de mesure des forces à l'échelle moléculaire unique dans des cellules vivantes, a révélé que les molécules de VE-cadhérine forment des liens moins prompts à la rupture et supportant des forces de tensions plus importantes que les liens formés par les cadhérines de type I N- et E-cadhérine, ainsi qu'une demie vie plus importante (Panorchan, P. *et al.* 2006).

III.3.3. Principaux partenaires, principales fonctions

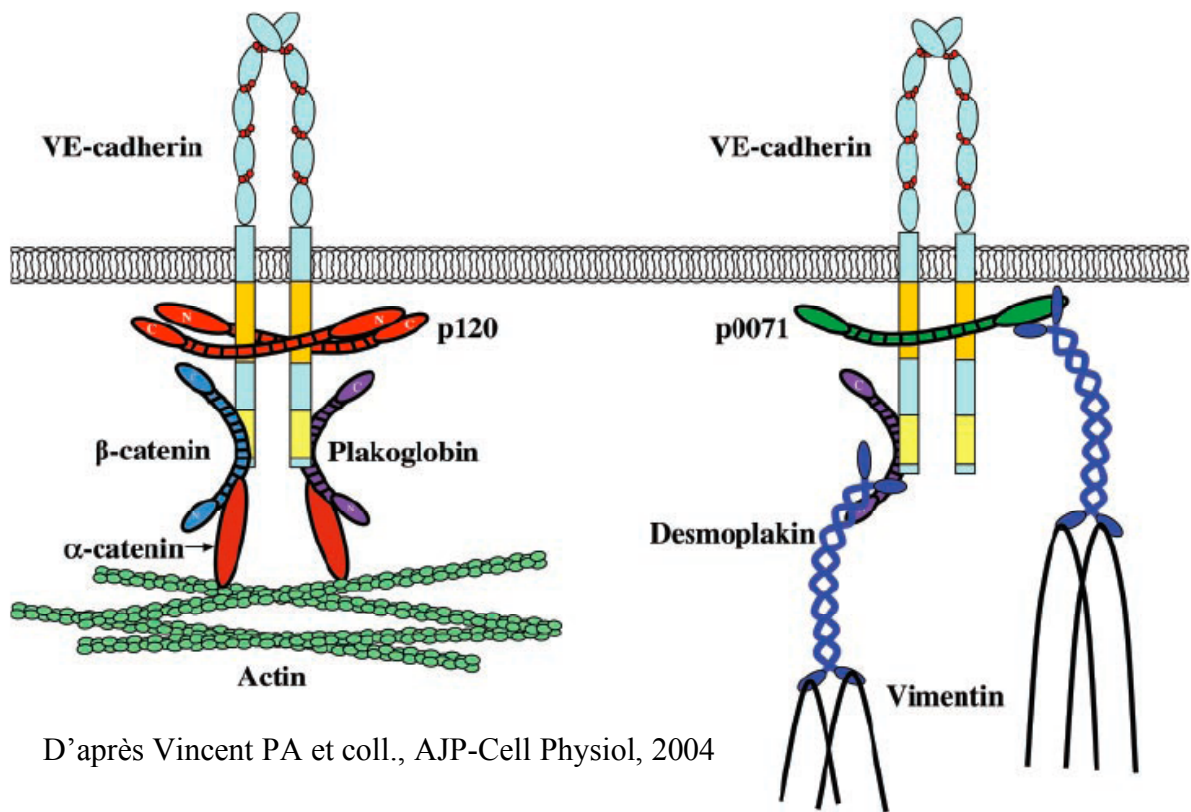
III.3.3.1. Caténines associées

Le domaine cytoplasmique des cadhérines classiques interagit avec des protéines appelées caténines, qui les couplent au cytosquelette d'actine. La VE-cadhérine possède la propriété unique de lier à la fois des protéines partenaires des filaments d'actine et des filaments intermédiaires. Franke et collaborateurs avaient d'ailleurs défini un nouveau type de jonctions intercellulaires retrouvées dans les cellules endothéliales qu'ils appelèrent « complexus adhaerentes » (Schmelz, M. *et al.* 1993; Schmelz, M. *et al.* 1994). Ces jonctions, qui contenaient la protéine desmosomale desmoplakine, ne contenaient pourtant pas de cadhérine desmosomale. Des études ultérieures identifièrent la desmoplakine comme composante clé des jonctions endothéliales. Le rôle de la plakoglobine fut finalement démontré dans le recrutement de la desmoplakine au niveau des jonctions à base de VE-cadhérine (Kowalczyk, A.P. *et al.* 1998). En effet, la plakoglobine interagit avec la VE-cadhérine et l' α -caténine d'une manière similaire à la β -caténine, mais de façon intéressante, la plakoglobine possède également la capacité de recruter la desmoplakine (Kowalczyk, A.P. *et al.* 1998). Plus récemment, il a été démontré que la caténine p0071 possède aussi la capacité de relier la VE-cadhérine à la desmoplakine (Calkins, C.C. *et al.* 2003) (Cf. Figure 15 : Association de la VE-cadhérine aux filaments d'actine et aux filaments intermédiaires). L'importance cruciale du lien entre la VE-cadhérine et le cytosquelette de vimentine a été mise en évidence par l'observation, que des cellules endothéliales dépourvues de desmoplakine ne s'organisent pas convenablement, ce qui engendre une diminution de la densité capillaire (Gallicano, G.I. *et al.* 2001).

Les caténines p120 et p0071 lient le domaine juxtamembranaire de la VE-cadhérine, tandis que la β -caténine et la plakoglobine s'associent à son extrémité carboxy-terminale. Les caténines p120 et p0071 semblent rentrer en compétition pour la liaison du domaine juxtamembranaire, de la même manière que la β -caténine et la plakoglobine pour le domaine carboxy-terminal. La β -caténine fonctionne comme un lien entre la VE-cadhérine et l' α -caténine, cette dernière jouant le rôle clé du couplage au cytosquelette d'actine. Les cinétiques d'assemblage des jonctions endothéliales indiquent que la β -caténine est rapidement intégrée aux jonctions, alors que la plakoglobine (Lampugnani, M.G., Corada, M. *et al.* 1997; Lampugnani, M.G. *et al.* 1995) et la desmoplakine (Valiron, O. *et al.* 1996) sont associées préférentiellement aux jonctions endothéliales matures. Ainsi, l'assemblage de jonctions endothéliales serait initié par la VE-cadhérine et les protéines de liaison à l'actine, tandis que les jonctions matures incorporeraient la plakoglobine et les protéines de liaison à la vimentine, conférant ainsi une résistance mécanique aux jonctions.

III.3.3.2. Fonctions

Les propriétés adhésives de la VE-cadhérine ont été confirmées en transfectant son ADNc dans des cellules CHO, qui acquièrent alors la capacité de former des agrégats (Breviario, F. *et al.* 1995). Les fonctions adhésives intercellulaires de la VE-cadhérine lui confèrent également un rôle crucial dans le contrôle de la perméabilité vasculaire, et la transmigration leucocytaire. En effet, un anticorps monoclonal dirigé contre la VE-cadhérine, administré par voie intraveineuse à une souris, accélère le recrutement des neutrophiles sur les sites d'inflammation (Gotsch, U. *et al.* 1997). Ces anticorps, dirigés contre la partie extracellulaire de la VE-cadhérine, induisent une augmentation de la perméabilité vasculaire en provoquant l'apparition de trous au niveau des jonctions intercellulaires *in vitro* et *in vivo* (Gulino, D. *et al.* 1998). Un marquage immunofluorescent réalisé suite à l'adhérence de neutrophiles sur des cellules endothéliales en culture, révèle que la VE-cadhérine et les caténines qui lui sont associées, disparaissent des contacts cellulaires (Del Maschio, A. *et al.* 1996). Cependant, le rôle exact de la VE-cadhérine dans le processus de diapédèse reste controversé.



D'après Vincent PA et coll., AJP-Cell Physiol, 2004

Figure 15 : Association de la VE-cadhérine aux filaments d'actine et aux filaments intermédiaires

Un des premiers événements nécessaires lors du processus d'angiogenèse est la dissociation des contacts entre cellules endothéliales du vaisseau parent, et la transition de ces cellules d'un état stationnaire quiescent vers un état de migration dynamique. Ainsi, le contrôle de la perméabilité vasculaire, de l'extravasation leucocytaire, aussi bien que la formation et la croissance de nouveaux vaisseaux sanguins sont dépendants de la création et de la dissociation des jonctions entre cellules endothéliales. Les premiers indices suggérant l'implication de la VE-cadhérine dans l'angiogenèse dérivent d'expériences d'angiogenèse *in vitro* utilisant des anticorps bloquants (Matsumura, T. *et al.* 1997). L'importance de la VE-cadhérine dans ce processus a ensuite été démontrée par son invalidation génique. Les cellules endothéliales dépourvues de VE-cadhérine sont toujours capables de former un plexus vasculaire primitif, mais le remodelage vasculaire n'a pas lieu, et les cellules endothéliales tendent à se détacher et les vaisseaux se collapent et régressent, ce qui conduit finalement à une létalité embryonnaire au stade 9,5 jpc (Gory-Faure, S. *et al.* 1999). Une étude plus récente, réalisée sur des cultures d'allantoïdes, conclue que la formation *de novo* de vaisseaux sanguins, jusqu'au point de formation d'un épithélium vasculaire avec une lumière, n'est pas

dépendante de VE-cadhérine ; mais plutôt, la VE-cadhérine, dont l'expression est augmentée après épithélialisation vasculaire, est indispensable pour prévenir le désassemblage des néovaisseaux (Crosby, C.V. *et al.* 2005). Enfin, l'angiogenèse tumorale peut être bloquée grâce à des anticorps dirigés contre la VE-cadhérine, suggérant que son activité est nécessaire à la prolifération vasculaire chez l'adulte (Corada, M. *et al.* 2002; Liao, F. *et al.* 2002).

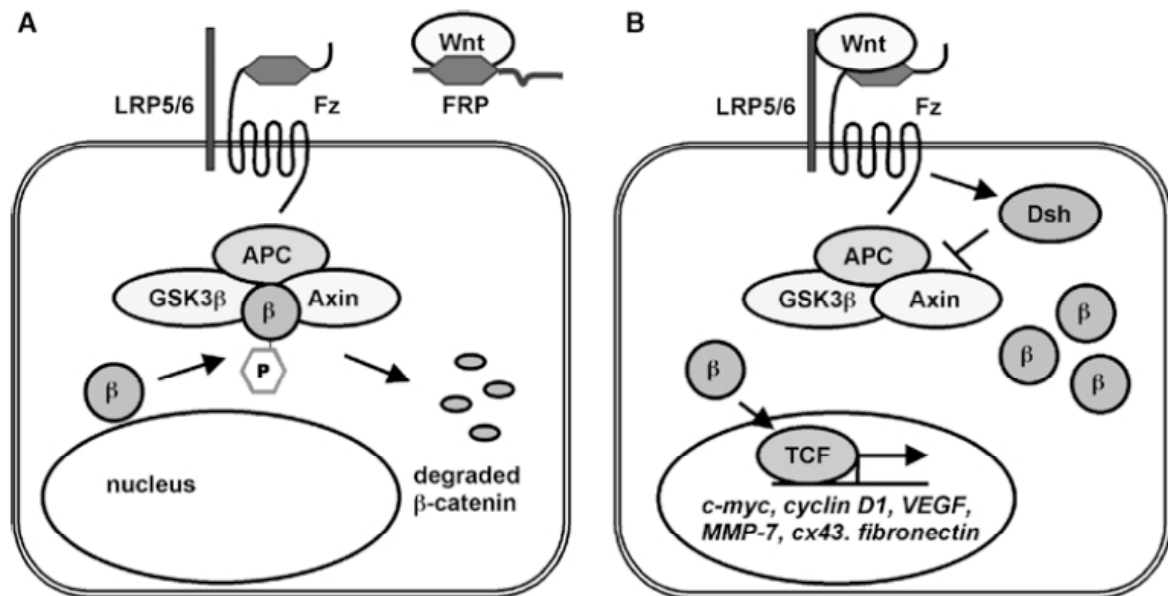
III.4. VE-cadhérine et Signalisation

Les propriétés adhésives de la VE-cadhérine sont certainement cruciales pour le maintien des cellules endothéliales entre-elles, cependant, étant donné le nombre important de molécules d'adhérence intercellulaire que possèdent les cellules endothéliales, une certaine redondance aurait pu être attendue. Ainsi, les effets dramatiques de l'inactivation génique de la VE-cadhérine, suggèrent fortement une implication de la protéine dans la signalisation intracellulaire.

III.4.1. Activité transcriptionnelle des caténines associées à la VE-cadhérine

Une caractéristique essentielle de la β -caténine, de la plakoglobine et de p120, est leur capacité de se délocaliser des jonctions vers le noyau, où, en association avec d'autres facteurs de transcriptions, elles régulent l'expression de gènes cibles. En régulant la disponibilité de caténine libre pour la translocation nucléaire, les cadhérines classiques, incluant la VE-cadhérine, fonctionnent comme des régulateurs de cette signalisation. La β -caténine est un élément clé de la voie de signalisation Wnt. Cette famille de facteurs de croissance et de différenciation joue un rôle crucial au cours du développement embryonnaire. Les Wnts sont des glycoprotéines sécrétées, riches en cystéines et hautement conservées au cours de l'évolution, qui se lient aux récepteurs à sept domaines transmembranaires frizzled (Fz). En l'absence de signal Wnt, la β -caténine cytosolique est phosphorylée sur sérine et thréonine par un complexe protéique contenant la glycogène synthase kinase-3 β (GSK3 β), l'axine et l'adenomatous polyposis coli (APC). Cette β -caténine phosphorylée est rapidement ubiquitinylée et dégradée. La liaison de certains Wnts à leurs récepteurs frizzled, en présence du co-récepteur LDL-receptor-related protein 5 ou 6 (LRP5/6), induit l'activation de dishevelled (Dsh). Dsh inhibe le complexe de phosphorylation contenant la GSK3 β , entraînant ainsi l'accumulation de β -caténine cytosolique, qui peut alors se délocaliser vers le noyau et lier les facteurs de transcription de la famille T-cell factor (TCF)/lymphocyte enhancing factor. Ceci entraîne la transcription de nombreux gènes impliqués dans divers

processus cellulaires, comme la prolifération et la différenciation (Cf. : Figure 16 : La β -caténine dans la voie Wnt).



D'après Goodwin AM et coll., *Angiogenesis*, 2002

Figure 16 : La β -caténine dans la voie Wnt

Au cours du développement embryonnaire humain, quand les vaisseaux prolifèrent, la β -caténine est détectable au niveau, du noyau et du cytosol des cellules de capillaires des villosités placentaires, des capillaires fœtaux (particulièrement ceux du cerveau), ainsi que dans les artères et les veines (Eberhart, C.G. *et al.* 2001; Eberhart, C.G. *et al.* 2000). Dans les cellules endothéliales normales chez l'adulte, la β -caténine n'est détectable ni dans le noyau ni dans le cytoplasme. À l'inverse, elle est fréquemment observée dans le cytoplasme et le noyau de cellules vasculaires au cours de l'angiogenèse et du remodelage vasculaire pathologique (Blankestijn, W.M. *et al.* 2000). Il existe par ailleurs une corrélation entre les cellules endothéliales accumulant la β -caténine et celles qui incorporent le BrdU, ce qui relie l'accumulation de β -caténine à un état prolifératif. L'accumulation de β -caténine joue également un rôle important dans la régulation de la prolifération des cellules musculaires lisses des vaisseaux (Wang, X. *et al.* 2002).

L'inactivation conditionnelle du gène de la β -caténine dans les cellules endothéliales de souris entraîne une altération de la morphologie des vaisseaux, un accroissement de la perméabilité vasculaire et des défauts des valves cardiaques, et finalement résulte en une létalité embryonnaire en milieu de gestation (Cattellino, A. *et al.* 2003; Liebner, S. *et al.*

2004). Dans les cellules endothéliales dépourvues de β -caténine, la plakoglobine s'y substitue pour la liaison de la VE-cadhérine. Or, à la différence de la β -caténine, la plakoglobine peut lier à la fois les complexes d' α -caténine/actine et desmoplakine/vimentine. Conséquemment, α -caténine et la desmoplakine rentrent en compétition pour lier la plakoglobine, ce qui résulte en une forte diminution du lien de la VE-cadhérine avec le cytosquelette d'actine, au profit d'un lien plus fort avec le cytosquelette de vimentine (Cattelino, A. *et al.* 2003). Pourtant, les nombreuses hémorragies expliquant partiellement le phénotype létal, indiquent que la plakoglobine seule ne suffit pas à pallier l'absence de β -caténine pour la régulation de la perméabilité vasculaire. D'un autre côté, les cellules endothéliales dépourvues de desmoplakine révèlent des défauts dans la formation de tubes vasculaires *in vitro* et *in vivo* (Gallicano, G.I. *et al.* 2001; Zhou, X. *et al.* 2004).

L'ensemble de ces éléments suggère que la régulation physiologique des jonctions adhérentes endothéliales dépend, d'une part d'un équilibre subtil entre la VE-cadhérine liée à la β -caténine et celle liée à la plakoglobine ; et d'autre part d'un équilibre entre la forme séquestrée et la forme active de la β -caténine. Il serait important de déterminer les mécanismes moléculaires permettant à la β -caténine de se désengager de sa liaison avec les cadhérines. Des éléments de réponse sont décrits pour la E-cadhérine. La phosphorylation sur tyrosine de la β -caténine (ie Tyr-654) est un mécanisme potentiel, puisqu'elle divise par six l'affinité de la β -caténine pour la E-cadhérine (Huber, A.H. *et al.* 2001; Roura, S. *et al.* 1999). Inversement, la phosphorylation de certaines sérines du domaine cytoplasmique de la E-cadhérine, à la fois par la caséine kinase II et la GSK-3 β , favorise l'interaction β -caténine/ E-cadhérine (Lickert, H. *et al.* 2000).

De façon intéressante, p120 a aussi la capacité de se délocaliser dans le noyau et de participer à la régulation des gènes sous contrôle β -caténine/Lef/TCF (Anastasiadis, P.Z. *et al.* 2000). Pour ce faire, p120 interagit directement avec le répresseur transcriptionnel Kaiso (Kim, S.W. *et al.* 2002; Park, J.I. *et al.* 2005). L'activation de la cascade de signalisation Wnt induit le relargage de Kaiso par p120, et celui de Groucho par la β -caténine, aboutissant à la transcription des gènes cibles. Il a également été rapporté que la plakoglobine peut se lier aux facteurs de transcription Tcf/LEF, mais au niveau d'un autre site que la β -caténine (Miravet, S. *et al.* 2002).

III.4.2. Rôle de la VE-cadhérine dans l'inhibition de contact

Chez l'adulte, les cellules endothéliales sont dans un état physiologique similaire à celui qu'elles ont en culture *in vitro* à confluence (Dejana, E. 2004). Dans ces conditions, les cellules cessent de proliférer, sont résistantes à l'apoptose et contrôlent parfaitement la perméabilité paracellulaire. Inversement, quand les cellules endothéliales prolifèrent, comme c'est le cas au cours de l'angiogenèse, leur état physiologique présente un certain degré d'homologie avec celui de cultures où les cellules seraient éparses ou subconfluentes. Les cellules endothéliales se comportent alors de façon similaire aux fibroblastes ou à d'autres cellules mésenchymateuses, adoptant une morphologie élongée, une mobilité importante et une sensibilité aux facteurs de croissance. Quand ces cellules atteignent la confluence et que leurs jonctions s'organisent, elles perdent leur capacité de réponse aux facteurs de croissance et deviennent quiescentes. Ces observations suggèrent un rôle des jonctions intercellulaires dans le maintien des cellules endothéliales dans un état non prolifératif. Ceci est d'ailleurs confirmé par le fait qu'après un dommage vasculaire avec rupture des contacts intercellulaires, les cellules endothéliales ré-acquièrent leur capacité proliférative en réponse aux facteurs de croissance, et migrent à travers la surface lésée. Le rôle de la VE-cadhérine dans l'inhibition de contact est maintenant communément admis. D'une part, la division de cellules endothéliales est inhibée quand les cellules sont ensemencées sur un support sur lequel a été greffé le domaine extracellulaire de la VE-cadhérine (Caveda, L. *et al.* 1996), indiquant que l'engagement de la VE-cadhérine limite la prolifération. D'autre part, les cellules endothéliales invalidées pour le gène de VE-cadhérine, perdent cette inhibition de contact et atteignent des densités plus élevées que celles possédant le gène (Grazia Lampugnani, M. *et al.* 2003).

Plusieurs voies de signalisation ont été identifiées et expliquent cette inhibition de croissance sous contrôle de la VE-cadhérine :

III.4.2.1. Séquestration de la β -caténine aux jonctions

Comme décrit dans le chapitre précédent (Cf. III.4.1), la β -caténine peut se délocaliser vers le noyau et activer un certain nombre de gènes dont la cyclin D1 et myc qui induisent l'entrée dans le cycle cellulaire. Le maintien de la β -caténine aux jonctions, par la VE-cadhérine, préviendrait ainsi la transcription des gènes impliqués dans la division cellulaire et pourrait expliquer le rôle de la VE-cadhérine dans l'inhibition de contact. Une étude a d'ailleurs exploité cette propriété en sur-exprimant le domaine cytoplasmique de la VE-

cadhérine dans des cellules tumorales, pour bloquer avec succès l'activité transcriptionnelle de la β -caténine et tuer spécifiquement ces cellules (Pierce, M. *et al.* 2003).

III.4.2.2. Déphosphorylation du VEGF-R2 par Dep-1

Les molécules d'adhérence de différentes classes et fonction, incluant les cadhérines, ont la capacité d'induire ou de moduler les voies de signalisation classiques en s'associant et en activant les récepteurs à activité tyrosine kinase (RTKs). À l'inverse, de nombreux RTKs utilisent les molécules d'adhérence cellulaire comme substrat, modulant ainsi leurs fonctions (Cavallaro, U. *et al.* 2004). Ces modulations ajoutent un niveau de complexité dans le domaine de la transduction du signal.

Dans le cas de la VE-cadhérine, quand les cellules endothéliales sont stimulées par le VEGF, le VEGF-R2 s'associe au complexe VE-cadhérine/ β -caténine. Bien que les bases moléculaires de cette interaction restent à caractériser, il semble que la liaison de la β -caténine à la VE-cadhérine soit indispensable. En effet, dans des cellules endothéliales exprimant une forme tronquée de la VE-cadhérine, incapable de lier la β -caténine, le VEGF-R2 ne peut plus se lier au complexe (Grazia Lampugnani, M. *et al.* 2003). En conséquence de cette association, la phosphorylation sur tyrosine du VEGF-R2 se trouve fortement diminuée, et ceci s'accompagne d'une inhibition de l'activation des MAP kinases et de la prolifération cellulaire. Le VEGF-R2 pourrait être déphosphorylé par la phosphatase Dep-1, elle-même associée à la VE-cadhérine probablement par l'intermédiaire de p120 et de la β -caténine. Récemment, le mécanisme par lequel la VE-cadhérine inhibe le VEGF-R2 a été approfondi (Lampugnani, M.G. *et al.* 2006). Les auteurs montrent que le VEGF induit l'internalisation du VEGF-R2 dans des vésicules de clathrin. Cette internalisation n'aboutit pas à la dégradation du récepteur et l'arrêt du signal. Au contraire, le récepteur phosphorylé maintient, depuis les endosomes, la voie de signalisation active. Quand la VE-cadhérine est absente ou n'est pas engagée dans des jonctions adhérentes, le VEGF-R2 est internalisé plus rapidement et séjourne dans le compartiment endosomal plus longtemps. L'inhibition de l'expression de Dep-1, par interférence ARN, restaure l'internalisation et la signalisation du VEGF-R2. De façon intrigante, l'activation de la PI3K par le VEGF-R2 n'est pas inhibée par l'association de la VE-cadhérine. Ceci suggère que la déphosphorylation par Dep-1 intervient sur des résidus tyrosine spécifiques, épargnant les tyrosines impliquées dans l'activation de la PI3K et AKT/PKB. Il en résulte que la prolifération cellulaire est inhibée, tandis que les signaux anti-apoptotiques restent actifs. À l'inverse, lorsque les cellules sont éparpillées et les jonctions désorganisées, le VEGF-R2 active la prolifération tandis que les fonctions anti-apoptotiques

du récepteur sont fortement réduites. L'ensemble de ces éléments met en exergue le fait qu'un même RTK, dans les mêmes cellules, peut en réponse au même facteur de croissance, activer des voies de signalisation différentes selon la densité cellulaire.

III.4.2.3. Inhibition dépendante de Shc

Le VEGF induit l'association de la VE-cadhérine avec la protéine adaptatrice Shc, qui est connue pour activer la voie des MAP kinases. Dans des cellules endothéliales dépourvues de VE-cadhérine, la phosphorylation de Shc est maintenue après stimulation par le VEGF, alors qu'en présence de VE-cadhérine une déphosphorylation intervient rapidement, probablement par l'action de phosphatases jonctionnelles (Zanetti, A. *et al.* 2002). La forme phosphorylée de Shc est capable de coupler Grb2-Sos à Ras, qui conduit finalement à l'activation de MAPK (Pelicci, G. *et al.* 1992). Étant donné ce rôle de Shc, sa liaison au niveau des jonctions par la VE-cadhérine et sa déphosphorylation subséquente, pourrait inhiber l'action proliférative du VEGF.

III.4.2.4. Inhibition dépendante de Csk

La protéine tyrosine-kinase (PTK) Csk (C-terminal Src kinase) est un régulateur négatif des SFKs, qui inactive ces enzymes en phosphorylant leur tyrosine inhibitrice et en imposant la conformation verrouillée (Cf. Figure 18 : Mode d'activation de la tyrosine kinase Src). Chez la souris, l'invalidation génique de Csk engendre une létalité embryonnaire (Imamoto, A. *et al.* 1993). L'analyse d'embryons chimériques contenant des cellules WT et Csk^{-/-} a mis en évidence des défauts dans le bourgeonnement angiogénique et le remodelage vasculaire (Duan, L.J. *et al.* 2004). Une étude récente a montré que Csk (C-terminal Src kinase) se lie à la tyrosine 685 phosphorylée du domaine cytoplasmique de la VE-cadhérine (Baumeister, U. *et al.* 2005). Les auteurs montrent que cette association est dépendante de la densité cellulaire. En outre, l'inhibition de contact dans des CHO transfectées par la VE-cadhérine requiert la tyrosine 685. Finalement, l'inhibition de l'expression de Csk dans des cellules endothéliales humaines par interférence ARN augmente la prolifération cellulaire. Il semble donc que la VE-cadhérine induise une inhibition de contact en inhibant les kinases de la famille Src par le recrutement de Csk.

III.4.3. Implication de la VE-cadhérine dans la survie cellulaire

Dans des conditions de culture *in vitro*, lorsque les cellules endothéliales sont quiescentes, elles présentent une forte résistance aux stimuli nocifs, comme la privation de

sérum (Dejana, E. *et al.* 1995). Ceci est en accord avec l'observation que ces cellules, *in vivo* dans des conditions physiologiques normales, présentent un temps de renouvellement de plus de mille jours.

De façon similaire à d'autres membres de la famille des cadhérines, la VE-cadhérine protège les cellules endothéliales de l'apoptose induite par la déprivation en sérum. En effet, dans ces cellules, l'activation de la PI3K par le VEGF-R2 est favorisée par la VE-cadhérine (Carmeliet, P. *et al.* 1999). Par contre, dans des cellules VE-cadhérine^{-/-}, ou exprimant une VE-cadhérine tronquée de 80 acides aminés dans le domaine de liaison à la β -caténine, la formation du complexe VE-cadhérine, β -caténine, PI3K, VEGF-R2 n'a pas lieu. En conséquence, le VEGF-A ne transmet plus les signaux de survie vers la serine/thréonine kinase Akt et n'augmente plus l'expression de la protéine antiapoptotique Bcl2 (Carmeliet, P. *et al.* 1999).

En outre, la VE-cadhérine induit l'expression de Gas1 (growth arrest-specific 1). Cette protéine n'inhibe pas significativement la croissance cellulaire, mais protège efficacement les cellules contre l'apoptose (Spagnuolo, R. *et al.* 2004). L'inhibition de l'expression de Gas 1 par interférence ARN rend les cellules endothéliales réfractaires à l'effet anti-apoptotique du VEGF. De façon intéressante, des anticorps bloquant dirigés contre la VE-cadhérine inhibent l'expression de Gas 1 en réponse au VEGF. Ceci suggère que l'assemblage de la VE-cadhérine aux jonctions est nécessaire à l'induction Gas 1 (Spagnuolo, R. *et al.* 2004).

Ainsi, la VE-cadhérine protège les cellules contre l'apoptose en formant un complexe avec le VEGF-R2 qui permet d'une part l'activation de la PI3K et d'autre part l'expression de Gas 1. Il est intéressant de remarquer que l'association de la VE-cadhérine au VEGF-R2 inhibe la capacité du récepteur à induire la prolifération, mais augmente son activité anti-apoptotique. Ceci indique que la VE-cadhérine est capable de diriger la signalisation du VEGF-R2 vers des voies spécifiques tout en inhibant certaines autres.

III.4.4. VE-cadhérine et réponse aux forces hémodynamiques

Une caractéristique spécifique des cellules endothéliales est d'être perpétuellement exposées au flux sanguin. Les forces hémodynamiques provoquent une réponse complexe des cellules endothéliales, comprenant la répression ou la surexpression de certains gènes, et cela semble nécessaire à la restructuration chronique des vaisseaux sanguins, au développement cardiaque ou à l'athérogenèse. Les modifications de l'organisation du cytosquelette et de la forme des cellules sont parmi les plus rapides et les plus marquées. La manière dont les

cellules endothéliales transduisent ces forces mécaniques en réponses biologiques est actuellement une question cruciale.

Le rôle de la VE-cadhérine dans la résistance aux forces hémodynamiques a été mis en évidence dans des cultures cellulaires soumises à un flux. La résistance au stress des jonctions endothéliales est dépendante de la VE-cadhérine, et plus particulièrement de sa liaison à la plakoglobine (Schnittler, H.J. *et al.* 1997). PECAM-1 ne semble pas suffisant pour assurer l'intégrité d'une monocouche de cellules soumises à un flux. Plusieurs protéines membranaires ont été impliquées comme mécanosenseurs, mais plus récemment, il a été rapporté un rôle de la VE-cadhérine et de PECAM dans ces cellules exposées à un flux. Sous l'influence d'un stress hémodynamique, une rapide relocalisation vers le noyau du VEGF-R2 a été mise en évidence. De même, dans ces conditions, le récepteur s'associe à la VE-cadhérine en l'absence de VEGF (Shay-Salit, A. *et al.* 2002). En l'absence de VE-cadhérine, le stress n'induit plus la translocation nucléaire du VEGF-R2, ni la transcription d'un gène rapporteur sous contrôle d'un promoteur répondant au stress hémodynamique (Shay-Salit, A. *et al.* 2002). PECAM est rapidement phosphorylé en réponse aux forces de cisaillements, lie SHP2 et active la voie ERK/MAPK (Osawa, M. *et al.* 2002). Une étude très récente montre que PECAM, VEGF-R2 et VE-cadhérine forment un complexe mécanosenseur (Tzima, E. *et al.* 2005). Ensemble, ces récepteurs sont suffisants pour permettre une réponse au flux à des cellules hétérologues, et participer *in vivo* aux événements précoces de l'athérogenèse.

III.4.5. VE-cadhérine et protéines G

Parmi les protéines jonctionnelles, les cadhérines sont de bons candidats comme médiateurs des changements d'organisation du cytosquelette, observés au cours de la transition épithélio-mésenchymateuse. La perte d'expression des cadhérines est un phénomène fréquemment observé dans la transformation néoplasique et corrélé à la dé-différentiation et l'acquisition de propriétés invasives (Yap, A.S. 1998). Cependant, les mécanismes par lesquels les cadhérines influencent l'organisation du cytosquelette et la morphologie cellulaire restent mal connus. Des cellules endothéliales dépourvues de VE-cadhérine adoptent une morphologie fibroblastoïde. La transfection de cette lignée cellulaire par la VE-cadhérine est suffisante pour rétablir un bon étalement des cellules et une morphologie endothéliale (Lampugnani, M.G. *et al.* 2002).

L'engagement des cadhérines classiques induit l'activation des GTPases de la famille Rho (Fukata, M. *et al.* 2001; Wheelock, M.J. *et al.* 2003). Étant donné que la VE-cadhérine est liée au cytosquelette d'actine et que les GTPases de la famille Rho régulent l'organisation

de l'actine, l'engagement de la liaison homophile pourrait moduler l'architecture de ce cytosquelette. De fait, plusieurs études ont rapporté un rôle des petites protéines G dans la régulation de la barrière endothéliale.

III.4.5.1. Rôles opposés de Rac et Rho

L'activité de la GTPase Rac est souvent associée au renforcement de la stabilité des jonctions endothéliales. En effet, son inhibition dans des cellules endothéliales provoque l'ouverture des jonctions adhérentes et réduit l'adhérence, à la surface des cellules, de microbilles enduites de VE-cadhérine (Waschke, J., Baumgartner, W. *et al.* 2004). La protéine Rac semble donc nécessaire au maintien de la barrière endothéliale et elle agit en modulant la polymérisation des filaments d'actine ou en couplant directement la VE-cadhérine au cytosquelette (Waschke, J., Drenckhahn, D., Adamson, R.H. and Curry, F.E. 2004).

Une étude récente montre que l'hypoxie aiguë inhibe transitoirement Rac1, ce qui conduit à l'activation de RhoA, à la formation de fibres de stress et finalement à la dissociation des jonctions adhérentes et à l'augmentation de la perméabilité endothéliale (Wojciak-Stothard, B. *et al.* 2005). À l'inverse, la réoxygénation active fortement Rac1 et restaure la localisation corticale de l'actine-F et de la VE-cadhérine en inhibant RhoA.

Les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins matures sont normalement séparées des collagènes interstitiels par une lame basale continue constituée de laminines. Or la laminine-1 est capable d'induire une activation persistante de Rac associée à une stabilité endothéliale (Liu, Y. *et al.* 2004). À l'inverse, le collagène I, auquel sont exposées les cellules des capillaires en croissance, provoque une ouverture des jonctions adhérentes et une morphogenèse capillaire associée et dépendante de l'activation de Rho (Liu, Y. *et al.* 2004).

De façon intrigante, une étude récente rapporte l'activation de Rac1 dans des HUVECs et l'augmentation transitoire de la fonction de barrière endothéliale suite à l'action du VEGF et du pervanadate de sodium (Seebach, J. *et al.* 2005). L'expression d'un dominant négatif de Rac1 abolit cet effet transitoire d'augmentation de l'étanchéité, tandis que l'effet plus durable et bien établi, d'augmentation de la perméabilité de ces deux agents, n'est pas affecté.

S'il est démontré que Rac et Rho ont une influence sur la fonction adhésive de la VE-cadhérine, la réciproque l'est également. En effet, l'expression de la VE-cadhérine augmente le niveau d'activation de Rac, en augmentant l'expression de son facteur d'échange de guanosine spécifique Tiam-1 ; et diminue celui de Rho (Lampugnani, M.G. *et al.* 2002). De

plus, la VE-cadhérine augmente les quantités de Tiam-1, de Rac et de son effecteur PAK (p-21 activated kinase) associées à la fraction membranaire. La VE-cadhérine démunie de son domaine de liaison à p120 ou à la β -caténine n'a plus ces propriétés. Ainsi, dans les cellules endothéliales quiescentes, la VE-cadhérine pourrait, en modulant l'activité des petites protéines G, influencer via le cytosquelette d'actine, l'étalement cellulaire et l'adhérence au substrat.

Tous ces éléments suggèrent donc que Rac et Rho jouent des rôles opposés dans la régulation des jonctions adhérentes. Rac est toujours associé à la stabilisation de la barrière endothéliale, tandis que Rho, impliqué dans la formation des fibres de stress, augmente la perméabilité. Il semble que la VE-cadhérine régule en retour l'activité de RhoA pour permettre, via le cytosquelette, une signalisation vers les protéines d'adhérence cellule-matrice (Nelson, C.M. *et al.* 2004). Suite aux contacts intercellulaires, cette signalisation permettrait d'inhiber l'étalement des cellules endothéliales.

Toutefois, en contradiction avec les nombreuses études mettant en évidence le rôle de Rac dans le maintien de la barrière endothéliale (Liu, Y. *et al.* 2004; Waschke, J., Baumgartner, W. *et al.* 2004; Waschke, J., Drenckhahn, D., Adamson, R.H., Barth, H. *et al.* 2004; Waschke, J., Drenckhahn, D., Adamson, R.H. and Curry, F.E. 2004; Wojciak-Stothard, B. *et al.* 2005), van Wetering et coll. rapportent qu'une forme constitutivement active de Rac provoque une ouverture rapide des jonctions adhérentes dans les HUVECs, dépendante de la production de ROS (reactive oxygen species) (van Wetering, S. *et al.* 2002). Le même groupe a démontré que la tyrosine kinase Pyk2, en phosphorylant la β -caténine, est impliquée dans l'ouverture des jonctions endothéliales induite par l'activation de Rac et la production de ROS (van Buul, J.D. *et al.* 2005). Plus récemment, une étude a mis en évidence le rôle de Rac dans l'endocytose de la VE-cadhérine, et donc dans l'ouverture des jonctions, sous l'action du VEGF (Gavard, J. *et al.* 2006). En effet, le facteur de croissance provoque l'activation du facteur d'échange Vav2 via la tyrosine kinase Src. Vav2 active Rac qui va agir par l'intermédiaire de la kinase PAK. Cette kinase va phosphoryler la sérine 665 du domaine cytoplasmique de la VE-cadhérine, ce qui conduit au recrutement de la β -arrestine2 qui va alors provoquer l'endocytose de la VE-cadhérine (Cf. Figure 8 : VEGF et perméabilité).

L'ensemble de ces résultats montre que Rac est impliqué dans plusieurs voies de signalisations aboutissant tantôt à renforcer la barrière endothéliale, tantôt à la fragiliser.

III.4.5.2. Rôle de Cdc42

La GTPase Cdc42 est également impliquée dans la régulation de la VE-cadhérine. En effet, un dominant négatif de cette protéine atténue fortement la reformation des jonctions endothéliales, *in vivo* et *in vitro*, suite à un stimulus inflammatoire comme la thrombine (Kouklis, P. *et al.* 2004). La même équipe a finalement démontré que Cdc42 régule les jonctions adhérentes en contrôlant la liaison de l' α -caténine au complexe β -caténine/VE-cadhérine (Broman, M.T. *et al.* 2006).

De façon remarquable, la VE-cadhérine non jonctionnelle est capable d'induire, par son domaine cytoplasmique, la formation de protrusions membranaires de plus de 70 μm de longueur (Kouklis, P. *et al.* 2003). L'activation de Cdc42, induite par le domaine cytoplasmique de la VE-cadhérine, est nécessaire à la formation de ces protrusions. L'activation de Cdc42 ne requiert pas l'association de la β -caténine à la VE-cadhérine, mais cette association est nécessaire à la formation subséquente des protrusions. Ainsi, Cdc42, par un phénomène de signalisation « inside out » qui met en jeu la polymérisation du cytosquelette d'actine, contrôle l'activité protrusive de la VE-cadhérine. Ce mécanisme, ainsi que la capacité que possède la VE-cadhérine à développer des interactions hétérophiles avec la fibrine (Martinez, J. *et al.* 2001), pourrait jouer un rôle majeur au cours de la morphogenèse capillaire.

III.4.5.3. Rôle de Rap1

L'AMP cyclique (AMPc) est un second messager qui agit en aval de récepteurs couplés aux protéines G et qui a pour effet d'augmenter la fonction de barrière endothéliale (Stelzner, T.J. *et al.* 1989). En effet, les agonistes de ces récepteurs comme la prostacycline ou la prostaglandine réduisent l'hyperperméabilité endothéliale induite par des stimuli inflammatoires (Farmer, P.J. *et al.* 2001). Une étude récente a mis en évidence le rôle de Rap1, qui appartient aux GTPases de la famille Ras, dans ce processus (Fukuhara, S. *et al.* 2005). Les agonistes des récepteurs couplés aux protéines G restreignent la perméabilité endothéliale en élevant le niveau d'AMPc. L'augmentation de l'AMPc intracellulaire va permettre l'activation du facteur d'échange Epac, qui est un activateur spécifique de Rap1.

L'activation de Epac ou de Rap1 diminue la perméabilité en favorisant les contacts à base de VE-cadhérine, tandis que leur inhibition produit l'effet inverse (Kooistra, M.R. *et al.* 2005). Cependant l'effecteur de cette signalisation n'a pas encore été identifié. Une autre étude rapporte que l'engagement homophilique de la VE-cadhérine est suffisant pour activer Rap1 (Sakurai, A. *et al.* 2006). Cette deuxième voie de signalisation qui aboutit à l'activation

de Rap1 fait intervenir la protéine adaptatrice MAGI-1. Cette protéine, probablement recrutée aux jonctions par la β -caténine, est associée au facteur d'échange PDZ-GEF1, qui est un activateur de Rap1. Ainsi, l'activation de Rap1 induite par contact intercellulaire via MAGI-1-PDZ-GEF1, accélère également l'assemblage des jonctions à base de VE-cadhérine.

Ces résultats suggèrent que les voies de signalisation cAMP-Epac-Rap1 ou MAGI-1-PDZ-GEF1-Rap1 modulent l'affinité et/ou l'avidité de la VE-cadhérine par un phénomène de signalisation « inside out » qui pourrait faire intervenir le réarrangement cortical d'actine (Fukuhara, S. *et al.* 2005; Fukuhara, S. *et al.* 2006; Sakurai, A. *et al.* 2006) (Cf. Figure 17 : Voies d'activation de Rap1 et stabilisation de la barrière endothéliale).

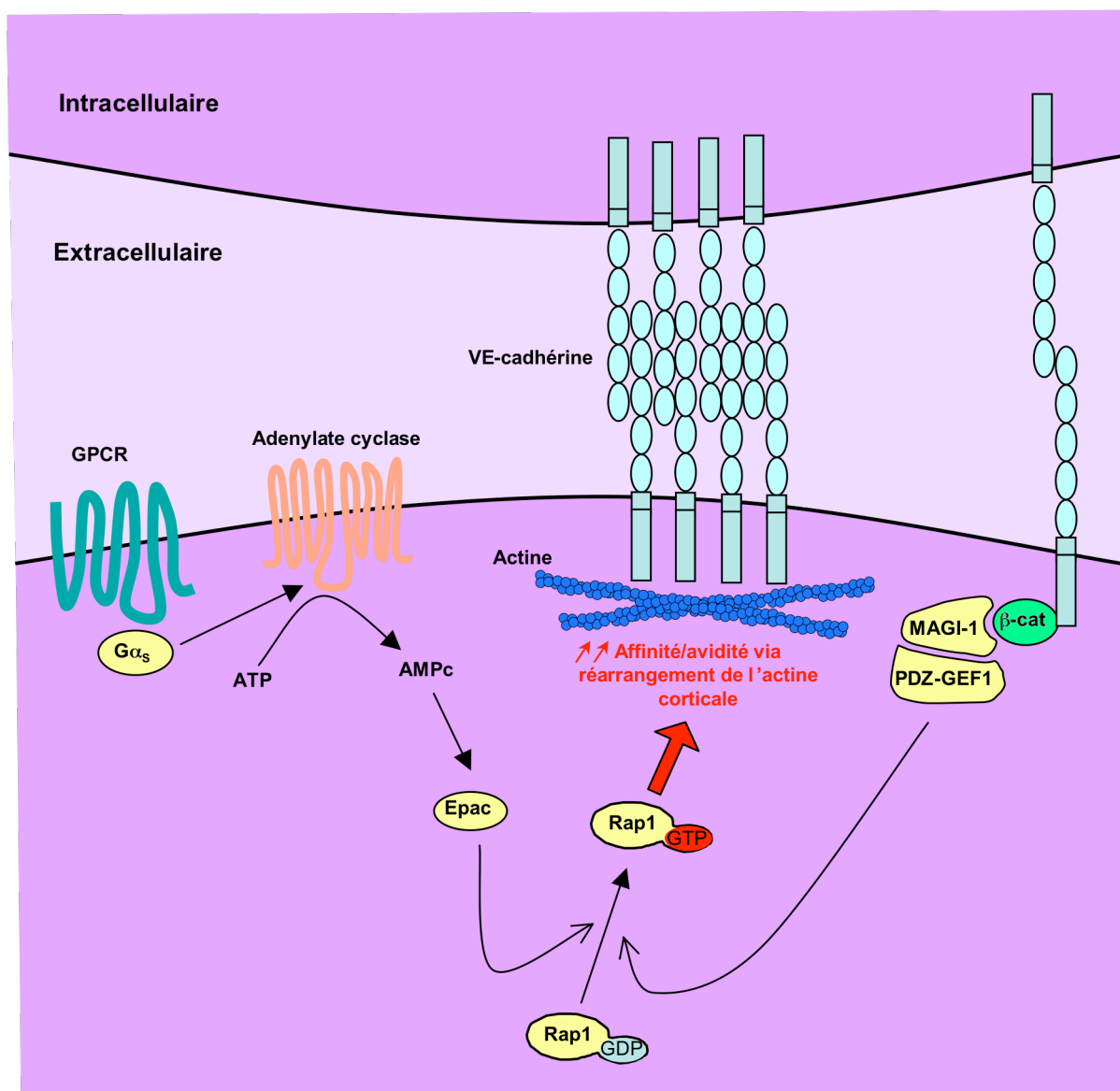


Figure 17 : Voies d'activation de Rap1 et stabilisation de la barrière endothéliale

Les agonistes des récepteurs couplés aux protéines G (GPCR) stimulent la production d'AMPc par l'adénylate cyclase. L'AMPc active alors le facteur d'échange Epac qui favorise la forme active, liée au GTP, de Rap1, augmentant finalement la fonction de

barrière endothéliale. L'interaction homophile de la VE-cadhérine aboutit au recrutement par l'intermédiaire de la protéine MAGI-1 d'un autre facteur d'échange, PDZ-GEF1. Celui-ci favorise la forme active de Rap1, ce qui renforce encore les jonctions interendothéliales. Bien que l'effecteur de Rap1 ne soit pas identifié, le remodelage de l'actine corticale observé suite à son activation pourrait augmenter l'affinité et l'avidité de la VE-cadhérine par un phénomène de signalisation inside-out.

IV. Protéines tyrosine kinases Src et angiogenèse

IV.1. Régulation

Les tyrosine-kinases de la famille Src (SFKs) sont impliquées dans la signalisation du VEGF-R2, dans la régulation de la perméabilité vasculaire, dans l'angiogenèse (Eliceiri, B.P., Paul, R. *et al.* 1999; Weis, S., Shintani, S. *et al.* 2004), et dans la motilité cellulaire et l'apoptose (Abu-Ghazaleh, R. *et al.* 2001). De plus, leur expression est associée à des désordres prolifératifs et de nombreux cancers (Frame, M.C. 2002).

Les kinases de la famille Src ont un processus de régulation élaboré, qui fait intervenir deux autres domaines en plus du domaine kinase, les domaines SH2 et SH3. Les domaines SH2 sont des séquences conservées d'une centaine d'acides aminés, qui reconnaissent et lient spécifiquement certains résidus tyrosine lorsqu'ils sont phosphorylés. Les domaines SH3 sont des séquences capables d'interagir avec des séquences riches en proline. À l'état inactif, la kinase Src est verrouillée dans une conformation repliée sur elle-même, qui implique son domaine SH3 et SH2. Ce dernier interagit avec la tyrosine 527 en position carboxy-terminal, site de phosphorylation par Csk. L'activation de la kinase a lieu suite à la déphosphorylation de ce site, qui permet l'ouverture de l'enzyme, autorisant ainsi la fixation d'ATP nécessaire à l'activité catalytique de la kinase, qui s'autophosphoryle sur la tyrosine 416 (Cf. Figure 18 : Mode d'activation de la tyrosine kinase Src).

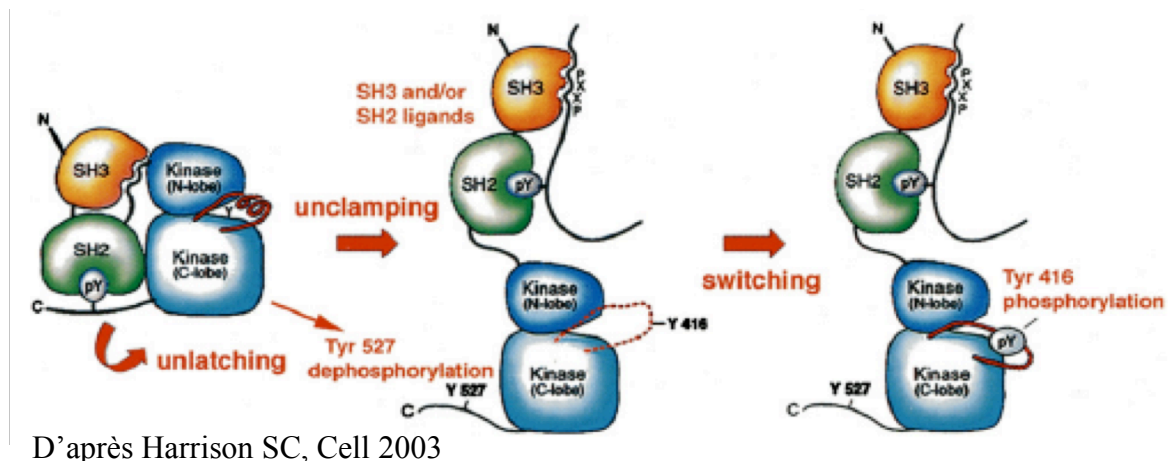


Figure 18 : Mode d'activation de la tyrosine kinase Src

IV.2. Le rôle de Src dans la réponse au VEGF

IV.2.1. Un rôle prépondérant

Différents éléments de la littérature permettent d'attribuer à Src un rôle prépondérant en réponse au VEGF.

In vivo, la présence indispensable de Src, à l'angiogenèse et la perméabilité vasculaire induites par le VEGF, a été démontrée par son inactivation, via la surexpression de Csk, ou son invalidation génique chez la souris (Eliceiri, B.P., Paul, R. *et al.* 1999). De même, le blocage pharmacologique de Src *in vivo*, ou son invalidation génique protège le cerveau (Paul, R. *et al.* 2001), ou le cœur (Weis, S., Shintani, S. *et al.* 2004) des animaux, contre l'œdème provoqué par le relargage de VEGF, conséquemment à une attaque. Cette capacité de ces animaux à maintenir la fonction de barrière endothéliale les protège également de l'extravasation de cellules tumorales, exprimant le VEGF, injectées en intraveineuse (Weis, S., Cui, J. *et al.* 2004). Dans un modèle de xénogreffe de glioblastome, ces souris Src^{-/-} sont encore protégées de l'invasion tumorale, bien que la croissance de la tumeur solide ne soit pas réduite (Lund, C.V. *et al.* 2006).

Au plan moléculaire et cellulaire il a été montré que le VEGF, induisant l'autophosphorylation du VEGF-R2, recrute Src via son domaine SH2 et SH3, provoquant ainsi l'activation de la kinase (Chou, M.T. *et al.* 2002). Par ailleurs, le VEGF provoque également l'association du VEGF-R2 à la VE-cadhérine, et nous avons montré l'association permanente de celle-ci avec Src. Il est donc envisageable que le rapprochement du VEGF-R2 activé puisse alors déplier la kinase et lui permettre de phosphoryler la VE-cadhérine. Cette hypothèse supporte le fait que la kinase associée de façon permanente à la VE-cadhérine *in*

vivo, subit une forte phosphorylation sur tyrosine au cours de l'angiogenèse induite. Cependant, une question importante reste posée concernant les domaines d'interaction de Src à la VE-cadhérine. Il est intéressant de remarquer que le domaine cytoplasmique de la VE-cadhérine possède un motif PxxP (⁶⁷³PPRP⁶⁷⁶) consensus, qui pourrait engendrer l'interaction du domaine SH3 de Src. Cependant, dans ce cas, il faut supposer que la kinase soit dépliée et donc constitutivement active.

IV.2.2. Un rôle complexe

Le fait que différentes voies de signalisation soient activées par Src peut également rendre compte de son importance dans l'ouverture des jonctions et d'autres étapes de l'angiogenèse. Les MAPK ont par exemple été identifiées comme effecteur de Src (Ishida, M. *et al.* 1998). La kinase participe aussi à la survie cellulaire via Akt, et une étude récente dévoile l'effet bénéfique de son inhibition pour induire plus efficacement l'apoptose des cellules endothéliales par radiothérapies (Cuneo, K.C. *et al.* 2006). De plus, Src peut aussi affecter directement la barrière endothéliale en phosphorylant d'autres composants des jonctions comme la β -caténine ou provoquer la contraction cellulaire en phosphorylant la MLCK (Verin, A.D. *et al.* 1998). Il est à noter aussi que les kinases de la famille Src sont aussi essentielles à la croissance et la migration des cellules musculaires lisses vasculaires (Kilarski, W.W. *et al.* 2003).

Ainsi, les multiples effecteurs de Src, combinés aux multiples voies d'activation par lesquelles la kinase est activée, témoignent de son rôle central et complexe dans la régulation de la perméabilité vasculaire.

Un degré supplémentaire de complexité est apporté par le fait que les cellules endothéliales co-expriment trois SFKs (Src Family Kinase), Src, Fyn et Yes (Bull, H.A. *et al.* 1994). L'invalidation génique simultanée de ces trois enzymes conduit à la mort de l'embryon de souris au stade 9,5 jpc, stade du développement qui nécessite une vasculogenèse active (Stein, P.L. *et al.* 1994). À l'inverse, les souris déficientes pour une seule kinase ont un développement vasculaire normal, ce qui témoigne d'un certain degré de compensation parmi ces kinases. Plusieurs études ont montré des rôles différents de ces trois membres dans les cellules endothéliales. Sous l'effet du VEGF, Src s'associe au VEGF-R2 alors que Fyn et Yes s'associent préférentiellement au VEGF-R1 (Chou, M.T. *et al.* 2002). Pourtant, les souris déficientes pour Src, mais aussi pour Yes, ne présentent pas d'augmentation de la perméabilité en réponse au VEGF (Eliceiri, B.P., Paul, R. *et al.* 1999). De même, seuls les

souris dépourvues de Src ou de Yes sont protégées des oedèmes induits par les accidents ischémiques transitoires (Paul, R. *et al.* 2001; Weis, S., Shintani, S. *et al.* 2004), ou de l'extravasation de cellules tumorales (Weis, S., Cui, J. *et al.* 2004). Récemment, l'inhibition spécifique de l'expression de chacune de ces enzymes a été réalisée dans des cellules endothéliales par interférence ARN (Werdich, X.Q. *et al.* 2005). La réponse de ces cellules au VEGF a alors été testée, et les auteurs concluent que (i) les trois kinases sont nécessaires à la prolifération, (ii) l'inhibition de Fyn augmente la migration et l'inhibition de Yes l'atténue, (iii) l'inhibition de Fyn prévient la formation de tubes endothéliaux, (iiii) l'inhibition simultanée des trois kinases diminue significativement l'effet du VEGF sur la prolifération, la migration et la formation de tubes, mais pas son effet sur la survie.

Finalement, la fonction précise et le rôle différentiel de ces trois kinases nécessitent d'être approfondis, car leur implication dans des voies de signalisations distinctes permettrait certainement à des thérapies nouvelles de cibler plus spécifiquement certaines étapes de l'inflammation ou de l'angiogenèse.

Situation du sujet

I. VE-cadhérine et phosphorylation sur tyrosine

I.1. Généralités sur la phosphorylation des protéines

La phosphorylation et la déphosphorylation de protéines, catalysées par des protéines kinases et des protéines phosphatases, est une modification covalente qui peut modifier la fonction des protéines, soit en augmentant ou en diminuant leur activité biologique, soit en les stabilisant ou en les dirigeant vers le protéasome, soit en facilitant ou en inhibant leurs mouvements entre les compartiments subcellulaires, soit en initiant ou en dissociant leurs interactions avec d'autres protéines. La simplicité, la flexibilité et la réversibilité de la phosphorylation, associée à la disponibilité immédiate de l'ATP comme donneur de phosphate, fait de ce processus le plus commun des systèmes de régulation adopté par les cellules eucaryotes. On estime, grâce aux analyses phosphoprotéomiques récentes, qu'environ 30% des protéines encodées par le génome humain contiennent un phosphate lié de façon covalente (Cohen, P. 2002), et les protéines kinases régulent un grand nombre de processus cellulaires, comme le métabolisme, la transcription, le cycle cellulaire, les réarrangements du cytosquelette et la motilité cellulaire, l'apoptose et la différenciation cellulaire. Conséquemment, les mutations et les dérégulations de kinases sont maintenant reconnues comme une cause de nombreuses maladies, autorisant ainsi le développement d'agonistes et d'antagonistes de ces enzymes comme outils thérapeutiques.

Le génome humain comporte 518 gènes codants pour des protéines kinases (Cf. Figure 19 : Le kinome humain), représentant environ 1,7% du génome (Manning, G. *et al.* 2002). Le transfert d'un groupement phosphate sur une protéine peut se faire sur les résidus porteurs d'un groupement hydroxyle. Les phosphorylations ont lieu essentiellement sur des résidus sérines, thréonine, et plus rarement sur tyrosine. Cependant, les phosphorylations sur tyrosine augmentent de façon transitoire au cours de l'activation cellulaire normale (prolifération, différenciation, survie), et de façon considérable, voir même constitutive dans les cellules tumorales, car plusieurs oncogènes codent pour des protéines à activité tyrosine kinase. Chez les métazoaires, 15 à 20% des protéines kinases sont des tyrosine kinases, mais celles-ci sont absentes chez les protozoaires. Ceci suggère que la phosphorylation sur tyrosine a émergé comme mécanisme de communication intercellulaire. Le kinome humain comporte 90 tyrosine kinases, se divisant en récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK) et en tyrosine kinases cytoplasmiques.

Le mécanisme initial de la voie de signalisation des RTK implique l'autophosphorylation du récepteur et le recrutement subséquent d'effecteurs cytoplasmiques comportant des domaines SH2 ou PTB (phosphotyrosine-binding domain). Ces protéines à domaine SH2 ou PTB transduisent ensuite le signal ou modulent l'activité du récepteur. À l'inverse, les tyrosine kinases cytoplasmiques possèdent des domaines d'interaction intrinsèques (SH2, SH3, PH...), qui peuvent moduler l'activité de la kinase par des interactions intramoléculaires, ou diriger la kinase activée vers des substrats spécifiques.

Parmi les 518 gènes codant pour des protéines kinases, plus de 150 ont été impliqués dans des pathologies. Des mutations ou des dérégulations de l'expression de plus de 120 tyrosine et serine kinases sont associées à des cancers humains. La prévalence de ces protéines kinases impliquées en pathologie a engendré des efforts intensifs pour développer des inhibiteurs spécifiques. Cinq inhibiteurs de tyrosine kinase (Gleevec®, Iressa®, Tarceva®, Sutent®, Sprycel®) ont été approuvés pour une utilisation clinique en thérapie anticancéreuse aux Etats-Unis, et plus de 70 autres sont en cours d'essais cliniques contre le cancer, et plus de 25 autres sont en essais pour d'autres maladies.

I.2. Phosphorylation des cadhérines

La signalisation induite par les cytokines et les facteurs de croissance est souvent reliée à la régulation des cadhérines et leurs mécanismes d'adhésion (Wheelock, M.J. *et al.* 2003). D'une manière générale, l'augmentation de l'activité des tyrosine kinases est impliquée non seulement dans les cancers et les désordres prolifératifs, mais également dans les processus inflammatoires. L'inhibition des tyrosine kinases bloque effectivement l'augmentation de la perméabilité endothéliale induite par un large spectre de cytokines inflammatoires, tandis que l'inhibition des tyrosine phosphatases exerce des effets opposés (Shi, S. *et al.* 1998; van Nieuw Amerongen, G.P. *et al.* 1998). De fait, la phosphorylation sur tyrosine du domaine cytoplasmique des cadhérines et de leurs caténines associées est considérée comme un processus de régulation de l'adhérence et de l'expression membranaire.

L'importance de la phosphorylation sur tyrosine des cadhérines *in vivo* est mal connue, cependant, ce processus a été rapporté dans des cellules transformées par l'oncogène v-Src pour la N-cadhérine (Hamaguchi, M. *et al.* 1993) et la E-cadhérine (Behrens, J. *et al.* 1993; Brady-Kalnay, S.M. *et al.* 1998). L'association de protéines tyrosine phosphatases aux cadhérines a été proposé pour expliquer la difficulté de détecter la phosphorylation des cadhérines (Brady-Kalnay, S.M. *et al.* 1995). En effet, la détection de la phosphorylation sur tyrosine des cadhérines est améliorée quand les cellules sont traitées au pervanadate de

sodium, qui est un inhibiteur des phosphotyrosine phosphatases (Brady-Kalnay, S.M. *et al.* 1995; Soler, C. *et al.* 1998; Xu, Y. *et al.* 1997).

La phosphorylation sur tyrosine de la N-cadhérine induit le recrutement de Shc via son domaine SH2. Des études *in vitro* révèlent que cette interaction est directe et requiert la phosphorylation préalable, par la tyrosine kinase Src, du domaine cytoplasmique (Xu, Y. *et al.* 1997). Parmi les six tyrosines du domaine cytoplasmique de la N-cadhérine, des expériences de mutagenèse dirigée ont permis l'identification des tyrosines 851 et 883 comme cibles de Src et domaines de liaison de Shc *in vitro* (Xu, Y. *et al.* 1999). La phosphorylation des tyrosines 755 et 756 de la E-cadhérine en présence de v-Src a également été décrite, et elle conduit au recrutement de la protéine Hakai (Fujita, Y. *et al.* 2002). Cette protéine ubiquitine-ligase provoque l'ubiquitination de la E-cadhérine et son endocytose, favorisant ainsi la transition épithélio-mésenchymateuse.

Dans tous les cas, la phosphorylation sur tyrosine des cadhérines est associée à une dissociation des jonctions, souvent corrélée à une augmentation du pouvoir invasif des cellules. De même, le pervanadate de sodium diminue l'adhérence intercellulaire dépendante des cadhérines (Ozawa, M. *et al.* 1998).

I.3. Phosphorylation de la VE-cadhérine

La phosphorylation de la VE-cadhérine a été mise en évidence pour la première fois en 1997 (Lampugnani, M.G., Corada, M. *et al.* 1997). Cette étude a mis en évidence une phosphorylation sur tyrosine de la VE-cadhérine dans les cellules éparses ou presque confluentes. La VE-cadhérine phosphorylée est alors préférentiellement associée à p120 et à la β -caténine. À l'inverse, la VE-cadhérine des jonctions matures, présentes dans les cellules depuis longtemps confluentes, est déphosphorylée et préférentiellement associée à la plakoglobine.

La phosphorylation de la VE-cadhérine est également décrite suite à l'interaction de cellules tumorales avec des cellules endothéliales, en corrélation avec une dissociation des jonctions (Cai, J. *et al.* 1999; Lewalle, J.M. *et al.* 1997). De même, l'interaction de neutrophiles activés avec des cellules endothéliales augmente la perméabilité endothéliale et induit la phosphorylation sur tyrosine de la VE-cadhérine, ainsi que sa délocalisation observée en immunofluorescence (Tinsley, J.H. *et al.* 1999).

L'activation du VEGF-R2 par le VEGF induit l'autos phosphorylation du récepteur, qui est maximale après cinq minutes de stimulation, ainsi que la phosphorylation subséquente de la VE-cadhérine après quinze minutes, en corrélation avec l'augmentation de la

perméabilité (Esser, S., Lampugnani, M.G. *et al.* 1998). De plus, suite à la stimulation par le VEGF, la VE-cadhérine s'associe au VEGF-R2 et à la protéine Shc (Zanetti, A. *et al.* 2002). Celle-ci se lie, via son domaine SH2, à la phospho-VE-cadhérine qui inhibe alors son activation (Cf. III.4.2.3). Des agents inflammatoires comme l'histamine et le TNF α ont aussi la capacité d'induire la phosphorylation sur tyrosine de la VE-cadhérine, là encore en corrélation avec l'ouverture des jonctions et l'augmentation de la perméabilité (Andriopoulou, P. *et al.* 1999; Nwariaku, F.E. *et al.* 2002).

À l'inverse, la neutralisation de cette phosphorylation stabilise les jonctions. En effet, la VE-cadhérine peut interagir avec une protéine tyrosine phosphatase, la VE-PTP, et celle-ci restreint la phosphorylation induite par le VEGF, et inhibe la perméabilité endothéliale normalement induite par le VEGF-R2 (Nawroth, R. *et al.* 2002).

I.4. Rôle de Src dans la perméabilité vasculaire

Ces dernières années, plusieurs équipes ont mis en évidence un rôle de la tyrosine kinase Src dans la perméabilité endothéliale induite par le TNF ou les espèces activées de l'oxygène (Kevil, C.G. *et al.* 2001; Nwariaku, F.E. *et al.* 2002). Le rôle indispensable des kinases de type Src au cours de l'angiogenèse et de la perméabilité induite par le VEGF a également été démontré (Eliceiri, B.P., Paul, R. *et al.* 1999). En outre, le blocage de l'activité de Src ou son invalidation génique chez la souris, réduisent les oedèmes cérébraux associés aux accidents vasculaires (Paul, R. *et al.* 2001). De même, l'inhibition de Src par une approche pharmacologique ou des peptides, abolit la perméabilité induite par des neutrophiles activés (Tinsley, J.H. *et al.* 2002).

Ce sont tous ces éléments qui ont motivé et guidé ce travail de thèse, afin d'élucider les mécanismes moléculaires initiés par le VEGF et qui aboutissent à l'ouverture des jonctions endothéliales.

II. Objectifs

Au cours de cette thèse nous avons, par des méthodes expérimentales *in vitro* et *in vivo* complémentaires, entrepris de répondre aux questions suivantes :

- La phosphorylation sur tyrosine de la VE-cadhérine est-elle avérée *in vivo* ?
- Existe-t'il une modulation de cette phosphorylation dans un contexte angiogénique *in vivo* ?

- Les tyrosine kinases de type Src sont elles impliquées dans la phosphorylation induite par le VEGF *in vitro* ?
- Quelles sont, parmi les neuf tyrosines du domaine cytoplasmique de la VE-cadhérine (Cf. Figure 20 : Séquence du domaine cytoplasmique de la VE-cadhérine), celles qui sont phosphorylées ?
- Quel est l'effet biologique de cette phosphorylation ?

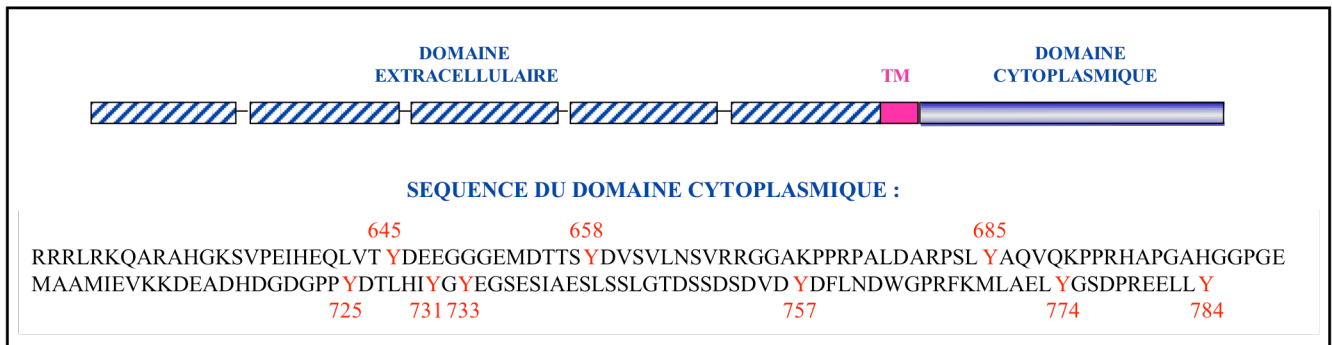


Figure 20 : Séquence du domaine cytoplasmique de la VE-cadhérine

Résultats

I. Article 1 : Vascular endothelial-cadherin tyrosine phosphorylation in angiogenic and quiescent adult tissues.

I.1. Introduction

Bien que la phosphorylation sur tyrosine de la VE-cadhérine ait été démontrée *in vitro*, sous l'effet de différents stimuli (Andriopoulou, P. *et al.* 1999; Esser, S., Lampugnani, M.G. *et al.* 1998; Liu, Y. *et al.* 2004; Nwariaku, F.E. *et al.* 2002; Shasby, D.M. *et al.* 2002) ou dans des cellules endothéliales éparses (Lampugnani, M.G., Corada, M. *et al.* 1997)(Cf. I.3), l'étude de cette phosphorylation *in vivo* reste relativement inexploree. C'est donc dans cette direction que nous nous sommes dirigés, en recherchant l'existence d'une forme phosphorylée de la VE-cadhérine dans différents tissus de souris.

La phosphorylation sur tyrosine est un procédé hautement régulé et quantitativement rare dans les cellules quiescentes, jusqu'à ce qu'un stimulus ou une transformation oncogénique active des tyrosine kinases. Nous avons tout d'abord examiné le niveau de phosphorylation de la VE-cadhérine *in vivo*, en bloquant ou non les tyrosine phosphatases endogènes. Pour cela, les souris ont reçu une injection de pervanadate de sodium, inhibiteur puissant des tyrosines phosphatases, dans la veine caudale, cinq minutes avant l'euthanasie (Xu, F. *et al.* 2002).

Étant donné le rôle avéré du VEGF et de la VE-cadhérine au cours de l'angiogenèse, ainsi que la capacité du VEGF à induire la phosphorylation de la VE-cadhérine *in vitro*, il nous a semblé important d'examiner le niveau de phosphorylation de la VE-cadhérine *in vivo* dans des tissus angionéniques. De manière physiologique, l'angiogenèse chez l'adulte a lieu principalement dans les organes reproducteurs de la femelle, l'ovaire et l'utérus. Plusieurs études ont montré le rôle essentiel du VEGF-VEGFR-2 dans l'angiogenèse de l'ovaire (Ferrara, N. *et al.* 1998; Fraser, H.M. *et al.* 2000; Zimmermann, R.C. *et al.* 2003). Nous avons donc analysé la phosphorylation de la VE-cadhérine de ces organes au cours de l'angiogenèse induite par l'administration des hormones PMSG et hCG.

Bien que la question du rôle de la phosphorylation sur tyrosine de la VE-cadhérine ne soit pas résolue, plusieurs éléments suggèrent son importance dans la transduction du signal. En effet, plusieurs protéines de signalisation, comme la protéine adaptatrice Shc et la tyrosine phosphatase SHP2, interagissent avec le complexe VE-cadhérine-caténines. Ainsi, la

phosphorylation de la VE-cadhérine pourrait être une étape critique dans la régulation de l'angiogenèse ou de la perméabilité mise en œuvre au cours du processus inflammatoire. Afin de mieux comprendre cette signalisation mettant en jeu la VE-cadhérine, nous avons donc examiné l'état de phosphorylation de la protéine *in vivo*, ainsi que son association avec des partenaires cytoplasmiques dans le système vasculaire quiescent. De plus nous avons étudié les modifications potentielles de la VE-cadhérine au cours de l'angiogenèse physiologique.

I.2. Article

Vascular Endothelial–Cadherin Tyrosine Phosphorylation in Angiogenic and Quiescent Adult Tissues

Nathalie Lambeng,* Yann Wallez,* Christine Rampon, Francine Cand, Georges Christé, Danielle Gulino-Debrac, Isabelle Vilgrain, Philippe Huber

Abstract—Vascular endothelial–cadherin (VE-cadherin) plays a key role in angiogenesis and in vascular permeability. The regulation of its biological activity may be a central mechanism in normal or pathological angiogenesis. VE-cadherin has been shown to be phosphorylated on tyrosine in vitro under various conditions, including stimulation by VEGF. In the present study, we addressed the question of the existence of a tyrosine phosphorylated form of VE-cadherin in vivo, in correlation with the quiescent versus angiogenic state of adult tissues. Phosphorylated VE-cadherin was detected in mouse lung, uterus, and ovary but not in other tissues unless mice were injected with peroxovanadate to block protein phosphatases. Remarkably, VE-cadherin tyrosine phosphorylation was dramatically increased in uterus and ovary, and not in other organs, during PMSG/hCG-induced angiogenesis. In parallel, we observed an increased association of VE-cadherin with Flk1 (VEGF receptor 2) during hormonal angiogenesis. Additionally, Src kinase was constitutively associated with VE-cadherin in both quiescent and angiogenic tissues and increased phosphorylation of VE-cadherin–associated Src was detected in uterus and ovary after hormonal treatment. Src-VE-cadherin association was detected in cultured endothelial cells, independent of VE-cadherin phosphorylation state and Src activation level. In this model, Src inhibition impaired VEGF-induced VE-cadherin phosphorylation, indicating that VE-cadherin phosphorylation was dependent on Src activation. We conclude that VE-cadherin is a substrate for tyrosine kinases in vivo and that its phosphorylation, together with that of associated Src, is increased by angiogenic stimulation. Physical association between Flk1, Src, and VE-cadherin may thus provide an efficient mechanism for amplification and perpetuation of VEGF-stimulated angiogenic processes. (*Circ Res.* 2005;96:384–391.)

Key Words: VE-cadherin ■ tyrosine kinase ■ endothelium ■ angiogenesis

Angiogenesis, the sprouting of new vessels from the existing vasculature, is a tightly controlled process that plays its most obvious role in early development. Although the potential for angiogenesis is maintained throughout the lifetime of an organism, once the vasculature has been established, the endothelium remains extraordinarily quiescent in the adult.^{1,2} The hormonal control of the ovary and uterus in reproduction provides the only normal physiological exception to this rule.³ All other activations of angiogenesis during adulthood occur in response to injury or pathological processes such as tumorigenesis and diabetic retinopathy.⁴ During angiogenesis, an important role for endothelial receptor tyrosine kinases such as VEGF and FGF receptors and their cognate growth factors has been demonstrated.⁵ Although the mechanisms that drive angiogenesis have not been fully elucidated, a large body of evidence has established important roles for tyrosine phosphorylation of the cadherin-catenin complex as a potent mechanism that regulates the

stability of cell-cell junctions.^{6–8} As an example, the increase of tyrosine phosphorylation of Flk-1 and VE-cadherin, an endothelial-specific cadherin, by VEGF has been correlated with endothelial cell migration as well as tubular formation.⁹ The pivotal role of VE-cadherin in angiogenesis has been demonstrated by two in vivo experiments. First, VE-cadherin–deficient embryos died from extensive angiogenesis defects.¹⁰ Second, targeting VE-cadherin with blocking antibodies successfully inhibited tumor angiogenesis.^{11,12} Therefore, the regulation of VE-cadherin biological activity by tyrosine phosphorylation may strongly influence angiogenic processes.

In addition, several lines of evidence have demonstrated that VE-cadherin controls vascular permeability.^{13–18} An array of endogenous inflammatory mediators liberated under disease conditions, including histamine,^{7,19} thrombin,²⁰ TNF- α ,²¹ platelet-activating factor,²² advanced glycation end-products,²³ and activated leukocytes^{24,25} have the potential to

Original received September 21, 2004; resubmission received November 10, 2004; revised resubmission received January 10, 2005; accepted January 10, 2005.

From INSERM, CEA (N.L., Y.W., C.R., F.C., G.C., I.V., P.H.), Université J. Fourier EMI 02-19, Laboratoire de Développement et Vieillessement de l'Endothélium, Grenoble; and Laboratoire d'Ingénierie des Macromolécules (D.G.-D.), Institut de Biologie Structurale Jean-Pierre Ebel, CNRS, CEA, Université J. Grenoble, France.

*Both authors contributed equally to this work.

Correspondence to Isabelle Vilgrain, DRDC/DVE, CEA-Grenoble 17, rue des Martyrs 38054 Grenoble Cedex 9, France. E-mail ivilgrain@cea.fr
© 2005 American Heart Association, Inc.

Circulation Research is available at <http://www.circresaha.org>

DOI: 10.1161/01.RES.0000156652.99586.9f

increase microvascular permeability and to disrupt VE-cadherin from endothelial junctions. Tyrosine phosphorylation of VE cadherin has been described to accompany the increased endothelial cell permeability induced by histamine,¹⁹ TNF- α ,^{8,26} and leukocytes.²⁷

Although at present the biological function of VE-cadherin tyrosine phosphorylation is unclear, several lines of evidence suggest that it does indeed play a role in distinct signal transduction networks, most likely as a component of a signaling cascade initiated by receptor or membrane-associated tyrosine kinases. Several members of signaling proteins have been shown to interact with the VE-cadherin-catenin complex including the adapter protein Shc²⁸ and the tyrosine phosphatase SHP2.²⁹ Therefore, modulation of the tyrosine phosphorylation status of VE-cadherin would be critical for regulating angiogenesis and permeability during inflammatory processes through binding with signaling molecules.

To gain insights into the potential *in vivo* tyrosine phosphorylation of VE cadherin, we examined whether the phosphorylated form of VE-cadherin was expressed in the endothelium of the quiescent adult vasculature and whether it was regulated during angiogenesis. We also examined VE-cadherin binding partners in these two situations.

Materials and Methods

Animals

All protocols in this study were conducted in strict accordance with the *Ministère de l'Éducation Nationale, de la Recherche et de la Technologie* Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals. C57/Bl6 mice were purchased from Charles River Laboratories (Les Oncins, France). Females between 8 and 12 weeks of age were used in all experiments.

Peroxovanadate Treatment of Mice

Peroxovanadate administration was performed as previously described.³⁰ Peroxovanadate was diluted to 50 mmol/L in PBS containing 0.5 mg/mL Evans blue to monitor correct systemic injection. Mice were anesthetized by intraperitoneal injection of xylazine (10 mg/kg)/ketamine (80 mg/kg). Peroxovanadate solution or vehicle alone (200 μ L) were administered by intracaudal vein injection. Mice were euthanized by cervical dislocation 5 minutes later, and the tissues were removed.

Superovulation

Mice were given an intraperitoneal injection of 10 IU of PMSG in 0.75 mL of 0.9% NaCl on day 1, followed by 5 IU of hCG (both from Sigma-Aldrich) in 0.4 mL of 0.9% NaCl, 48 hours later. Animals were euthanized 6 hours after second injection by cervical dislocation after peroxovanadate administration.

Antibodies

Commercially available antibodies used were as follows: for immunoprecipitation, the rabbit polyclonal anti-Flk1 SC 504 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Calif), the rabbit polyclonal anti-Src (Upstate Biotechnology, Waltham, Mass), and the goat polyclonal anti-human VE-cadherin SC6458 (Santa Cruz); for Western blotting, the mouse monoclonal anti-phosphotyrosine 4G10 (Upstate Biotechnology, San Jose, Calif), the rat monoclonal anti-Flk1 12B11 (BD Biosciences), the horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG (Sigma-Aldrich, St Louis, Mo), goat anti-rabbit IgG, and rabbit anti-rat IgG (both from Bio-Rad Laboratories, Hercules, Calif); for immunofluorescence, the alexa 488-conjugated anti-rabbit IgG (Molecular Probes, Eugene, Ore) and the cyanine

3-conjugated anti-goat IgG (Jackson Laboratories, Bar Harbor, Me). The rabbit polyclonal anti VE-cadherin antibody was previously described.¹⁶

Chemicals

PMSG, hCG and sodium *ortho*-vanadate were purchased from Sigma-Aldrich. Human recombinant VEGF 165 was from Peprotech. Fluorsave mounting medium, PP2, and SU6656 were from Calbiochem.

Preparation of Tissue Extracts, Immunoprecipitation, SDS/PAGE, and Western Blotting

Tissue lysates and immunoprecipitates were prepared and analyzed as previously described.^{31,32}

Cell Culture

Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were isolated as previously described.³³ Only first to third passage HUVECs were used in experiments. Ten minutes before VEGF stimulation, endothelial cells were pretreated with 10 μ mol/L sodium pervanadate. VEGF stimulation was then performed at 37°C for the concentrations and durations indicated in text and figure legends. Src inhibitors were added 4 hours before VEGF treatment. The cells were homogenized in the same lysis buffer as described³¹ supplemented with 0.5% SDS.

Immunofluorescence Staining

Confluent HUVECs were fixed in ethanol: acetone (1:1) for 10 minutes at -20°C and double stained with anti-VE-cadherin (1 μ g/mL) and anti-Src (20 μ g/mL) antibodies. After three washes in PBS, slides were incubated with cyanine 3-conjugated anti-goat IgG (1:500) and alexa 488-conjugated anti-rabbit IgG (1:500) antibodies. Slides were rinsed and mounted in Fluorsave.

Data Analysis

Each experiment has been reproduced at least three times in identical or similar configuration with similar results. Densitometric analysis was performed with Kodak 1D software.

Results

Tyrosine Phosphorylation of VE-Cadherin in Adult Quiescent Tissues

We first analyzed by Western blot VE-cadherin expression levels in different adult tissues using an antibody directed against the extracellular domain of mouse VE-cadherin (Figure 1A). Although VE-cadherin could be detected in all tissues examined, the data showed a marked difference in signal intensity between lung and other tissues, as indicated by band quantification (Figure 1B).

To examine the presence of P-tyr-VE-cadherin *in vivo*, the protein was immunoprecipitated from different tissue lysates and immunoblotted with an anti-phosphotyrosine antibody. After long exposure time, signals of P-tyr-VE-cadherin were obtained for lung and uterus extracts (Figure 1C). A faint band was also visible for ovary. In contrast, no signal could be detected for heart, kidney, and liver, whereas VE-cadherin was present in each immunoprecipitate (Figure 1C). We thus conclude that P-tyr-VE-cadherin is present, however in small amounts, in lung, uterus, and ovary of adult mice. Attempts to immunoprecipitate larger amounts of VE-cadherin from heart, kidney, and liver did not yield signals with the anti-phosphotyrosine antibody, suggesting that P-tyr-VE-cadherin was not present in these organs.

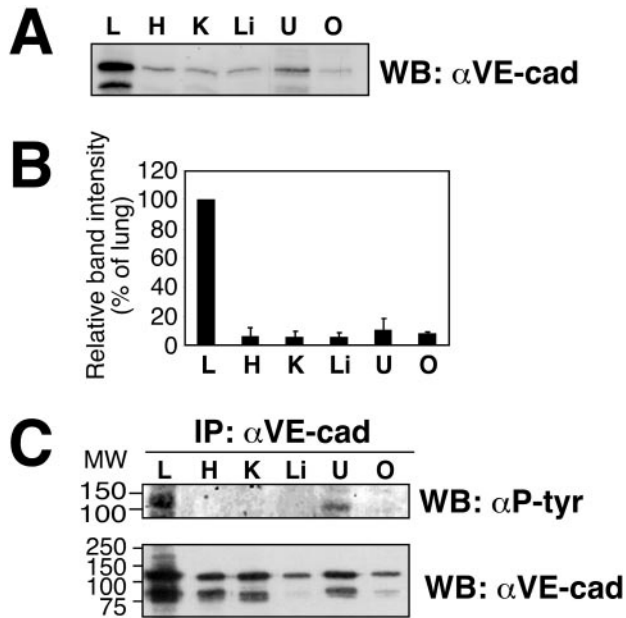


Figure 1. VE-cadherin protein expression in mouse adult tissues. A, Tissue lysate proteins (20 μ g) were analyzed by SDS-PAGE and Western blotted with the anti-VE-cadherin antibody. B, Films from three Western blots were semiquantified by densitometry for evaluation of variations in VE-cadherin content among tissues. Results are expressed as mean percentages (\pm SEM) of lung VE-cadherin content. C, VE-cadherin immunoprecipitates (1 mg of tissue proteins) were analyzed by Western blot first with the anti-phosphotyrosine (P-tyr) antibody and second with the anti-VE-cadherin antibody after stripping. H indicates heart; K, kidney; L, lung; Li, liver; O, ovary; U, uterus.

Systemic Injection of Peroxovanadate Induces Extensive Tyrosine Phosphorylation of Proteins and VE-Cadherin in Mouse Tissues

Tyrosine phosphorylation is a well-regulated process,³⁴ and phosphotyrosine containing proteins are quantitatively rare in quiescent cells until a specific event, such as growth factor binding or oncogenic transformation, activates tyrosine kinases.³⁵ Thus, to examine VE-cadherin phosphorylation levels in absence of protein tyrosine phosphatase (PTP) activity, we injected peroxovanadate or vehicle alone, in the caudal vein, 5 minutes before mouse euthanasia. The administration of peroxovanadate resulted in a dramatic increase in the phosphorylation level of numerous proteins in all organs (Figure 2A, right panel compared with left panel). In particular, lanes for heart, kidney, and spleen that were devoid of signals in absence of treatment exhibited multiple bands in treated mice, for the same exposure time. Thus, as previously reported,³⁰ peroxovanadate systemic injection allowed a better detection of tyrosine kinase substrate proteins.

After peroxovanadate treatment, P-tyr-VE-cadherin was detected in heart, kidney, and spleen immunoprecipitates, whereas VE-cadherin phosphorylation was undetectable without the PTP blocker (Figure 2B). VE-cadherin phosphorylation was also dramatically induced in lung, whereas the treatment was less effective in uterus and ovary (Figure 2B). We conclude that VE-cadherin is a substrate for intracellular tyrosine kinases in all tissues examined. Furthermore, these results suggest that VE-cadherin phosphorylation levels are

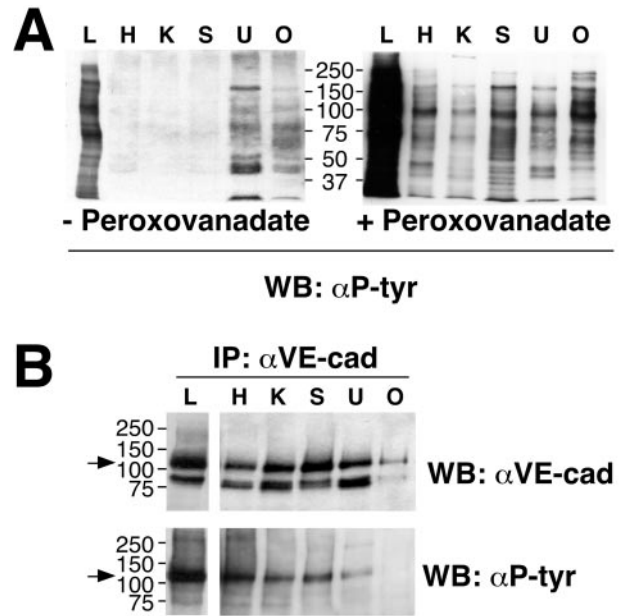


Figure 2. Effect of peroxovanadate treatment on tyrosine phosphorylation pattern in adult tissues. A, Pattern of tyrosine-phosphorylated proteins were analyzed in mice treated with peroxovanadate or vehicle alone. After 5 minutes of treatment, the animals were euthanized and tissue proteins were extracted. Samples containing 10 μ g of total proteins were analyzed by Western blot with the anti-phosphotyrosine antibody. This analysis was performed for each treated mouse to check that the treatment was successful. B, Evaluation of VE-cadherin phosphorylation in peroxovanadate-treated adult tissues. VE-cadherin immunoprecipitates were Western blotted with the anti-VE-cadherin antibody and the anti-phosphotyrosine antibody, sequentially. Lung extracts were analyzed separately because of the much higher VE-cadherin content of this organ. Anti-phosphotyrosine antibody only labeled the full-length VE-cadherin (arrow) and not the truncated form below, devoid of the cytoplasmic domain. Abbreviations as in Figure 1; S indicates spleen.

differentially regulated by PTP activity. All the following experiments were performed after PTP blockade.

VE-Cadherin Tyrosine Phosphorylation Is Enhanced in Tissues Submitted to Angiogenic Stimulation

Because VE-cadherin was found to be tyrosine phosphorylated in quiescent tissues of the mouse, we examined whether its phosphorylation was regulated in tissues submitted to angiogenic stimulation. Adult mammalian angiogenesis occurs predominantly in female reproductive organs, namely the ovary and the uterus. Several studies demonstrated that ovarian angiogenesis was VEGF/Fik1-dependent.³⁶⁻³⁸ Hence, we investigated VE-cadherin phosphorylation levels in ovary and uterus after hormonal induction obtained by the administration of PMSG and hCG. The hormonal treatment dramatically increased tyrosine phosphorylation levels of numerous proteins ranging from 50 to 250 kDa, in both ovary and uterus (Figure 3A). This effect was specific to the genital tract because the phosphorylated protein levels in heart and lung were not affected by hormonal treatment (Figure 3A).

The amount of P-tyr-VE-cadherin was also strongly increased in both ovary and uterus by the treatment (Figure

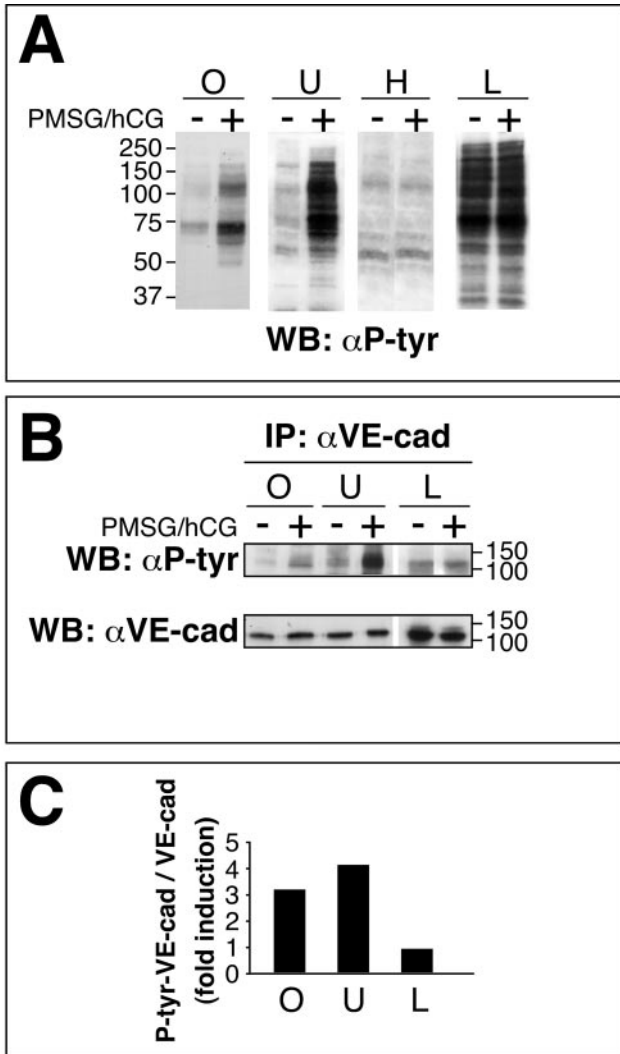


Figure 3. VE-cadherin tyrosine phosphorylation in hormone-stimulated ovary and uterus. A, Female mice were stimulated with PMSG/hCG and treated with peroxovanadate (see Materials and Methods). Tyrosine phosphorylated proteins (10 μ g) were analyzed by Western blot with the anti-phosphotyrosine antibody. B, VE-cadherin was immunoprecipitated from 1 mg of proteins from ovary, uterus, and lung extracts. Immunoprecipitates were immunoblotted with the anti-phosphotyrosine antibody, stripped, and reprobbed with anti-VE-cadherin antibody. C, Western blots were semiquantified by densitometry for calculation of the ratio of the phosphorylated vs total VE-cadherin in the immunoprecipitates. Data are presented as fold induction by hormone treatment. This experiment is representative of two additional experiments. Abbreviations are as in Figure 1.

3B, top panel), whereas it remained unchanged in lung (Figure 3B, top panel). Control Western blot showed that VE-cadherin was present in each immunoprecipitate (Figure 3B, bottom panel). Interestingly, the amount of VE-cadherin was slightly higher in treated ovary and uterus compared with untreated organs (see also Figure 4A), probably reflecting the increase in vessel density after hormonal induction.³⁹ Signal quantification showed that P-tyr over total VE-cadherin ratios were increased 3-fold in ovary and 4-fold in uterus by the hormonal treatment (Figure 3C).

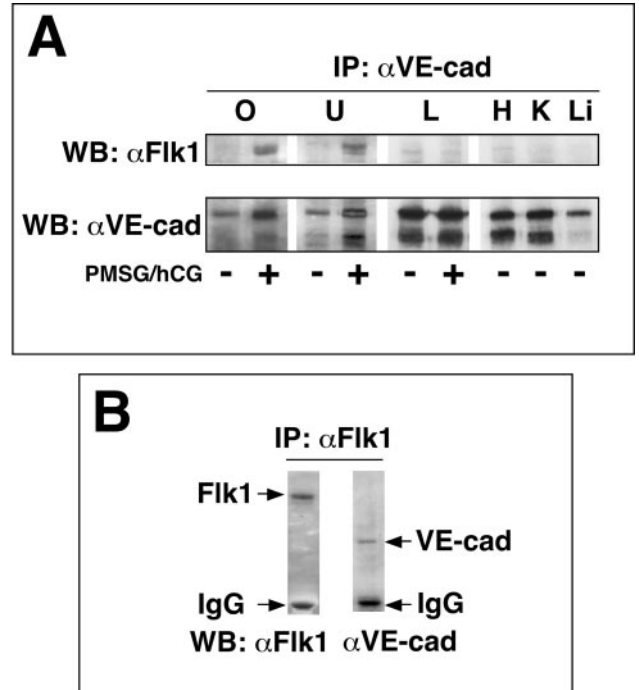


Figure 4. Flk1/VE-cadherin protein association in mouse ovary and uterus stimulated by hormones. A, Mice were treated with PMSG/hCG or vehicle alone, and peroxovanadate. Flk1/VE-cadherin association was revealed by immunoprecipitation of VE-cadherin from 1 mg of tissue protein lysates, immunoblotting with the anti-Flk1 and the anti-VE-cadherin antibodies. This experiment is representative of two additional experiments. B, Flk1-VE-cadherin association was confirmed by immunoprecipitation of uterus protein extracts (1 mg) with the anti-Flk1 antibody and immunoblotting with the anti-Flk1 and the anti-VE-cadherin antibodies. Bottom band (50 kDa) is the Ig-heavy chain. Abbreviations are as in Figure 1.

VE-Cadherin Is Associated to Flk1 in Hormonally Stimulated Ovary and Uterus

Flk1 was previously found to be associated with the VE-cadherin-catenin complex *in vitro* on VEGF induction.^{28,40,41} This complex was also detected in endothelial cells cultured under flow condition.⁴² Therefore, we wondered whether such an association could be observed *in vivo* and whether it was regulated by hormonal stimulation in ovary and uterus. Lysates from ovary and uterus of mice injected by PMSG/hCG or PBS alone were subjected to immunoprecipitation with anti-VE-cadherin antibody and immunoblotted with anti-Flk1 antibody. Flk1 signals were prominent in VE-cadherin immunoprecipitates from ovary and uterus of treated mice and not visible in untreated mice (Figure 4A). In lung and heart immunoprecipitates, the Flk1 band was faint but detectable (Figure 4A). Flk1 could not be detected in VE-cadherin immunoprecipitates in kidney and liver (Figure 4A). Similar results were obtained in mouse tissues not treated by peroxovanadate or hormones, indicating that association was independent of VE-cadherin phosphorylation level (data not shown).

Conversely, VE-cadherin was detected in Flk1 immunoprecipitate from hormonally treated uterus extracts (Figure 4B), thereby confirming Flk1-VE-cadherin association.

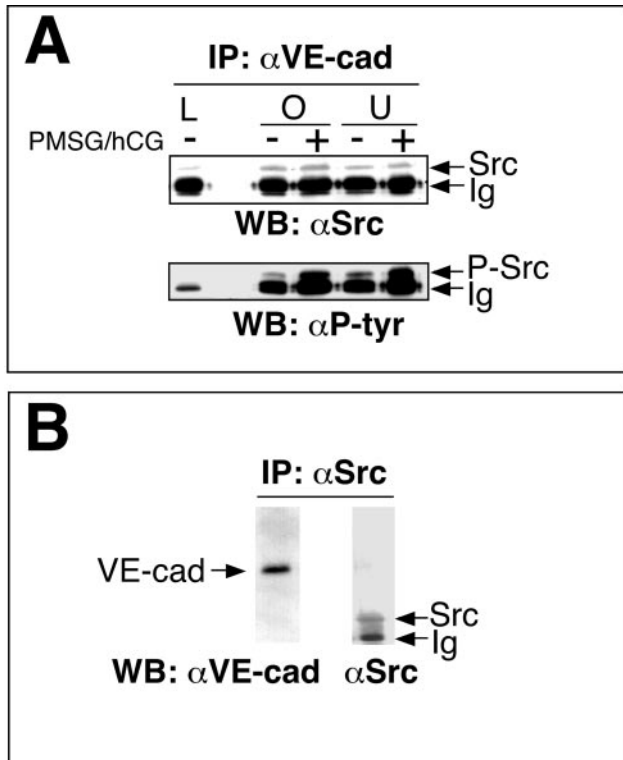


Figure 5. Src/VE-cadherin association and Src phosphorylation state in mouse ovary and uterus. **A**, Mice were treated by PMSG/hCG or vehicle alone, and peroxovanadate. Src/VE-cadherin association was analyzed in VE-cadherin immunoprecipitates from protein lysates (0.5 mg for lung and 1 mg for ovary and uterus) and immunoblotting with the anti-Src antibody. Membrane was stripped and reprobed with the anti-phosphotyrosine antibody. Bottom band (50 kDa) is the Ig-heavy chain. **B**, To confirm Src/VE-cadherin association, uterus extracts (1 mg) were immunoprecipitated with anti-Src antibody. Proteins were then Western blotted with the anti-VE-cadherin and the anti-Src antibodies. This experiment is representative of three additional experiments. Abbreviations are as in Figure 1.

Altogether, our data indicate that hormonal stimulation promoted the association of Flk1 and VE-cadherin, possibly through a VEGF-dependent mechanism.

Constitutive VE-Cadherin-Src Association and Src Phosphorylation on Hormonal Stimulation

The cytoplasmic tyrosine kinase Src has been found to play a crucial role in VEGF-induced angiogenesis and vascular permeability.^{43,44} Furthermore, Liu and Senger⁴⁵ showed that VE-cadherin was disrupted from intercellular junctions through a Src-dependent mechanism in collagen I-induced angiogenesis. We thus examined whether VE-cadherin was associated with Src *in vivo*. VE-cadherin immunoprecipitates from uterus and ovary of treated or untreated mice were immunoblotted with an anti-Src antibody, as shown Figure 5A (top panel). The presence of Src was detected in each immunoprecipitate, independent of hormone treatment, suggesting a permanent association of Src with VE-cadherin. Such an association was also found in lung (Figure 5A, top panel) and heart (not shown), as well as in tissues not treated by peroxovanadate (not shown). Analysis of Src phosphory-

lation state with anti-phosphotyrosine antibody revealed that Src was strongly phosphorylated on hormonal treatment (Figure 5A, bottom panel). Densitometric analysis showed 2- and 4-fold increases in phospho-Src on treatment in ovary and uterus, respectively (not shown). These experiments established that the phosphorylation state of VE-cadherin-associated Src in the female reproductive system is markedly increased during hormone-induced angiogenesis.

A prominent VE-cadherin band was observed in Src immunoprecipitate from hormone-treated uterus extracts (Figure 5B). These data confirm the existence of a robust association between Src and VE-cadherin *in vivo*.

Src Inhibitors Impaired VEGF-Induced VE-Cadherin Phosphorylation but Preserved Src-VE-Cadherin Association

To examine whether Src activation is a necessary step for VE-cadherin phosphorylation, we used confluent primary endothelial cells (HUVECs) stimulated by VEGF together with Src inhibitors. In this system, VEGF rapidly induced VE-cadherin phosphorylation with a maximum at 15 minutes (Figure 6A). When HUVECs were treated with Src inhibitors, either SU6656 or PP2, VEGF-induced VE-cadherin phosphorylation was inhibited in a dose-dependent manner (Figure 6B). We conclude that Src is required for VEGF-induced VE-cadherin phosphorylation. Furthermore, we show that Src inhibition does not interfere with Src-VE-cadherin association (Figure 6C). In agreement with these data, Src immunofluorescence staining of untreated confluent HUVECs showed that a significant subset of Src was located at cell-cell junctions, where it colocalized with VE-cadherin (Figure 6D). VE-cadherin-Src colocalization was not altered by VEGF activation of cells (data not shown). Altogether, these *in vitro* data confirmed the VE-cadherin-Src association observed *in vivo*. We further show that this association is independent of VE-cadherin tyrosine-phosphorylation state and Src activation level.

Discussion

VE-Cadherin Tyrosine Phosphorylation in the Mature Vasculature

The tyrosine phosphorylation of VE-cadherin in endothelial cells on stimulation^{7,8,19,45,46} or in sparse cell culture⁶ has been established, but its existence in the adult vasculature has been relatively unexplored. Of interest, in the present study, we show basal P-tyr-VE-cadherin levels in lung and uterus, and to a lesser extent in ovary, indicating that VE-cadherin is indeed a substrate of tyrosine kinase *in vivo*. VE-cadherin tyrosine phosphorylation in the female reproductive system is in agreement with our data on estrogen-induced VE-cadherin phosphorylation (see later). One possible explanation for the presence of P-tyr-VE-cadherin in lung is that it is a significant site for macrophage-endothelium interaction.⁴⁷ Macrophages may influence the pulmonary endothelium through the release of inflammatory mediators, which may induce VE-cadherin phosphorylation.

In contrast, VE-cadherin tyrosine phosphorylation was undetectable in other organs unless mice were injected with a potent tyrosine phosphatase inhibitor. This is usually the case

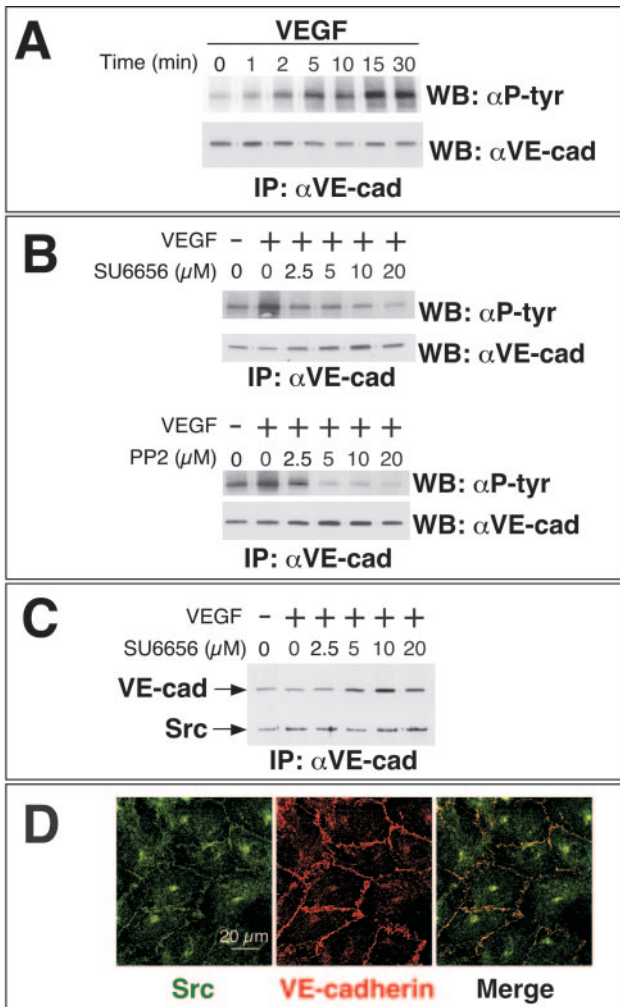


Figure 6. Src inhibitors impaired VEGF-induced VE-cadherin phosphorylation in endothelial cells but not VE-cadherin-Src association. **A**, Confluent cultures of HUVECs were serum starved (1% serum) for 6 hours and incubated with 50 ng/mL VEGF for 0 to 30 minutes. Proteins were immunoprecipitated with anti-VE-cadherin and Western blotted with anti-P-tyr and anti-VE-cadherin antibodies. **B**, Src inhibitors prevented VEGF-induced VE-cadherin phosphorylation. VE-cadherin was immunoprecipitated from VEGF-stimulated HUVECs treated with increasing concentrations of SU6656 or PP2, as indicated. Presence of P-tyr-VE-cadherin was detected as above. **C**, Src inhibitor did not disrupt VE-cadherin-Src association. VE-cadherin was immunoprecipitated from HUVECs treated with VEGF and increasing concentrations of SU6656. VE-cadherin and Src were revealed by Western blotting. **D**, Immunolocalization of Src and VE-cadherin in confluent HUVECs. Double immunofluorescence staining (Src, green; VE-cadherin, red) showed protein colocalization at cell-cell junctions (yellow staining in merged images).

for other cellular proteins that are phosphorylated on tyrosine in response to extracellular activating ligands for which the identification has been hampered by their low abundance and the ubiquitous presence of tyrosine phosphatases. Thus, our results suggest that VE-cadherin tyrosine phosphorylation might be regulated in adult quiescent endothelium through tyrosine phosphatase activities leading to a dephosphorylated form of VE-cadherin in resting endothelium. This is consistent with *in vitro* data showing that when endothelial cells reach confluence, they undergo contact inhibition of prolifer-

ation and stabilization of cell-cell junctions, together with downregulation of tyrosine phosphorylation of VE-cadherin and associated catenins.⁶ This is also in agreement with previous data showing the density-dependent increase in PTP activity and expression at cell-cell junctions where they associate with the cadherin-catenin complex proteins and platelet endothelial cell adhesion molecule.^{48,49} Recently, a tyrosine phosphatase, VE-PTP, has been shown to interact with VE-cadherin; however, this molecule does not directly dephosphorylate VE-cadherin.⁵⁰ Other PTP, such as SHP1, SHP2, PTP κ , PTP μ , PTP-LAR, and PTP-1B, have been shown to be indirectly associated to cadherins through catenin binding.^{29,51-55} These PTP may potentially dephosphorylate VE-cadherin. Our data show that VE-cadherin is only weakly phosphorylated in resting vasculature, suggesting that PTP activity overcomes that of protein kinases for VE-cadherin phosphorylation.

VE-Cadherin Tyrosine Phosphorylation in Angiogenic Tissues

To further explore the physiological existence of the VE-cadherin phosphorylation *in vivo*, we next examined the endothelium of the developing vasculature in the hormone-stimulated female reproductive system. Indeed, the female reproductive organs (ovary, uterus) are some of the few adult tissues that exhibit rapid growth accompanied by extensive modifications of vascularization and vascular permeability.^{3,56} Angiogenesis is thus an important component of the growth and function of these tissues. Our data show a higher phosphorylation state of VE-cadherin, indicating activation of downstream signaling during hormonally induced angiogenesis. VEGF has a crucial role in the control of angiogenesis in the ovary³⁶ and neovascularization is essential in preparing the uterine endometrium for implantation.^{36,57} Previous data showed an increase in P-tyr-VE-cadherin in endothelial cells activated by VEGF.⁴⁶ Therefore, it is likely that induction of VE-cadherin phosphorylation be mediated by VEGF in hormone-stimulated organs. Others reported that VE-cadherin phosphorylation was upregulated in heart lysates of mice submitted to VEGF administration.⁴⁴ Our results on VE-cadherin phosphorylation in ovary and uterus are consistent with their data in heart.

The exact role of VE-cadherin phosphorylation remains to be clarified. Several disease processes are known to be driven by angiogenesis, including cancer, atherosclerosis, diabetic retinopathy, and arthritis.⁵⁸ If VE-cadherin phosphorylation is a necessary step for the angiogenic process, inhibition of VE-cadherin phosphorylation may provide a useful therapeutic approach to limit such "angiogenic" diseases.

VE-Cadherin-Flk1 Association

An association between VE-cadherin and Flk1 has been observed *in vitro* on VEGF stimulation^{28,40,41} or when cells were grown under flow conditions.⁴² In the present study, we have demonstrated the presence of such an association in ovary and uterus after hormone stimulation. It is very likely that VEGF be the mediator triggering also the association with Flk1. VE-cadherin-Flk1 association was weak in lung and heart, and absent in kidney and liver. In contrast with

these data, Weis and collaborators⁴⁴ found that both proteins were associated in heart lysates in resting conditions, whereas the complex was rapidly dissociated when mice were injected with VEGF. We do not know the reason of this difference. Endothelial subtype-specific mechanisms may explain this discrepancy. Alternatively, heart endothelial cells may be continuously activated by high flow rates, thereby promoting VE-cadherin-Flk1 association.

VE-Cadherin-Src Association

We demonstrate for the first time that Src had a permanent association with VE-cadherin, *in vivo* and *in vitro*, independent of VE-cadherin phosphorylation state and Src activation level. VE-cadherin may serve as an anchor to maintain Src at the endothelial cell junction, where it could exert its activity on junctional components. We show that VE-cadherin-associated Src was tyrosine-phosphorylated on angiogenic stimulation *in vivo*. Furthermore, inhibition of Src impaired VE-cadherin phosphorylation in VEGF-stimulated HUVECs, indicating that VE-cadherin phosphorylation is dependent on Src activation in this model. Src kinases are considered to play a general role in regulating cadherin function in a wide variety of cell types.⁵⁹ In fact, Src can phosphorylate E-cadherin, causing epithelial cells to dissociate from one another.⁵⁹ It is tempting to speculate that Src also phosphorylates VE-cadherin. Src was shown to associate with Flk1 on VEGF stimulation.⁶⁰ It is likely that VE-cadherin, Flk1, and Src form a multimeric complex on VEGF activation and not separate associations. VEGF-dependent angiogenesis requires Src kinase activity.⁴³ Furthermore, it has been recently demonstrated that VEGF disrupted VE-cadherin-dependent junctions *in vivo*, through a Src-mediated mechanism.⁶¹ It is conceivable that complex formation allows Flk1-activation of Src, which in turn phosphorylates VE-cadherin. Collagen I was shown to promote capillary morphogenesis together with VE-cadherin disruption from cell-cell contacts through a Src-dependent mechanism.⁴⁵ In these experiments, inhibition of Src prevented capillary morphogenesis and preserved VE-cadherin at cell junctions. Altogether, these data suggest that VE-cadherin plays a central role in the angiogenic process, in agreement with our observations on VE-cadherin-deficient mice.¹⁰

Conclusions

In this report, we have shown that VE-cadherin phosphorylation levels are weak in quiescent tissues and markedly increased in angiogenic tissues. Importantly, a VE-cadherin-Flk1 association was prominent in angiogenic tissues, whereas a permanent association with Src was present in all tissues. Furthermore, the phosphorylation state of VE-cadherin-associated Src was increased in angiogenic tissues. Continued progress in the study of VE-cadherin tyrosine phosphorylation function will require further dissection of its downstream signaling pathways and relating these pathways to specific cellular responses.

Acknowledgments

This work was supported by the Commissariat à l'Énergie Atomique, the Institut pour la Santé Et la Recherche Médicale and Grenoble

University, the Ligue contre le Cancer, and the Association pour la Recherche contre le Cancer (no. 5588).

References

- Engerman RL, Pfaffenbach D, Davis MD. Cell turnover of capillaries. *Lab Invest*. 1967;17:738–743.
- Hobson B, Denekamp J. Endothelial proliferation in tumours and normal tissues: continuous labelling studies. *Br J Cancer*. 1984;49:405–413.
- Reynolds LP, Killilea SD, Redmer DA. Angiogenesis in the female reproductive system. *FASEB J*. 1992;6:886–892.
- Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*. 1996;86:353–364.
- Mustonen T, Alitalo K. Endothelial receptor tyrosine kinases involved in angiogenesis. *J Cell Biol*. 1995;129:895–898.
- Lampugnani MG, Corada M, Andriopoulou P, Esser S, Risau W, Dejana E. Cell confluence regulates tyrosine phosphorylation of adherens junction components in endothelial cells. *J Cell Sci*. 1997;110:2065–2077.
- Shasby DM, Ries DR, Shasby SS, Winter MC. Histamine stimulates phosphorylation of adherens junction proteins and alters their link to vimentin. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2002;282:L1330–L1338.
- Nwariaku FE, Liu Z, Zhu X, Turnage RH, Sarosi GA, Terada LS. Tyrosine phosphorylation of vascular endothelial cadherin and the regulation of microvascular permeability. *Surgery*. 2002;132:180–185.
- Lin MT, Yen ML, Lin CY, Kuo ML. Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis by resveratrol through interruption of Src-dependent vascular endothelial cadherin tyrosine phosphorylation. *Mol Pharmacol*. 2003;64:1029–1036.
- Gory-Fauré S, Prandini MH, Pointu H, Roullot V, Pignot-Paintrand I, Vernet M, Huber P. Role of vascular endothelial-cadherin in vascular morphogenesis. *Development*. 1999;126:2093–2102.
- Corada M, Zanetta L, Orsenigo F, Breviaro F, Lampugnani MG, Bernasconi S, Liao F, Hicklin DJ, Bohlen P, Dejana E. A monoclonal antibody to vascular endothelial-cadherin inhibits tumor angiogenesis without side effects on endothelial permeability. *Blood*. 2002;100:905–911.
- Liao F, Doody JF, Overholser J, Finnerty B, Bassi R, Wu Y, Dejana E, Kussie P, Bohlen P, Hicklin DJ. Selective targeting of angiogenic tumor vasculature by vascular endothelial-cadherin antibody inhibits tumor growth without affecting vascular permeability. *Cancer Res*. 2002;62:2567–2575.
- Lampugnani MG, Resnati M, Raiteri M, Pigott R, Pisacane A, Houen G, Ruco LP, Dejana E. A novel endothelial-specific membrane protein is a marker of cell-cell contacts. *J Cell Biol*. 1992;118:1511–1522.
- Breviaro F, Caveda L, Corada M, Martin-Padura I, Navarro P, Golay J, Introna M, Gulino D, Lampugnani MG, Dejana E. Functional properties of human vascular endothelial cadherin (7B4/cadherin-5), an endothelium-specific cadherin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1995;15:1229–1239.
- Gotsch U, Borges E, Bosse R, Boggemeyer E, Simon M, Mossmann H, Vestweber D. VE-cadherin antibody accelerates neutrophil recruitment *in vivo*. *J Cell Sci*. 1997;110:583–588.
- Gulino D, Delachanal E, Concord E, Genoux Y, Morand B, Valiron MO, Sulpice E, Scaife R, Alemany M, Vernet T. Alteration of endothelial cell monolayer integrity triggers resynthesis of vascular endothelium cadherin. *J Biol Chem*. 1998;273:29786–29793.
- Hordijk PL, Anthony E, Mul FP, Rientsma R, Oomen LC, Roos D. Vascular-endothelial-cadherin modulates endothelial monolayer permeability. *J Cell Sci*. 1999;112:1915–1923.
- Corada M, Liao F, Lindgren M, Lampugnani MG, Breviaro F, Frank R, Muller WA, Hicklin DJ, Bohlen P, Dejana E. Monoclonal antibodies directed to different regions of vascular endothelial cadherin extracellular domain affect adhesion and clustering of the protein and modulate endothelial permeability. *Blood*. 2001;97:1679–1684.
- Andriopoulou P, Navarro P, Zanetti A, Lampugnani MG, Dejana E. Histamine induces tyrosine phosphorylation of endothelial cell-to-cell adherens junctions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999;19:2286–2297.
- Rabiet MJ, Plantier JL, Rival Y, Genoux Y, Lampugnani MG, Dejana E. Thrombin-induced increase in endothelial permeability is associated with changes in cell-to-cell junction organization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1996;16:488–496.
- Wong RK, Baldwin AL, Heimark RL. Cadherin-5 redistribution at sites of TNF-alpha and IFN-gamma-induced permeability in mesenteric venules. *Am J Physiol*. 1999;276:H736–H748.

22. Zhang Y, Gu Y, Lucas MJ, Wang Y. Antioxidant superoxide dismutase attenuates increased endothelial permeability induced by platelet-activating factor. *J Soc Gynecol Investig*. 2003;10:5–10.
23. Otero K, Martinez F, Beltran A, Gonzalez D, Herrera B, Quintero G, Delgado R, Rojas A. Albumin-derived advanced glycation end-products trigger the disruption of the vascular endothelial cadherin complex in cultured human and murine endothelial cells. *Biochem J*. 2001;359:567–574.
24. Del Maschio A, Zanetti A, Corada M, Rival Y, Ruco L, Lampugnani MG, Dejana E. Polymorphonuclear leukocyte adhesion triggers the disorganization of endothelial cell-to-cell adherens junctions. *J Cell Biol*. 1996;135:497–510.
25. Allport JR, Ding H, Collins T, Gerritsen ME, Lusinskas FW. Endothelial-dependent mechanisms regulate leukocyte transmigration: a process involving the proteasome and disruption of the vascular endothelial-cadherin complex at endothelial cell-to-cell junctions. *J Exp Med*. 1997;186:517–527.
26. Nwariaku FE, Liu Z, Zhu X, Nahari D, Ingle C, Wu RF, Gu Y, Sarosi G, Terada LS. NADPH oxidase mediates vascular endothelial cadherin phosphorylation and endothelial dysfunction. *Blood*. 2004;104:3214–3220.
27. Tinsley JH, Wu MH, Ma W, Taulman AC, Yuan SY. Activated neutrophils induce hyperpermeability and phosphorylation of adherens junction proteins in coronary venular endothelial cells. *J Biol Chem*. 1999;274:24930–24934.
28. Zanetti A, Lampugnani MG, Balconi G, Breviario F, Corada M, Lanfrancone L, Dejana E. Vascular endothelial growth factor induces SHC association with vascular endothelial cadherin: a potential feedback mechanism to control vascular endothelial growth factor receptor-2 signaling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002;22:617–622.
29. Ukropec JA, Hollinger MK, Salva SM, Woolkalis MJ. SHP2 association with VE-cadherin complexes in human endothelial cells is regulated by thrombin. *J Biol Chem*. 2000;275:5983–5986.
30. Xu F, Xu MJ, Zhao R, Guerra A, Zeng F, Zhao ZJ. Tyrosine phosphatases SHP-1 and SHP-2 are associated with distinct tyrosine-phosphorylated proteins. *Exp Cell Res*. 2002;272:75–83.
31. Chabre O, Cornillon F, Bottari SP, Chambaz EM, Vilgrain I. Hormonal regulation of mitogen-activated protein kinase activity in bovine adrenocortical cells: cross-talk between phosphoinositides, adenosine 3',5'-monophosphate, and tyrosine kinase receptor pathways. *Endocrinology*. 1995;136:956–964.
32. Rocchi S, Gaillard I, van Obberghen E, Chambaz EM, Vilgrain I. Adrenocorticotrophic hormone stimulates phosphotyrosine phosphatase SHP2 in bovine adrenocortical cells: phosphorylation and activation by cAMP-dependent protein kinase. *Biochem J*. 2000;352:483–490.
33. Garnier-Raveaud S, Usson Y, Cand F, Robert-Nicoud M, Verdetti J, Faury G. Identification of membrane calcium channels essential for cytoplasmic and nuclear calcium elevations induced by vascular endothelial growth factor in human endothelial cells. *Growth Factors*. 2001;19:35–48.
34. Fischer EH, Charbonneau H, Tonks NK. Protein tyrosine phosphatases: a diverse family of intracellular and transmembrane enzymes. *Science*. 1991;253:401–406.
35. White MF. Structure and function of tyrosine kinase receptors. *J Bioenerg Biomembr*. 1991;23:63–82.
36. Ferrara N, Chen H, Davis-Smyth T, Gerber HP, Nguyen TN, Peers D, Chisholm V, Hillan KJ, Schwall RH. Vascular endothelial growth factor is essential for corpus luteum angiogenesis. *Nat Med*. 1998;4:336–340.
37. Fraser HM, Dickson SE, Lunn SF, Wulff C, Morris KD, Carroll VA, Bicknell R. Suppression of luteal angiogenesis in the primate after neutralization of vascular endothelial growth factor. *Endocrinology*. 2000;141:995–1000.
38. Zimmermann RC, Hartman T, Kavic S, Pauli SA, Bohlen P, Sauer MV, Kitajewski J. Vascular endothelial growth factor receptor 2-mediated angiogenesis is essential for gonadotropin-dependent follicle development. *J Clin Invest*. 2003;112:659–669.
39. Goede V, Schmidt T, Kimmina S, Kozian D, Augustin HG. Analysis of blood vessel maturation processes during cyclic ovarian angiogenesis. *Lab Invest*. 1998;78:1385–1394.
40. Carmeliet P, Lampugnani MG, Moons L, Breviario F, Comperolle V, Bono F, Balconi G, Spagnuolo R, Oostuyse B, Dewerchin M, Zanetti A, Angellilo A, Mattot V, Nuyens D, Lutgens E, Clotman F, de Ruiter MC, Gittenberger-de Groot A, Poelmann R, Lupu F, Herbert JM, Collen D, Dejana E. Targeted deficiency or cytosolic truncation of the VE-cadherin gene in mice impairs VEGF-mediated endothelial survival and angiogenesis. *Cell*. 1999;98:147–157.
41. Lampugnani MG, Zanetti A, Corada M, Takahashi T, Balconi G, Breviario F, Orsenigo F, Cattelino A, Kemler R, Daniel TO, Dejana E. Contact inhibition of VEGF-induced proliferation requires vascular endothelial cadherin, beta-catenin, and the phosphatase DEP-1/CD148. *J Cell Biol*. 2003;161:793–804.
42. Shay-Salit A, Shushy M, Wolfvovitz E, Yahav H, Breviario F, Dejana E, Resnick N. VEGF receptor 2 and the adherens junction as a mechanical transducer in vascular endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99:9462–9467.
43. Eliceiri BP, Paul R, Schwartzberg PL, Hood JD, Leng J, Cheresch DA. Selective requirement for Src kinases during VEGF-induced angiogenesis and vascular permeability. *Mol Cell*. 1999;4:915–924.
44. Weis S, Shintani S, Weber A, Kirchmair R, Wood M, Cravens A, McSharry H, Iwakura A, Yoon YS, Himes N, Burstein D, Doukas J, Soll R, Losordo D, Cheresch D. Src blockade stabilizes a Flk/cadherin complex, reducing edema and tissue injury following myocardial infarction. *J Clin Invest*. 2004;113:885–894.
45. Liu Y, Senger DR. Matrix-specific activation of Src and Rho initiates capillary morphogenesis of endothelial cells. *FASEB J*. 2004;18:457–468.
46. Esser S, Lampugnani MG, Corada M, Dejana E, Risau W. Vascular endothelial growth factor induces VE-cadherin tyrosine phosphorylation in endothelial cells. *J Cell Sci*. 1998;111:1853–1865.
47. Brain JD, Molina RM, DeCamp MM, Warner AE. Pulmonary intravascular macrophages: their contribution to the mononuclear phagocyte system in 13 species. *Am J Physiol*. 1999;276:L146–L154.
48. Gaits F, Li RY, Ragab A, Ragab-Thomas JM, Chap H. Increase in receptor-like protein tyrosine phosphatase activity and expression level on density-dependent growth arrest of endothelial cells. *Biochem J*. 1995;311:97–103.
49. Sorby M, Ostman A. Protein-tyrosine phosphatase-mediated decrease of epidermal growth factor and platelet-derived growth factor receptor tyrosine phosphorylation in high cell density cultures. *J Biol Chem*. 1996;271:10963–10966.
50. Nawroth R, Poell G, Ranft A, Kloep S, Samulowitz U, Fachinger G, Golding M, Shima DT, Deutsch U, Vestweber D. VE-PTP and VE-cadherin ectodomains interact to facilitate regulation of phosphorylation and cell contacts. *EMBO J*. 2002;21:4885–4895.
51. Kypta RM, Su H, Reichardt LF. Association between a transmembrane protein tyrosine phosphatase and the cadherin-catenin complex. *J Cell Biol*. 1996;134:1519–1529.
52. Fuchs M, Muller T, Lerch MM, Ullrich A. Association of human protein-tyrosine phosphatase kappa with members of the armadillo family. *J Biol Chem*. 1996;271:16712–16719.
53. Brady-Kalnay SM, Mourton T, Nixon JP, Pietz GE, Kinch M, Chen H, Brackenbury R, Rimm DL, Del Vecchio RL, Tonks NK. Dynamic interaction of PTPmu with multiple cadherins in vivo. *J Cell Biol*. 1998;141:287–296.
54. Balsamo J, Arregui C, Leung T, Lilien J. The nonreceptor protein tyrosine phosphatase PTP1B binds to the cytoplasmic domain of N-cadherin and regulates the cadherin-actin linkage. *J Cell Biol*. 1998;143:523–532.
55. Tonks NK, Neel BG. Combinatorial control of the specificity of protein tyrosine phosphatases. *Curr Opin Cell Biol*. 2001;13:182–195.
56. Gomez R, Simon C, Remohi J, Pellicer A. Vascular endothelial growth factor receptor-2 activation induces vascular permeability in hyperstimulated rats, and this effect is prevented by receptor blockade. *Endocrinology*. 2002;143:4339–4348.
57. Dor Y, Djonov V, Abramovitch R, Itin A, Fishman GI, Carmeliet P, Goelman G, Keshet E. Conditional switching of VEGF provides new insights into adult neovascularization and pro-angiogenic therapy. *Embo J*. 2002;21:1939–1947.
58. Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*. 2000;407:249–257.
59. Behrens J, Vakaet L, Friis R, Winterhager E, Van Roy F, Mareel MM, Birchmeier W. Loss of epithelial differentiation and gain of invasiveness correlates with tyrosine phosphorylation of the E-cadherin/beta-catenin complex in cells transformed with a temperature-sensitive v-SRC gene. *J Cell Biol*. 1993;120:757–766.
60. Chou MT, Wang J, Fujita DJ. Src kinase becomes preferentially associated with the VEGFR, KDR/Flk-1, following VEGF stimulation of vascular endothelial cells. *BMC Biochem*. 2002;3:32.
61. Weis S, Cui J, Barnes L, Cheresch D. Endothelial barrier disruption by VEGF-mediated Src activity potentiates tumor cell extravasation and metastasis. *J Cell Biol*. 2004;167:223–229.

I.3. Discussion

I.3.1. Phosphorylation sur tyrosine de la VE-cadhérine dans le système vasculaire mature

De façon intéressante, nous montrons dans cette étude l'existence d'une forme phosphorylée de la VE-cadhérine chez les souris adultes, fortement détectée dans les poumons, l'utérus, et plus faiblement dans l'ovaire, indiquant que la VE-cadhérine est effectivement un substrat de tyrosine kinases *in vivo*. Les poumons sont un site privilégié d'interaction entre l'endothélium et les macrophages (Brain, J.D. *et al.* 1999). Ceux-ci pourraient donc influencer l'endothélium pulmonaire en relarguant des cytokines inflammatoires, qui pourraient induire la phosphorylation de la VE-cadhérine, expliquant la détection de cette forme phosphorylée dans un tissu non angiogénique.

En revanche, la phosphorylation n'est pas détectable dans les autres tissus, sauf dans le cas où les souris sont traitées par le pervanadate de sodium. Après le traitement, la phosphorylation devient alors détectable dans le cœur, les reins et la rate, et elle est aussi fortement augmentée dans les poumons, alors que le traitement produit moins d'effets sur l'utérus et l'ovaire. Ces résultats suggèrent que la phosphorylation par des tyrosine kinases de la VE-cadhérine est contrebalancée dans l'endothélium quiescent de l'adulte par l'action de tyrosine phosphatases. Cette hypothèse est en accord avec les données *in vitro* qui montrent la perte de la phosphorylation de la VE-cadhérine quand les cellules atteignent la confluence. De plus, ces résultats concordent avec l'augmentation, dépendante de la densité cellulaire, de l'expression et de l'activité de protéines tyrosines phosphatases (PTP) associées aux jonctions intercellulaires (Gaits, F. *et al.* 1995; Sorby, M. *et al.* 1996). Enfin, la PTP VE-PTP a effectivement la capacité d'interagir avec la VE-cadhérine et de neutraliser sa phosphorylation induite par l'activation du VEGF-R2, ainsi que l'augmentation subséquente de la perméabilité (Nawroth, R. *et al.* 2002).

I.3.2. Phosphorylation dans les tissus angiogéniques

Nos expériences révèlent une forte augmentation de la phosphorylation sur tyrosine de la VE-cadhérine au cours de l'angiogenèse induite dans l'ovaire et l'utérus. D'une part, le

VEGF a un rôle crucial au cours de l'angiogenèse dans l'ovaire (Ferrara, N. *et al.* 1998), et d'autre part la préparation de l'endomètre utérin pour l'implantation requiert le processus de néovascularisation (Dor, Y. *et al.* 2002; Ferrara, N. *et al.* 1998). En outre, la stimulation de cellules endothéliales *in vitro* par le VEGF induit la phosphorylation sur tyrosine de la VE-cadhérine. Ainsi, il est probable que l'augmentation du niveau de phosphorylation observé ici au cours de l'angiogenèse induite soit le résultat de l'action du VEGF. En accord avec nos résultats, d'autres auteurs ont rapporté l'augmentation du niveau de phosphorylation de la VE-cadhérine dans le cœur de souris traitées avec du VEGF (Weis, S., Shintani, S. *et al.* 2004).

I.3.3. Association VE-cadhérine-VEGF-R2

Une association entre la VE-cadhérine et le VEGF-R2 a été rapportée *in vitro* dans des cellules endothéliales, sous l'action du VEGF (Carmeliet, P. *et al.* 1999; Grazia Lampugnani, M. *et al.* 2003; Zanetti, A. *et al.* 2002), ou lorsque les cellules sont soumises à un flux (Shay-Salit, A. *et al.* 2002). Dans notre étude, nous démontrons l'existence de cette association *in vivo* dans l'ovaire et l'utérus, après stimulation hormonale. Le mécanisme conduisant à cette association n'est pas connu, toutefois il est probable que le VEGF soit impliqué dans ces interactions. De plus, l'association ne semble pas dépendre du niveau de phosphorylation de la VE-cadhérine, puisque les mêmes résultats ont pu être obtenus en l'absence de pervanadate de sodium.

I.3.4. Association VE-cadhérine-Src

Par des expériences de co-immunoprécipitation, nous avons pour la première fois mis en évidence l'association permanente, *in vitro* et *in vivo*, de la tyrosine kinase Src avec la VE-cadhérine, indépendamment de son niveau de phosphorylation, ou de l'état d'activation de la kinase. En outre, des expériences d'immunofluorescence en microscopie confocale révèlent qu'une quantité importante de Src se trouve aux jonctions endothéliales, où la kinase est colocalisée avec la VE-cadhérine le long de l'axe z. *In vivo*, nous montrons également que le niveau de phosphorylation de Src associée à la VE-cadhérine est fortement augmenté au cours de l'angiogenèse induite chez la souris. *In vitro*, dans les HUVECs stimulées par le VEGF, l'inhibition de Src diminue de manière dose dépendante la phosphorylation de la VE-cadhérine. Ces résultats sont en faveur d'une implication de Src dans cette phosphorylation.

L'association Src/ VEGF-R2 en réponse au VEGF a été démontré (Chou, M.T. *et al.* 2002). Il semble donc plausible que la VE-cadhérine, le VEGF-R2 et Src forment un seul complexe multimérique, plutôt que des complexes séparés.

In vivo, il a été rapporté que l'activité angiogénique du VEGF est dépendante de Src (Eliceiri, B.P., Paul, R. *et al.* 1999), et que Src peut induire la dissociation des jonctions endothéliales (Weis, S., Cui, J. *et al.* 2004). *In vitro*, l'implication de Src dans la dissociation des jonctions endothéliales au cours de la morphogénèse capillaire induite par le collagène a été démontrée (Liu, Y. *et al.* 2004).

L'ensemble de ces éléments suggère que la tyrosine kinase Src joue un rôle majeur dans la déstabilisation des jonctions endothéliales et que la phosphorylation sur tyrosine de la VE-cadhérine pourrait être un événement clé dans l'ouverture de ces jonctions. Il est alors envisageable que le recrutement de Src, par le VEGF-R2, sous l'action du VEGF (Chou, M.T. *et al.* 2002), permette l'activation de Src, qui pourrait finalement phosphoryler la VE-cadhérine.

II. Article 2 : Src kinase phosphorylates vascular endothelial-cadherin in response to vascular endothelial growth factor : identification of tyrosine 685 as the unique target site.

II.1. Introduction

Étant donné l'implication de Src dans la déstabilisation des jonctions à base de VE-cadhérine en réponse au VEGF, et nos résultats montrant son association à la VE-cadhérine, nous avons émis l'hypothèse que Src puisse phosphoryler la VE-cadhérine.

Nous avons donc entrepris de tester si la VE-cadhérine pouvait être un substrat direct de Src au cours de la phosphorylation induite par le VEGF. Pour cela, nous avons co-transfecté des cellules CHO (Chinese hamster ovary) avec l'ADNc de la VE-cadhérine et des dominants positifs ou négatifs de Src. Nous avons également produit le domaine cytoplasmique recombinant de la VE-cadhérine pour réaliser des expériences de phosphorylation *in vitro* avec la kinase Src purifiée.

Par ailleurs, nous avons voulu identifier les tyrosines cibles, phosphorylées en réponse au VEGF, parmi les neuf que comporte le domaine cytoplasmique de la VE-cadhérine. Pour cela, nous avons fait synthétiser des peptides comportant ces différentes tyrosines, qui ont ensuite été testés *in vitro* avec la kinase purifiée. Nous avons également réalisé des cartes phosphopeptidiques de la VE-cadhérine après marquage métabolique au phosphore 32, d'HUVECs, afin d'identifier les sites dans ces cellules stimulées ou non par le VEGF, ou de CHO transfectées par les mutants de Src.

Enfin, nous avons voulu tester l'implication potentielle de la phosphorylation sur tyrosine de la VE-cadhérine dans la migration endothéliale induite par le VEGF. En effet, la migration induite par le VEGF est une étape cruciale de l'angiogenèse à laquelle s'oppose l'activité adhésive des cadhérines. Dans un test de blessure d'HUVECs, l'addition de VEGF accélère le processus de recouvrement, en accord avec le rôle du VEGF dans la déstabilisation des jonctions endothéliales. La réparation de blessure est d'ailleurs un test fonctionnel pour évaluer l'activité adhésive des cadhérines (Lampugnani, M.G. 1999). Nous avons observé la vitesse de recouvrement de la blessure induite par le VEGF en inhibant ou non la phosphorylation de la VE-cadhérine grâce aux inhibiteurs de la famille Src.

II.2. Article

ORIGINAL ARTICLE

Src kinase phosphorylates vascular endothelial-cadherin in response to vascular endothelial growth factor: identification of tyrosine 685 as the unique target siteY Wallez¹, F Cand¹, F Cruzalegui², C Wernstedt³, S Souchelnytskyi³, I Vilgrain¹ and P Huber¹¹Laboratoire Développement et Vieillessement de l'Endothélium, Département Recherche et Dynamique Cellulaires, Université Joseph Fourier, Grenoble, Inserm, Grenoble, France; ²Institut de Recherches SERVIER, Centre de Croissy, Chemin de Ronde, Croissy sur Seine, France and ³Ludwig Institute for Cancer Research, Biomedical Center, Uppsala, Sweden

Src-family tyrosine kinases are regulatory proteins that play a pivotal role in the disorganization of cadherin-dependent cell–cell contacts. We previously showed that Src was associated with vascular endothelial (VE)-cadherin and that tyrosine phosphorylation level of VE-cadherin was dramatically increased in angiogenic tissues as compared to quiescent tissues. Here, we examined whether VE-cadherin was a direct substrate for Src in vascular endothelial growth factor (VEGF)-induced VE-cadherin phosphorylation, and we identified the target tyrosine sites. Co-transfections of Chinese hamster ovary cells (CHO) cells with VE-cadherin and constitutively active Src (Y530F) resulted in a robust tyrosine phosphorylation of VE-cadherin that was not detected with kinase-dead Src (K298M). In an *in vitro* Src assay, the VE-cadherin cytoplasmic domain is directly phosphorylated by purified Src as well as the tyrosine residue 685 (Tyr)685-containing peptide RPSLY⁶⁸⁵AQVQ. VE-cadherin peptide mapping from human umbilical vein endothelial cells stimulated by VEGF and VE-cadherin-CHO cells transfected with active Src revealed that Y685 was the unique phosphorylated site. The presence of PhosphoY685 was confirmed by its ability to bind to C-terminal Src kinase-SH2 domain in a pull-down assay. Finally, we found that in a VEGF-induced wound-healing assay, cadherin adhesive activity was impaired by Src kinase inhibitors. These data identify that VEGF-induced-VE-cadherin tyrosine phosphorylation is mediated by Src on Y685, a process that appears to be critical for VEGF-induced endothelial cell migration.

Oncogene advance online publication, 14 August 2006; doi:10.1038/sj.onc.1209855

Keywords: angiogenesis; adherens junctions; VE-cadherin; tyrosine kinases

Introduction

A growing number of diseases, such as cancer, chronic inflammation and diabetic retinopathy, are characterized by excess angiogenesis. Progression of these diseases may depend on the attraction of blood vessels to oxygenate and nurture the growing tissue. Among the tumor-derived growth factors, vascular endothelial growth factor (VEGF)-A is a key angiogenic factor most frequently used by tumors and other tissues to switch on their angiogenic phenotypes (Eriksson and Alitalo, 1999). The angiogenic signals triggered by members of the VEGF family are mainly mediated by the activation of two homologous tyrosine kinase receptors, VEGF receptor, VEGFR-1 and VEGFR-2, both of which are expressed on blood vessel endothelial cells (Mustonen and Alitalo, 1995). VEGF-A binds to VEGFR1 and VEGFR2, and induces vasculogenesis, angiogenesis and vascular permeability.

Endothelial adherens junctions are adhesive intercellular contacts that are crucial for the maintenance and regulation of normal microvascular function (Dejana *et al.*, 1995). Alterations in adherens junction assembly influence endothelial cell motility, vascular morphogenesis and permeability. Moreover, recent studies indicate that components of adherens junctions also participate to intracellular signaling, suggesting that these complexes are plasma membrane domains integrating chemical and mechanical signaling information (Corada *et al.*, 1999). The major cell–cell adhesion molecule at endothelial adherens junctions is VE-cadherin, a cadherin family member specifically expressed in endothelial cells (Lampugnani *et al.*, 1995; Corada *et al.*, 1999). The inactivation of the corresponding gene induced an early lethal phenotype in the mouse. VE-cadherin^{−/−} endothelial cells were still able to form the primitive vascular plexus, but vascular remodelling was missing, suggesting the importance of VE-cadherin in angiogenesis during early development (Vittet *et al.*, 1997; Gory-Faure *et al.*, 1999). In adult, the adhesive properties of VE-cadherin are crucial to maintain endothelial cells adherent to one another (Lampugnani *et al.*, 1995). In addition to its role in cell–cell adhesion, VE-cadherin was shown to be required for transduction

Correspondence: Dr I Vilgrain, Inserm EMI 0219, Laboratoire de Développement et Vieillessement de l'Endothélium, Département Recherche et Dynamique Cellulaires, Université Joseph Fourier, CEA Grenoble, 17, rue des Martyrs, ISERE, 38054 Grenoble Cedex 9, France.

E-mail: ivilgrain@cea.fr

Received 3 January 2006; revised 15 May 2006; accepted 23 June 2006

of the VEGF survival pathway (Carmeliet *et al.*, 1999). The cytoplasmic domain of VE-cadherin comprises the juxtamembrane domain that binds to the p120 catenin, a protein of the armadillo family, and the carboxyl-terminal domain that interacts with β -catenin or plakoglobin (Lampugnani *et al.*, 1995). This cytoplasmic domain of VE-cadherin was shown to regulate endothelial protrusive activity *in vitro*, suggesting that this domain may play a prominent part in invasive processes (Kouklis *et al.*, 2003).

Tyrosine phosphorylation of the cadherin–catenin complex has been proposed as a mechanism that regulates the stability of cell–cell junctions. Interestingly, the cytoplasmic domain of VE-cadherin contains nine tyrosine that represent potential target sites for tyrosine kinases. Indeed, VE-cadherin tyrosine phosphorylation has been reported in endothelial cells under several conditions including stimulation by VEGF (Esser *et al.*, 1998; Zhao and Davis, 1998; Shasby *et al.*, 2002; Su *et al.*, 2002). We recently reported that platelet-activating factor (PAF) increased VE-cadherin tyrosine phosphorylation in mouse endothelial cells and its association with the phosphatidylinositol 3'-(PtdIns3')-kinase (Hudry-Clergeon *et al.*, 2005). This covalent modification was correlated with PAF induced cell–cell disruption possibly through alteration in adherens junction composition. Furthermore, we showed that VE-cadherin was tyrosine phosphorylated *in vivo* in mice in ovaries and uterus subjected to hormonal induction, in correlation with the angiogenic switch observed in these tissues. Importantly, VE-cadherin tyrosine phosphorylation was weak or undetectable in endothelial cells from resting tissues (Lambeng *et al.*, 2005). Therefore, modulation of the tyrosine phosphorylation status of VE cadherin would be critical for regulating angiogenesis, and permeability (Wallez *et al.*, 2006).

The cytoplasmic tyrosine kinases of the Src family play important roles in mitogenic responses induced by growth factor. Src kinase has been found both over-expressed and highly activated in a number of human cancers, and may play an important role in the acquisition of the invasive and metastatic phenotype (Cartwright *et al.*, 1990, 1994; Talamonti *et al.*, 1993; Verbeek *et al.*, 1996; Lutz *et al.*, 1998; van Oijen *et al.*, 1998). Upon activation, Src kinase phosphorylated multiple substrates, including paxillin (Turner, 1990), p130cas (Nakamoto *et al.*, 1996) and focal adhesion kinase (FAK) (Calalb *et al.*, 1995), and is required for cell adhesion (Verbeek *et al.*, 1996), cell spreading (Kaplan *et al.*, 1995) and turnover of focal adhesions (Fincham and Frame, 1998). More recently, evidence showing an important role of Src kinase in the activation of angiogenesis, especially in regulating vascular permeability, has emerged (Eliceiri *et al.*, 1999). In addition, the presence of Src family tyrosine kinases in cadherin-containing adherens junctions has been reported (Tsukita *et al.*, 1991). Importantly, we found an *in vivo* association of VE-cadherin with Src kinase in mouse tissues (Lambeng *et al.*, 2005). Moreover, the role for Src in angiogenesis has been shown using the resveratrol, which impaired VEGF-induced

endothelial cells tube formation and VE-cadherin tyrosine phosphorylation (Lin *et al.*, 2003). Altogether, these reports from the literature suggest a potential regulation of VE-cadherin by Src kinase. Two recent reports of the literature have identified several VE-cadherin tyrosine phosphorylation sites in several conditions. Baumeister *et al.* (2005) reported that C-terminal Src kinase (Csk) could interact with VE-cadherin once phosphorylated on Y685. In contrast, upon tyrosine phosphatases inhibitors treatment, other sites were found to be phosphorylated in the VE-cadherin from human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) (Potter *et al.*, 2005). Thus, actually the identity of the phosphorylation sites in human VE-cadherin as well as the kinases operating this phosphorylation remains elusive.

Two goals prompted the present work. One was to examine whether VE-cadherin was a direct substrate for Src kinase and the other was to identify the phosphorylated site(s) *in vitro* by Src kinase and in endothelial cells in response to VEGF stimulation. Our data clearly showed that Src kinase was responsible for VE-cadherin tyrosine phosphorylation in response to VEGF and that Y685 was the specific site for Src kinase in the VE-cadherin cytoplasmic domain. Moreover, we show that this process appears to be critical for VEGF-induced endothelial cell migration.

Results

Tyrosine phosphorylation of VE-cadherin is induced by active Src in CHO cells

We reasoned that VE-cadherin could be a direct substrate of Src for two reasons: (i) Src is associated with VE-cadherin *in vivo* and *in vitro*; and (ii) VEGF-induced VE-cadherin tyrosine phosphorylation is Src-dependent.

To explore this possibility, we used VE-cadherin-transfected Chinese hamster ovary cells (CHO) cells (Figure 1a) (Breviario *et al.*, 1995) that were transiently transfected either with constitutively active Src (Y530F), with kinase-dead Src (K298M) or with the empty vector. Immunoblotting of untransfected cells with the anti-Src antibody showed the presence of Src kinase in CHO cells. Transfection of Src kinase resulted in increased total Src expression (Figure 1b, below).

The VE-cadherin tyrosine phosphorylation levels were analysed by immunoprecipitation and immunoblotting with an anti-P-tyr antibody. The tyrosine-phosphorylated form of the human VE-cadherin was detected in cells transfected with constitutively active Src (Y530F) (Figure 1b). In untransfected cells, a trace amount of phosphorylated VE-cadherin could be detected but not in extracts of cells transfected by the empty vector or by Src-K298M. This is probably owing to a lower amount of VE-cadherin in the immunoprecipitated samples (Figure 1b, middle panel). These data indicate that active Src kinase induces VE-cadherin tyrosine phosphorylation in a heterologous cell system.

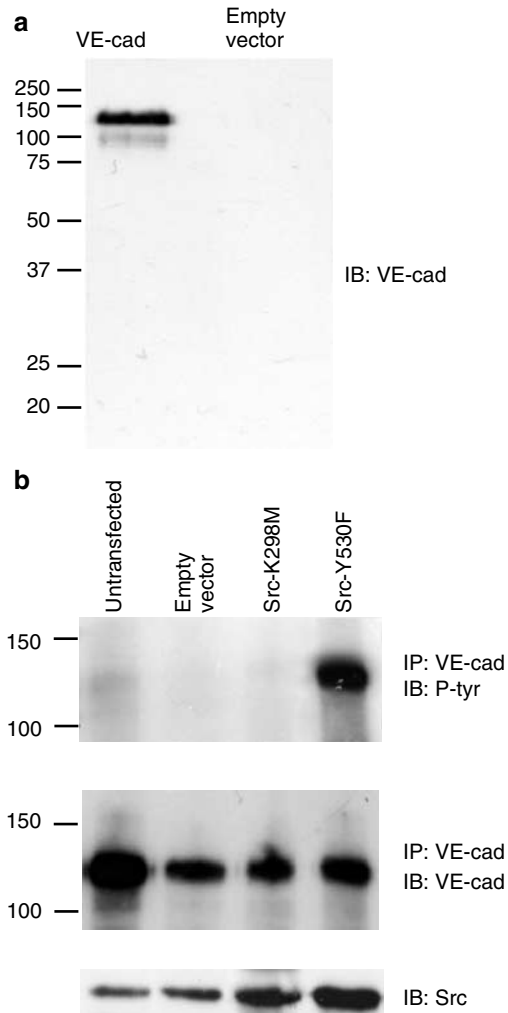


Figure 1 Effect of Src kinase expression on VE-cadherin phosphorylation in CHO cells. **(a)** VE-cadherin expression in CHO cells transfected either with VE-cadherin cDNA (left lane) or the empty vector (right lane). **(b)** VE-cadherin tyrosine phosphorylation in VE-cadherin-CHO cells transfected either with constitutively active Src (Y530F), kinase-dead Src (K298M) or the empty vector. Untransfected VE-cadherin-CHO cells are shown in control. VE-cadherin immunoprecipitates were successively revealed with anti-P-Tyr (top) and anti-VE-cadherin (middle) antibodies. Additionally, the efficiency of transfection by Src was assessed by immunoblotting the whole-cell lysates with an anti-Src-antibody (below).

Direct phosphorylation of the human VE-cadherin cytoplasmic domain by Src kinase

To know whether VE-cadherin was directly phosphorylated by Src, we performed an *in vitro* kinase assay. We produced the human recombinant VE-cadherin cytoplasmic domain by *in vitro* translation. The first nine amino acids, containing a highly basic domain (and no tyrosine), were omitted to allow a correct level of expression in this system. A His-tag was included at the N-terminus to identify the recombinant protein with anti-His antibodies (Figure 2a, left panel). A kinase assay was performed in the absence or in the presence of active Src and the reaction products were analysed by sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis

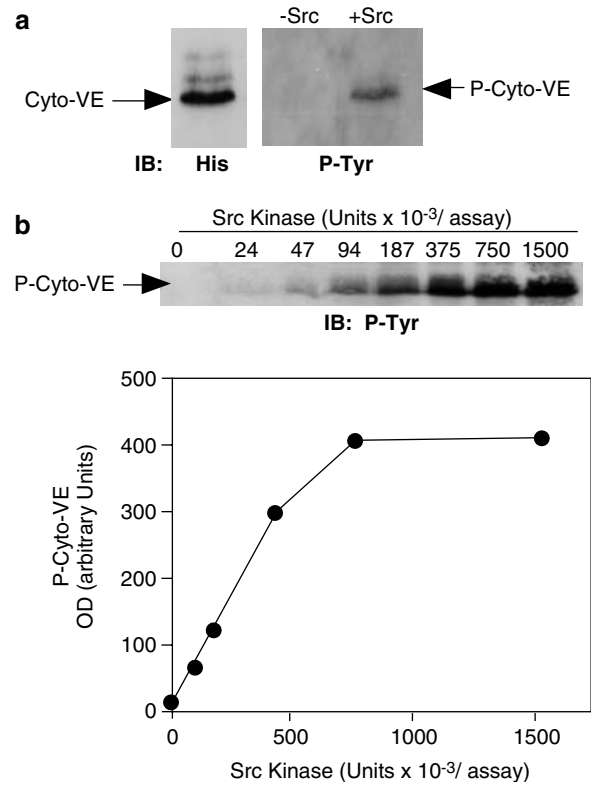


Figure 2 *In vitro* phosphorylation of VE-cadherin cytoplasmic domain by Src. **(a)** The VE-cadherin cytoplasmic domain (A630–Y784), carrying a His-tag at the N-terminus, was produced by *in vitro* translation. The translated products were immunoblotted with anti-His-tag antibodies. The *in vitro* translated products were incubated in the presence or absence of Src as indicated. Tyrosine phosphorylation was revealed by anti-P-Tyr immunoblotting. **(b)** The VE-cadherin cytoplasmic domain was incubated with increasing concentrations of purified Src (0.024–1.5 U); phosphorylation levels were revealed with anti-P-Tyr antibodies (top) and signals were quantified by densitometry (below).

(SDS–PAGE) and immunoblotting with the anti-P-tyr antibody. The tyrosine-phosphorylated form of the VE-cadherin cytoplasmic domain was detected after incubation with purified Src, whereas no signal was detected in the absence of the kinase (Figure 2a, right panel). In addition, incubations with increasing concentrations of Src kinase units showed a dose-dependent phosphorylation of the VE-cadherin cytoplasmic fragment (Figure 2b). Altogether, these results demonstrate that the recombinant VE-cadherin cytoplasmic domain is a direct substrate for Src kinase.

Phosphorylation of synthetic peptides containing each tyrosine of VE-cadherin cytoplasmic domain

We wished to determine which of the tyrosine residues could serve as potential phosphorylation sites (Figure 3a), thus we designed synthetic peptides representing every of all the nine possible tyrosine phosphorylation sites (Figure 3b). Although it is highly unlikely that all of these tyrosine residues are phosphorylated in response to VEGF stimulation, these peptides were used as a starting point to reveal the sites

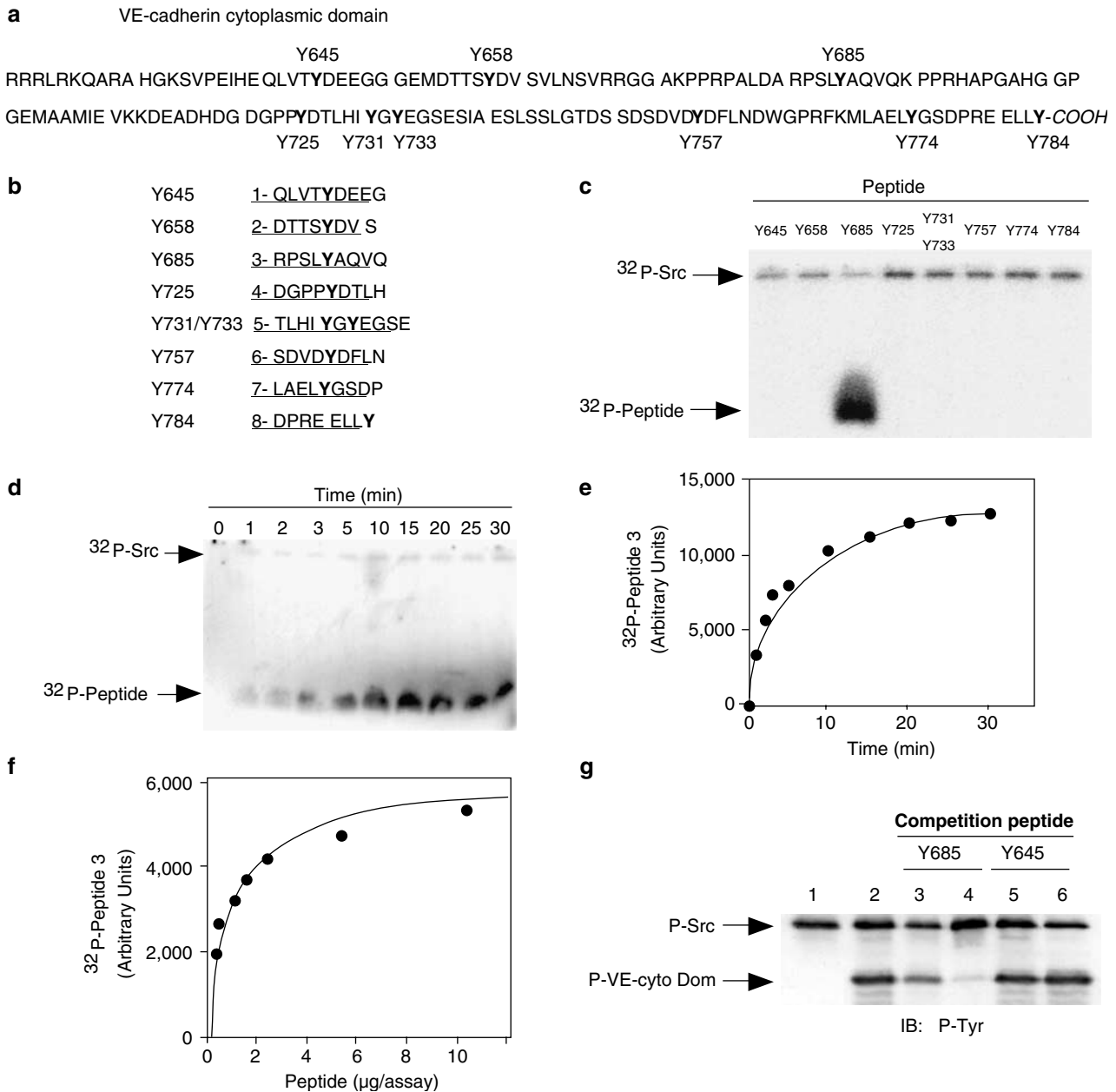


Figure 3 Tyrosine phosphorylation of synthetic peptides containing each tyrosine of VE-cadherin cytoplasmic domain (a) Amino acid sequence of human VE-cadherin cytoplasmic domain showing the nine putative tyrosine phosphorylation sites (bold). (b) Sequences of the eight synthetic peptides that were used for phosphorylation experiments. (c) Each peptide (2 μg) was incubated in a kinase assay in the presence of active Src (0.25 IU) and [γ - 32 P]ATP. The samples were analysed by SDS-PAGE on a 22% acrylamide gel and the radioactive peptides were visualized by autoradiography. Arrows indicate the autophosphorylation of Src (60 kDa) and the phosphopeptide. (d) A kinetic study of the phosphorylation of the peptide containing the Tyr685 was performed up to 30 min. (e) The radioactive peptide spots were quantified using a PhosphorImager and the values were plotted against incubation time. (f) Dose-response of phosphorylation of the Tyr685-containing peptide. (g) Competition assay: VE-cadherin cytoplasmic domain (VE-cyto Dom) was incubated with Src kinase (0.25 IU) and ATP, in the presence of either the Tyr 685-peptide (lanes 3 and 4) or the Tyr 645-peptide (lanes 5 and 6). Peptide concentration was either 1 μg (lanes 3 and 5) or 50 μg (lanes 4 and 6). VE-cadherin cytoplasmic domain was omitted in lane 1. Reaction products were analysed by immunoblotting with the anti-P-Tyr antibody.

that could potentially be phosphorylation targets. All the synthetic peptides were subjected to an *in vitro* kinase assay with purified Src and [γ - 32 P]ATP. The reaction products were analysed by electrophoresis and autoradiography. Interestingly, as shown in Figure 3c,

only the peptide comprising tyrosine residue 685 (Tyr685) (Y685) was strongly phosphorylated by Src. A kinetic study of the rate of phosphorylation was performed and showed that peptide phosphorylation was rapidly detected after 1 min incubation, which is

increased linearly up to 10 min and reached a plateau between 15 and 30 min (Figure 3d and e). A dose-response phosphorylation reaction showed that peptide phosphorylation was already detected with 0.5 μ g of peptide (Figure 3f).

A competition experiment was performed between the VE-cadherin cytoplasmic domain and the peptide comprising the Y685. Samples were analysed by electrophoresis and analysed by immunoblotting with anti-P-tyrosine antibody. As illustrated in Figure 3g, the peptide comprising the Tyr685 efficiently competed with the VE-cadherin cytoplasmic domain for its phosphorylation. In contrast, the peptide comprising the Y645, which was not a target for Src, did not compete with the VE-cadherin cytoplasmic domain.

Altogether, these results show that, among the nine tyrosine residues of VE-cadherin cytoplasmic domain, Y685 is a highly specific target for Src *in vitro*.

Identification of VE-cadherin Y685 as phosphorylation target site in VEGF-activated HUVECs

To expand the data obtained with the peptides, we wished to determine which of the cytoplasmic tyrosine residues could serve as potential phosphorylation sites in HUVECs in response to VEGF. Therefore, we performed a phosphopeptide map analysis after VE-cadherin immunoprecipitation from VEGF-activated HUVECs. 32 P-labeled HUVECs were stimulated by VEGF (50 ng/ml) for 30 min in the presence or absence of SU6656, a specific inhibitor of Src kinase activity. Stimulation of HUVECs with VEGF resulted in strong induction of VE-cadherin phosphorylation, as estimated by autoradiography (Figure 4a). This induction was abolished by SU6656. Correct molecular mass of the labeled bands was attested by co-migration of HUVEC extracts and revelation with anti-VE-cadherin antibodies (Figure 4a).

The radioactive bands corresponding to VE-cadherin were excised from the gel and submitted to proteolysis with trypsin. Trypsin-digested VE-cadherin peptides were separated by electrophoresis according to the charge/mass ratio (x axis) and by liquid chromatography according to hydrophobicity (y axis), creating a phosphopeptide map. In this analysis, a corresponding increase in phosphorylation was detected in a unique trypsin-generated peptide from phosphorylated VE-cadherin in VEGF-treated cells (Figure 4b). Densitometric analysis of the phospho-peptide showed an increase in its level of phosphorylation upon VEGF stimulation, whereas it was strongly decreased by SU6656 treatment of the cells (Figure 4c).

Position of phosphorylated residues. The peptide giving a reproducible spot in the phosphopeptide maps was extracted, hydrolysed in hydrochloric acid and separated by two-dimensional electrophoresis on thin-layer plates. The phosphorylated peptide (circled in Figure 4b) was subjected to Edman degradation. The material in each cycle was spotted individually on thin-layer chromatography plates and the 32 P content in each

fraction was quantified after exposure and detection using a BioImager. The positions of the radioactive peaks were the basis for tentative identification of a tryptic peptide containing a tyrosine residue in the corresponding position. Numbers of consecutive cycles in the Edman degradation and tentative alignment of tyrosine residues in tryptic VE-cadherin peptide with the radioactive peaks are indicated in (Figure 4d, left panel). Amino-acid analysis of the radioactive peak showed that it contained a tyrosine residue (Figure 4d, right panel). Thus, it was concluded that the Y685 was the only phosphorylated tyrosine in VE-cadherin after HUVECs activation with VEGF.

Identification of VE-cadherin phosphorylation site in transfected CHO cells

To confirm that Y685 phosphorylation in a cell system was Src-dependent, we performed the same experiment as above with CHO cells transfected with both VE-cadherin and either active Src (Y530F) or kinase-dead Src (K298M). VE-cadherin immunoprecipitates from 32 P-labeled CHO cells transfected with constitutively active Src showed a much stronger radioactive signal than those transfected with kinase-dead Src, thereby confirming that active Src induced VE-cadherin phosphorylation (Figure 5a and b). The phosphopeptide map of CHO-derived VE-cadherin was essentially indistinguishable from that of the endogenous protein in VEGF-activated HUVECs (Figure 5c). Edman degradation of the radioactive peptide led to identify the Y685 as the only phosphosite in VE-cadherin in active Src-transfected CHO cells.

Furthermore, we performed pull-down experiments with the SH2 domain of Csk, which is known to bind to the phosphorylated Y685 of VE-cadherin (Baumeister *et al.*, 2005). Lysates from VE-cadherin-transfected CHO cells, transfected either with active Src (Y530F) or the empty vector, were incubated with glutathione-S-transferase (GST) alone or GST fused to the Csk-SH2 domain pre-incubated with glutathione-sepharose beads. Proteins were separated by SDS-PAGE and immunoblotted with the anti-VE-cadherin antibody. No binding was observed with recombinant GST alone. Importantly, VE-cadherin binding to Csk-SH2 domain was highly enhanced in active Src-transfected CHO cells (Figure 5d). As Csk specifically binds to VE-cadherin phospho-Y685, our data further confirm that Y685 is the Src target site in VE-cadherin cytoplasmic domain.

Altogether, these results demonstrate that, in transfected CHO cells, Src-induced VE-cadherin phosphorylation on the same tyrosine as that phosphorylated in VEGF-activated HUVECs.

Inhibition of VE-cadherin tyrosine phosphorylation reduces VEGF-induced HUVECs migration

As SU6656 inhibits Tyr685 phosphorylation of VE-cadherin, we thus examined the effects of SU6656 and PP2 on the VEGF-enhanced endothelial cells migration, a critical step in the process of angiogenesis. When confluent and quiescent monolayers of HUVECs were

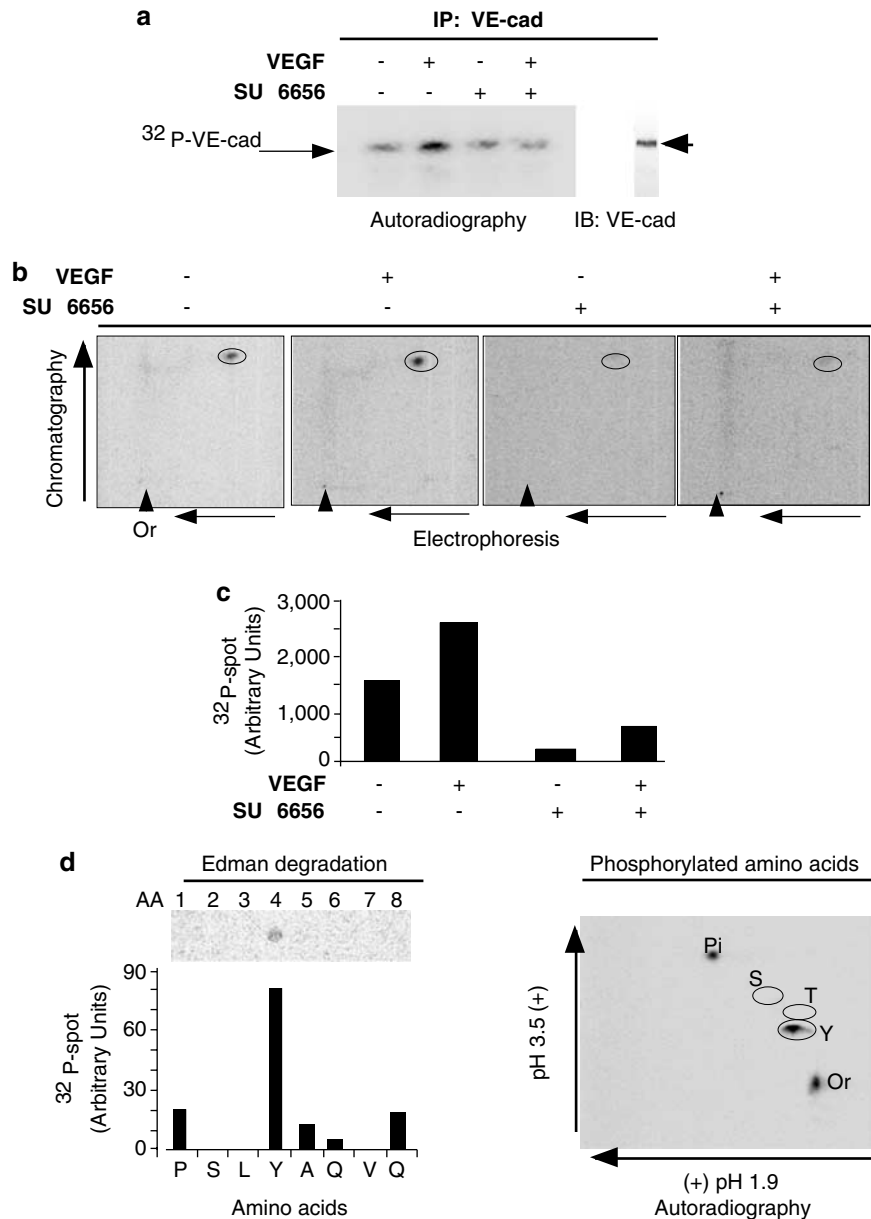


Figure 4 VE-cadherin phosphorylation sites in VEGF-activated HUVECs. Phosphopeptide mapping, radioactive amino-acid sequencing and phospho-amino-acid analyses of VE-cadherin were performed on VE-cadherin immunoprecipitates from metabolically labeled HUVECs. Cells were incubated with VEGF (for 30 min) in the presence or absence of Src inhibitor SU6656 (for 2 h), as indicated. **(a)** In each condition, ^{32}P -labeled-VE-cadherin was immunoprecipitated, transferred onto nitrocellulose membrane and autoradiographed (left panel). Unlabeled extracts were comigrated and immunoblotted with VE-cadherin antibodies to confirm correct molecular mass (right panel). **(b)** Trypsin treatment of the VE-cadherin band on the membrane was followed by separation in two dimensions (electrophoresis followed by chromatography) on a cellulose thin-layer plate. A single phosphorylated peptide (circled) was present in each condition. **(c)** Radioactive counting of the peptide indicated above. **(d)** Radioactive amino-acid sequence of the above phosphopeptide. The number of consecutive cycles in the Edman degradation and tentative alignment of tyrosine residues in tryptic VE-cadherin peptides with the radioactive peaks are indicated (left). The corresponding phospho-amino-acid analysis is inserted on the right. Positions of reference phospho-serine (S), phospho-threonine (T) and phospho-tyrosine (Y) are circled. Migration position of inorganic phosphate is indicated (Pi). Directions of electrophoresis and chromatography are shown on the sides of maps. Application points are indicated (Or). The data shown here are representative of three independent experiments.

wounded, recovery of these monolayers stimulated by VEGF initially depends on migration only, because proliferation of endothelial cells in response to wounding does not start before 24 h (Lauder *et al.*, 1998). HUVECs were grown on fibronectin-coated dishes and

were subsequently scraped to create a wound. The dishes were observed at the time of wounding and every 3 h and up to 12 h of culture in the presence of VEGF (50 ng/ml). Phase-contrast micrographs are presented in Figure 6. As shown in Figure 6a, repair of endothelial

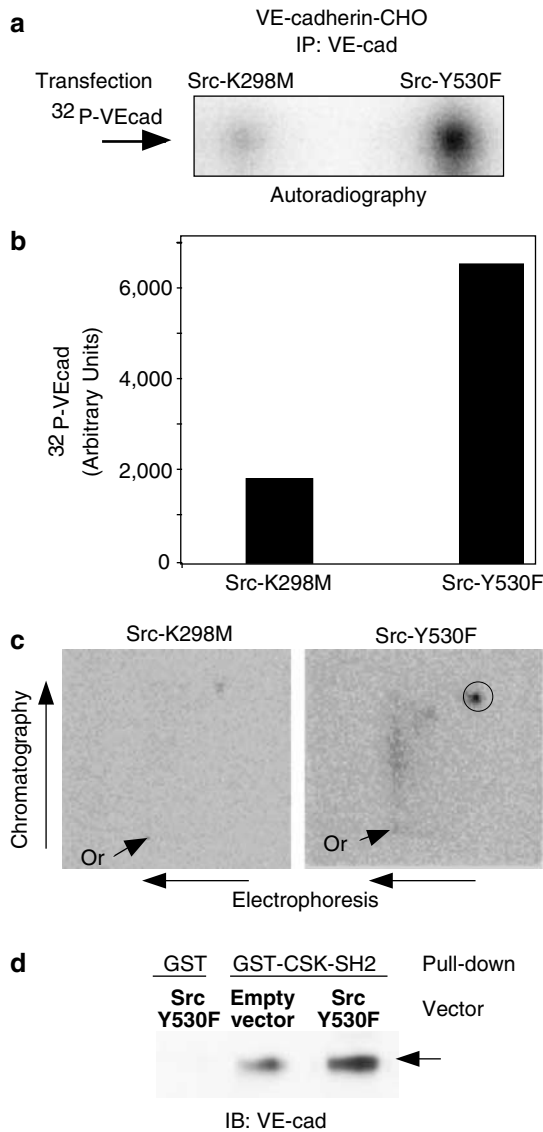


Figure 5 VE-cadherin phosphorylation sites in VE-cadherin-CHO cells transfected by Src. Similar experiments as those described in Figure 5 were performed with VE-cadherin-CHO cells transfected either with active Src (Y530F) or kinase-dead Src (K298M). (a) Autoradiography showing ^{32}P incorporation in VE-cadherin in both conditions. (b) Quantitative analysis of radioactive bands shown above. (c) Tryptic phosphopeptide map of radioactive bands showed a single radioactive peptide (circled) only when cells were transfected with active Src. Edman degradation indicated that the phosphorylated peptide was the same as in HUVECs (not shown). (d) Monitoring of Y685 phosphorylation by interaction with Csk-SH2 domain in GST-pull-down experiments. GST or GST fused to Csk-SH2 domain (GST-CSK-SH2) were preabsorbed on glutathione beads and incubated with extracts from VE-cadherin-CHO cells transfected either with active Src (SrcY530F) or the empty vector. Precipitates were analysed by SDS-PAGE and immunoblotted with the anti-VE-cadherin antibody. The arrow indicates the VE-cadherin band.

monolayer was accelerated by VEGF and the lesioned area recovered almost completely within 12 h of culture. When the cells were wounded and then stimulated by VEGF for 12 h in the presence of SU6656 (Figure 6b) or PP2 (Figure 6c), the VEGF-induced repair of HUVEC

monolayers was impaired and this effect was dependent on increasing concentrations of Src kinase inhibitors. These data indicate that pharmacological inhibition of Src kinase alters VEGF-induced endothelial cell migration in correlation with VE-cadherin tyrosine phosphorylation.

DISCUSSION

Tyrosine phosphorylation of VE-cadherin has been described in cells stimulated by several agents such as VEGF, thrombin, histamine, PAF and it was correlated with a rapid dissociation of adherens junctions, a critical step in angiogenesis and in inflammatory processes (Esser *et al.*, 1998; Zhao and Davis, 1998; Calcerrada *et al.*, 2002; Shasby *et al.*, 2002; Hudry-Clergeon *et al.*, 2005). Yet, the specific tyrosine kinases involved in this process and the target sites of phosphorylation were still elusive. In this report, we present evidences showing that VE-cadherin is a direct substrate for Src kinase in VEGF signaling pathway and that Y685 is a unique phosphorylated site in VE-cadherin cytoplasmic domain.

VE-cadherin cytoplasmic domain is phosphorylated by Src on Tyr685

The involvement of Src tyrosine kinase in VEGF-induced angiogenesis has been demonstrated by using dominant-negative Src or the tyrosine kinase Csk to block VEGF-induced blood vessel formation in mice (Eliceiri *et al.*, 1999). This suggests that Src kinase functions as a component of the VEGF-receptor signaling pathway. Previous studies of our laboratory showed that Src and VE-cadherin were constantly associated in HUVECs as well as in mouse tissues. Our present study showed that the VE-cadherin cytoplasmic domain is tyrosine phosphorylated by purified Src kinase in an *in vitro* kinase assay, in a time- and dose-dependent manner. These data support the notion that Src could directly phosphorylate VE-cadherin *in vivo*. How Src interacts with VE-cadherin is unknown; however, it is important to note that a PXXP sequence is present in the cytoplasmic domain of VE-cadherin ($^{673}\text{PPRP}^{676}$) that could well support association of VE-cadherin to the SH3 domain of Src (Boggon and Eck, 2004) and could constitute the basis for the observed physical and functional links between Src and VE-cadherin.

We demonstrated that Y685 (LY⁶⁸⁵AQV) was the unique target site for Src kinase in human VE-cadherin by four means: (i) *in vitro*, using a synthetic peptide approach, (ii) by VE-cadherin peptide mapping from HUVECs stimulated by VEGF, (iii) in VE-cadherin CHO cells co-transfected with active Src and (iv) by probing the phospho-VE-cadherin with the Csk-SH2 domain. Interestingly, the LY⁶⁸⁵AQV sequence fits the YxxV/I/L motif, which is a consensus site for phosphorylation by Src kinases (Lindquist *et al.*, 2003). Altogether, these data suggest that, in VEGF signaling

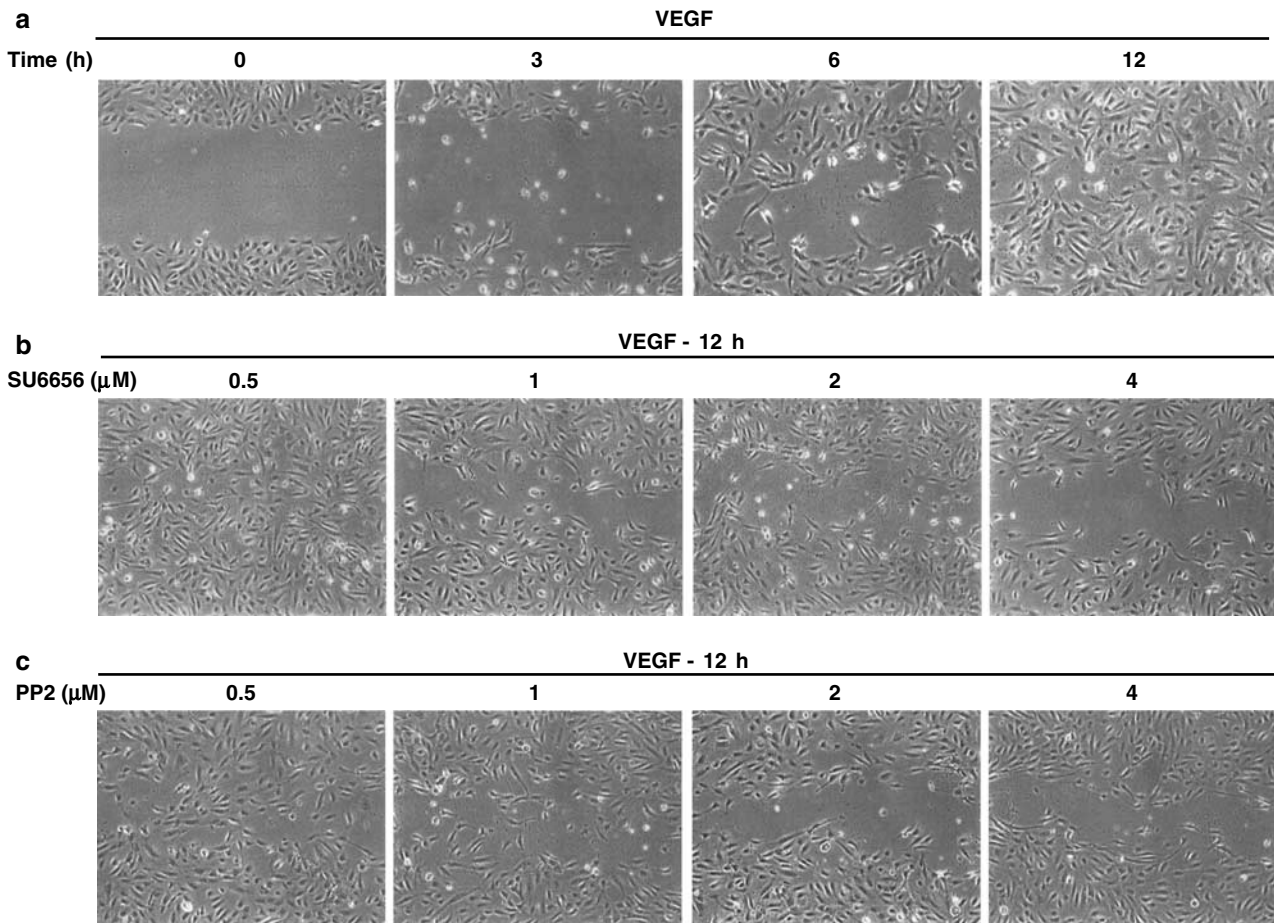


Figure 6 Effect of Src inhibitors on VEGF-induced HUVEC migration. HUVECs were grown on fibronectin-coated plates for 3 days to reach confluence. Monolayers were then scraped with a sterile disposable cell scraper to create scratch wounds. After injury of the monolayer, the cells were washed, stimulated by VEGF (50 ng/ml) and observed at different time points (a). Similar experiments were performed in presence of SU6656 (b) or PP2 (c) at indicated concentrations and observed after 12 h. Therefore, images of the middle and lower panels have to be compared to the image on the right of the upper panel. Photographs were taken under $\times 400$ magnification. These data are representative of three additional experiments.

pathway, VE-cadherin-Y685 phosphorylation by Src may represent an important mechanism of regulation of VE-cadherin biological functions.

The covalent modification of the specific tyrosyl residues in growth factor receptors and in signaling molecules is involved in cellular communication (Pawson, 2004). A conserved domain of about 100 amino acids, the SH2 domain, specifically recognizes and binds to phosphotyrosine, thereby promoting interactions of activated receptors and signaling molecules together (Pawson, 2004). Indeed, Baumeister *et al.* (2005) reported that, upon VE-cadherin phosphorylation, the SH2 domain of Csk binds to phosphorylated Y685 of VE-cadherin, in yeast and in CHO cells (Baumeister *et al.*, 2005). These data are in agreement with our own findings showing that Y685 is phosphorylated upon VEGF stimulation. In addition, we demonstrated that Csk-SH2 domain binding to VE-cadherin was highly enhanced in active Src-transfected CHO cells. Therefore, we concluded that the recruitment of Csk by VE-cadherin was induced by Src. As Csk is a negative regulator of Src activity, its recruitment to

VE-cadherin might represent an efficient process to regulate VE-cadherin tyrosine phosphorylation level. More recently, Potter *et al.* (2005) reported that either active Src or phosphatases inactivation may lead to VE-cadherin phosphorylation on Y658 and Y731, but not Y685, which appears inconsistent with our own data (Potter *et al.*, 2005). However, in this case, VE-cadherin phosphorylation was not the result of VEGF stimulation; it is thus possible that other tyrosines than Y685 are phosphorylated in different cell culture conditions. None of these two previous studies clearly established that VE-cadherin was a direct substrate of Src. Our study provides evidence for a direct involvement of Src in VE-cadherin tyrosine phosphorylation on Y685 in response to VEGF. Thus we conclude that the early VE-cadherin-related response in the VEGFR2 activation cascade is mediated by Src kinase.

VE- and N-cadherins share high homology in their cytoplasmic domains. N-cadherin is also tyrosine phosphorylated by Src on Y851 and Y883, which correspond to VE-cadherin tyrosine residues (Y725 and Y757, respectively) that are not phosphorylated.

Interestingly, VE-cadherin Y685 has no homology with other tyrosines in the N-cadherin sequence. Thus, although VE- and N-cadherin cytoplasmic sequences are highly homologous, our data suggest that their regulation mechanisms might be different.

Inhibition of endothelial cell migration by Src blockers

One of the functional assays used to evaluate cadherin adhesive activity is the *in vitro* wound-healing test (Lampugnani, 1999). In such test, increased cadherin adhesive activity at intercellular contacts is correlated with reduced healing, which is consistent with the role of cadherins in the inhibition of cell detachment. The addition of VEGF on HUVECs increased the rate of monolayer recovery, in agreement with the role of VEGF in endothelial junction disruption. In this assay, we showed that Src inhibitors prevented VEGF-induced healing, indicating that one of the effect of VEGF on endothelial cells, namely the decrease in adhesive homotypic activity, is mediated by Src. A salient finding of the present paper is that VEGF-induced VE-cadherin-Y685 phosphorylation is blocked by the specific Src kinase inhibitor SU6656. These results suggest that phosphorylation of Y685 in VE-cadherin in response to VEGF may be a key player in the intracellular signaling involved in migration process of endothelial cells. Although we do not exclude the possibility that the inhibition of Src might have other effects independently of the inhibition of VE-cadherin Y685 phosphorylation (i.e., inhibition of VEGF-induced FAK phosphorylation) (Abu-Ghazaleh *et al.*, 2001), the fact that VE-cadherin is the major adhesive protein of adherens junctions in endothelial cells supports the argument that VEGF-induced VE-cadherin phosphorylation mediated via Src contributes to the inhibition of adhesive properties of endothelial cells.

Conclusions

VE-cadherin plays a key role in endothelial permeability and inflammation, and thus it is implicated in numerous physiological or pathological situations including angiogenesis. As endothelial cell invasion is a central process in angiogenesis and as angiogenesis is required for tumor growth, the inhibition of VE-cadherin phosphorylation on Y685 may represent a relevant therapeutic target in cancer and in inflammatory diseases.

Materials and methods

Antibodies

We used the following commercially available antibodies: for immunoprecipitation, the antibody against the human intracellular domain of VE-cadherin (C-19, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), and for immunoblotting, the mouse monoclonal antibody to human VE-cadherin (clone BV9) (Corada *et al.*, 2001) or the C-19 antibody, and the monoclonal anti-phosphotyrosine (P-Tyr) antibody (clone

4G10) (Euromedex, Mundolsheim, France). As secondary antibodies, the horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse and anti-goat immunoglobulin G antibodies (Bio-Rad Laboratories, Marnes la Coquette, France).

Reagents

Recombinant human VEGF 165 was from PeproTech Inc (Rocky Hill, NJ, USA). Purified Src was from UBI (Lake Placid, NY, USA) and [32 P]ATP (4500 Ci/mmol) from PerkinElmer (Boston, MA, USA). For cell labeling, orthophosphate was from GE Healthcare-Amersham Biosciences (Uppsala, Sweden).

In vitro Src kinase assay

For phosphorylation assay, peptides were diluted in the reaction mixture (20 mM *N*-2-hydroxyl piperazine-*N'*-2-ethane sulfonic acid (pH 7.4), 10 mM MgCl₂, 2 mM MnCl₂, 1 mM dithiothreitol and 5 μ M ATP plus 0.5 μ Ci of [32 P]ATP. The peptides used in this study were synthesized by Eurogentec (Seraing, Belgium). Phosphorylation reaction was initiated by the addition of constitutively active Src. After 20 min of incubation at 22°C, the reaction was stopped by the addition of Laemmli buffer. Every experimental condition was performed in triplicate, and experiments were repeated three times. In all experiments, phosphorylated peptides were separated by an SDS-PAGE. Gels were dried and exposed by phosphorimaging.

Phosphorylated VE-cadherin from 32 P-labeled cells was analysed by two-dimensional phosphopeptide mapping and labeled cells were analysed by tryptic phosphopeptide mapping as described previously (Souchelnytskyi *et al.*, 1996).

Cell culture and transfection

HUVECs were prepared as described by Lambeng *et al.* (2005) CHO-expressing human VE-cadherin were described previously (Breviario *et al.*, 1995) and grown in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal bovine serum. For transient transfection of Src, 15 \times 10⁶ CHO cells were transfected with appropriate plasmids by electroporation, then plated in 100-mm tissue culture dishes and grown for 48 h. The plasmids pcDNA3-Src-Y530F (constitutively active) and pcDNA3-Src-K298M (kinase-dead) were generous gifts from Michael Burbridge and Nicolas Cauquil from Servier (France).

Expression of recombinant VE-cadherin cytoplasmic domain

In vitro translation of the entire VE-cadherin cytoplasmic domain (R621-Y784) failed, whereas expression of a truncated version (A630-Y784) was successful. The corresponding DNA sequence was polymerase chain reaction (PCR) amplified from the human VE-cadherin cDNA (Breviario *et al.*, 1995) using a forward primer, 5'-CTAGGATCCGCGCACGGCAA GAGCGTG-3', and a reverse primer, 5'-TAAAGCTTAATA CAGCAGCTCCTCCCG-3'. The PCR fragment was digested by *Bam*HI and *Hind*III and inserted into pQE30 (Qiagen, Courtaboeuf, France) in-frame with an N-terminus His-tag. The recombinant cDNA was then inserted into pET21b (Novagen, Darmstadt, Germany). The VE-cadherin cytoplasmic domain was produced by *in vitro* translation using the Proteo rapid Strep-Tag *in vitro* transcription/translation system from (IBA, Göttingen, Germany), according to the manufacturer's protocol. Resulting products were analysed by immunoblotting with anti-His-tag antibodies.

Preparation of cell extracts, immunoprecipitation, electrophoresis and immunoblotting

Cell lysates, immunoprecipitates and immunoblots were prepared and analysed as described previously by Lambeng *et al.* (2005).

Pull-down experiments

GST-Csk-SH2 DNA construct was a generous gift from Paul Slyke and Daniel Dumont (Toronto, Canada). All inductions yielded proteins of the expected size as judged by Coomassie staining. Quantification of GST constructs was accomplished via SDS-PAGE analysis. Pull-down experiments were carried out using GST fusion proteins that had been adsorbed onto the glutathione-Sepharose 4B matrix. Lysates from VE-cadherin-transfected CHO cells transfected with either active Src (Y530F) or the empty vector were incubated at 4°C overnight with GST alone or GST-Csk-SH2 with continuous stirring. The Sepharose beads were washed three times and centrifuged at 5000 r.p.m. for 30–60 s at 4°C. Bound proteins were eluted by boiling in Laemmli buffer 5 min before 10% SDS-PAGE. After SDS-PAGE, the gels were subjected to Western blot analysis with VE-cadherin antibodies.

Migration assay (in vitro wounding)

In vitro scratch wounds were created by scraping the HUVECs monolayers with a sterile disposable cell scraper. After injury of the monolayer, the cells were gently washed and stimulated

by VEGF alone or in combination with PP2 or SU6656. Endothelial cells migration from the edge of the wounded monolayer was examined after 12 h of VEGF stimulation after injury.

Abbreviations

CHO, Chinese hamster ovary cells; HUVECs, human umbilical vein endothelial cells; VEGF, vascular endothelial growth factor; VEGFR-2, vascular endothelial growth factor receptor 2; VE-cadherin, vascular endothelial-cadherin; SDS, sodium dodecyl sulfate; SDS-PAGE, SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.

Acknowledgements

This work was possible thanks to INSERM, the Commissariat à l'Énergie Atomique, the Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC no. 5588), the Fédération Nationale des Centres de Lutte contre le Cancer, the Fondation pour la Recherche Médicale and the Ligue Nationale contre le Cancer. We thank Michael Burbridge and Nicolas Cauquil to have provided the constructions for Src mutants. We are indebted to Daniel Dumont and Paul Van Slyke for scientific discussions.

References

- Abu-Ghazaleh R, Jia H, Lobo M, Zachary I. (2001). Src mediates stimulation by vascular endothelial growth factor of the phosphorylation of focal adhesion kinase at tyrosine 861, and migration and anti-apoptosis in endothelial cells. *Biochem J* **360**: 255–264.
- Baumeister U, Funke R, Ebnet K, Vorschmitt H, Koch S, Vestweber D. (2005). Association of Csk to VE-cadherin and inhibition of cell proliferation. *EMBO J* **24**: 1686–1695.
- Boggon TJ, Eck MJ. (2004). Structure and regulation of Src family kinases. *Oncogene* **23**: 7918–7927.
- Breviario F, Caveda L, Corada M, Martin-Padura I, Navarro P, Golay J *et al.* (1995). Functional properties of human vascular endothelial cadherin (7B4/cadherin-5), an endothelium-specific cadherin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **15**: 1229–1239.
- Calalb M, Polte TR, Hanks SK. (1995). Tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase at sites in the catalytic domain regulates kinase activity: a role for Src family kinases. *Mol Cell Biol* **15**: 954–963.
- Calcerrada MC, Catalan RE, Martinez AM. (2002). PAF-stimulated protein tyrosine phosphorylation in hippocampus: involvement of NO synthase. *Neurochem Res* **27**: 313–318.
- Carmeliet P, Lampugnani MG, Moons L, Breviario F, Compernelle V, Bono F *et al.* (1999). Targeted deficiency or cytosolic truncation of the VE-cadherin gene in mice impairs VEGF-mediated endothelial survival and angiogenesis. *Cell* **98**: 147–157.
- Cartwright C, Coad CA, Egbert BM. (1994). Elevated c-Src tyrosine kinase activity in premalignant epithelia of ulcerative colitis. *J Clin Invest* **93**: 509–515.
- Cartwright C, Meisler AI, Eckhart W. (1990). Activation of the pp60c-src protein kinase is an early event in colonic carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 558–562.
- Corada M, Liao F, Lindgren M, Lampugnani MG, Breviario F, Frank R *et al.* (2001). Monoclonal antibodies directed to different regions of vascular endothelial cadherin extracellular domain affect adhesion and clustering of the protein and modulate endothelial permeability. *Blood* **97**: 1679–1684.
- Corada M, Mariotti M, Thurston G, Smith K, Kunkel R, Brockhaus M *et al.* (1999). Vascular endothelial-cadherin is an important determinant of microvascular integrity *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 9815–9820.
- Dejana E, Corada M, Lampugnani MG. (1995). Endothelial cell-to-cell junctions. *FASEB J* **9**: 910–918.
- Eliceiri B, Paul R, Schwartzberg PL, Hood JD, Leng J, Chersesh DA. (1999). Selective requirement for Src kinases during VEGF-induced angiogenesis and vascular permeability. *Mol Cell* **4**: 915–924.
- Eriksson U, Alitalo K. (1999). Structure, expression and receptor-binding properties of novel vascular endothelial growth factors. *Curr Top Microbiol Immunol* **237**: 41–57.
- Esser S, Lampugnani MG, Corada M, Dejana E, Risau W. (1998). Vascular endothelial growth factor induces VE-cadherin tyrosine phosphorylation in endothelial cells. *J Cell Sci* **111**: 853–865.
- Fincham V, Frame MC. (1998). The catalytic activity of Src is dispensable for translocation to focal adhesions but controls the turnover of these structures during cell motility. *EMBO J* **17**: 81–92.
- Gory-Faure S, Prandini MH, Pointu H, Roullot V, Pignot-Paintrand I, Vernet M *et al.* (1999). Role of vascular endothelial-cadherin in vascular morphogenesis. *Development* **126**: 2093–2102.
- Hudry-Clergeon H, Stengel D, Ninio E, Vilgrain I. (2005). Platelet-activating factor increases VE-cadherin tyrosine phosphorylation in mouse endothelial cells and its association with the PtdIns3'-kinase. *FASEB J* **19**: 512–520.
- Kaplan K, Swedlow JR, Morgan DO, Varmus HE. (1995). c-Src enhances the spreading of src-/- fibroblasts on

- fibronectin by a kinase-independent mechanism. *Genes Dev* **9**: 1505–1517.
- Kouklis P, Konstantoulaki M, Malik AB. (2003). VE-cadherin-induced Cdc42 signaling regulates formation of membrane protrusions in endothelial cells. *J Biol Chem* **278**: 16230–16236.
- Lambeng N, Wallez Y, Rampon C, Cand F, Christe G, Gulino-Debrac D *et al*. (2005). Vascular endothelial-cadherin tyrosine phosphorylation in angiogenic and quiescent adult tissues. *Circ Res* **96**: 384–391.
- Lampugnani MG. (1999). Cell migration into a wounded area *in vitro*. *Methods Mol Biol* **96**: 177–182.
- Lampugnani MG, Corada M, Caveda L, Breviario F, Ayalon O, Geiger B *et al*. (1995). The molecular organization of endothelial cell to cell junctions: differential association of plakoglobin, beta-catenin, and alpha-catenin with vascular endothelial cadherin (VE-cadherin). *J Cell Biol* **129**: 203–217.
- Lauder H, Frost E, Hiley C, Fan T. (1998). Quantification of the repair process involved in the repair of a cell monolayer using an *in vitro* model of mechanical injury. *Angiogenesis* **2**: 67–80.
- Lin MT, Yen ML, Lin CY, Kuo ML. (2003). Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis by resveratrol through interruption of Src-dependent vascular endothelial cadherin tyrosine phosphorylation. *Mol Pharmacol* **64**: 1029–1036.
- Lindquist J, Simeoni L, Schraven B. (2003). Transmembrane adapters: attractants for cytoplasmic effectors. *Immunol Rev* **191**: 165–182.
- Lutz MP, Esser IB, Flossmann-Kast B B, Vogelmann R, Luhrs H, Friess H *et al*. (1998). Overexpression and activation of the tyrosine kinase Src in human pancreatic carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun* **243**: 503–508.
- Mustonen T, Alitalo K. (1995). Endothelial receptor tyrosine kinases involved in angiogenesis. *J Cell Biol* **129**: 895–898.
- Nakamoto T, Sakai R, Ozawa K, Yazaki Y, Hirai H. (1996). Direct binding of C-terminal region of p130Cas to SH2 and SH3 domains of Src kinase. *J Biol Chem* **271**: 8959–8965.
- Pawson T. (2004). Specificity in signal transduction: from phosphotyrosine-SH2 domain interactions to complex cellular systems. *Cell* **116**: 191–203.
- Potter M, Barbero S, Cheresch DA. (2005). Tyrosine phosphorylation of VE-cadherin prevents binding of p120- and beta-catenin and maintains the cellular mesenchymal state. *J Biol Chem* **280**: 31906–31912.
- Shasby D, Ries DR, Shasby SS, Winter MC. (2002). Histamine stimulates phosphorylation of adherens junction proteins and alters their link to vimentin. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **282**: L1330–L1338.
- Souchelnytskyi S, ten Dijke P, Miyazono K, Heldin C. (1996). Phosphorylation of Ser165 in TGF-beta type I receptor modulates TGF-beta1-induced cellular responses. *EMBO J* **15**: 6231–6240.
- Su WH, Chen HI, Jen CJ. (2002). Differential movements of VE-cadherin and PECAM-1 during transmigration of polymorphonuclear leukocytes through human umbilical vein endothelium. *Blood* **100**: 3597–3603.
- Talamonti M, Roh MS, Curley SA, Gallick GE. (1993). Increase in activity and level of pp60c-src in progressive stages of human colorectal cancer. *J Clin Invest* **91**: 53–60.
- Tsukita S, Oishi K, Akiyama T, Yamanashi Y, Yamamoto T, Tsukita S. (1991). Specific proto-oncogenic tyrosine kinases of src family are enriched in cell-to-cell adherens junctions where the level of tyrosine phosphorylation is elevated. *J Cell Biol* **113**: 867–879.
- Turner E. (1990). Paxillin: a new vinculin-binding protein present in focal adhesion. *J Cell Biol* **111**: 1059–1068.
- van Oijen M, Rijksen G, ten Broek FW, Slootweg PJ. (1998). Overexpression of c-Src in areas of hyperproliferation in head and neck cancer, premalignant lesions and benign mucosal disorders. *J Oral Pathol Med* **27**: 147–152.
- Verbeek B, Vroom TM, Adriaansen-Slot V, Ottenhoff-Kalf AE, Geertzema J, Hennipman A *et al*. (1996). c-Src protein expression is increased in human breast cancer. An immunohistochemical and biochemical analysis. *J Pathol* **180**: 383–388.
- Vittet D, Buchou T, Schweitzer A, Dejana E, Huber P. (1997). Targeted null-mutation in the vascular endothelial-cadherin gene impairs the organization of vascular-like structures in embryoid bodies. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 6273–6278.
- Wallez Y, Vilgrain I, Huber P. (2006). Angiogenesis: the VE-cadherin switch. *Trends Cardiovasc Med* **2**: 55–59.
- Zhao Y, Davis HW. (1998). Hydrogen peroxide-induced cytoskeletal rearrangement in cultured pulmonary endothelial cells. *J Cell Physiol* **174**: 370–379.

II.3. Discussion

Dans cet article, nous présentons un certain nombre d'éléments qui suggèrent que la VE-cadhérine est un substrat direct de Src dans la voie de signalisation du VEGF, et que la tyrosine 685 (LY⁶⁸⁵AQVQ) est le seul site phosphorylé du domaine cytoplasmique. De façon intéressante, la séquence LY⁶⁸⁵AQV correspond au motif YxxV/I/L qui est un site consensus de phosphorylation des kinases de type Src (Lindquist, J.A. *et al.* 2003).

II.3.1. La VE-cadhérine est phosphorylée par Src sur la tyrosine 685

Le domaine cytoplasmique de la VE-cadhérine est phosphorylé par la tyrosine kinase Src *in vitro*, et ceci de manière croissante au cours d'une cinétique ou d'une dose-réponse. Nous démontrons ici par quatre approches différentes, que la tyrosine 685 est la cible unique de Src dans la VE-cadhérine humaine :

- In vitro en utilisant des peptides de synthèse
- Par la réalisation de cartes phosphopeptidiques de la VE-cadhérine d'HUVECs stimulées par le VEGF
- Par l'utilisation de cellules CHO co-transfectées par la VE-cadhérine et Src actif
- Par l'utilisation du domaine SH2 de Csk comme sonde spécifique de la phospho-Y685

L'ensemble de nos résultats suggère que la phosphorylation de la VE-cadhérine sur la tyrosine 685 représente un mécanisme de régulation important et précoce dans la voie de signalisation du VEGF. Ces éléments suggèrent également que Src phosphoryle directement la VE-cadhérine *in vivo*.

La modification covalente de résidus tyrosine spécifiques de récepteurs aux facteurs de croissance ou de protéines de la signalisation, est une étape importante de la transduction du signal (Pawson, T. 2004). Les domaines conservés SH2 reconnaissent et lient des phosphotyrosines spécifiques. Effectivement, Baumeister et coll. ont rapporté, après phosphorylation de la VE-cadhérine chez la levure ou dans des cellules CHO, la liaison du domaine SH2 de Csk à la tyrosine 685 (Baumeister, U. *et al.* 2005). Ces données sont en accord avec nos résultats montrant la phosphorylation induite par le VEGF de la tyrosine 685. De plus, nous montrons que la liaison du domaine SH2 de Csk à la VE-cadhérine est fortement augmentée dans les CHO transfectées par Src actif. Ainsi nous concluons que le recrutement de Csk par la VE-cadhérine est induit par Src. Comme Csk est un régulateur négatif de l'activité de Src, son recrutement par la VE-cadhérine pourrait être un processus efficace pour réguler le niveau de phosphorylation de la protéine.

Plus récemment, Potter et coll. ont rapporté que Src actif ou l'inactivation des PTP induisent la phosphorylation de la VE-cadhérine sur les tyrosines 658 et 731, mais pas 685, ce qui est en contradiction avec nos résultats (Potter, M.D. *et al.* 2005). Cependant, dans leurs expériences, la phosphorylation de la VE-cadhérine n'est pas provoquée par une stimulation des cellules par le VEGF ; il est donc possible que d'autres tyrosines que la 685 soient phosphorylées dans différentes conditions de culture cellulaire.

La VE- et la N-cadhérine sont très homologues dans leur domaine cytoplasmique. La N-cadhérine est aussi phosphorylée par Src sur les Y851 et Y883, qui correspondent à des tyrosines de la VE-cadhérine (Y725 et Y757 respectivement) qui ne sont pas phosphorylées. De façon intrigante, la tyrosine 685 ne possède pas d'homologie avec d'autres tyrosines de la N-cadhérine. Ainsi, bien que les séquences cytoplasmiques de la N- et de la VE-cadhérine soient très homologues, nos résultats suggèrent des mécanismes de régulation différents.

II.3.2. Inhibition de la migration endothéliale par des bloqueurs de Src

L'addition de VEGF sur les HUVECs accélère leur vitesse de migration, en accord avec le rôle du VEGF dans l'ouverture des jonctions endothéliales. Dans le test de blessure que nous avons réalisé, nous montrons que les inhibiteurs de Src empêchent la réparation induite par le VEGF, indiquant que l'inhibition par le VEGF de l'activité adhésive homotypique est induite par Src. Comme les concentrations efficaces d'inhibiteurs de Src utilisés sur les HUVECs dans ce test diminuent de façon drastique la phosphorylation de la tyrosine 685 (Cf article fig.4 b,c), ceci suggère que cette phosphorylation joue un rôle crucial dans la migration des cellules endothéliales en réponse au VEGF. Bien que nous n'excluons pas que l'inhibition de Src puisse avoir d'autres effets indépendants de la phosphorylation de la VE-cadhérine, le fait que cette protéine joue un rôle central dans l'adhérence des cellules endothéliales entre-elles, supporte l'hypothèse que cette phosphorylation de la Y685 contribue à l'ouverture des jonctions induite par le VEGF via Src.

III. Article 3 : Evidence for VE-cadherin acting as adhesion signaling receptor in breast cancers.

III.1. Introduction

L'angiogenèse intervient dans des conditions physiologiques, mais également dans des conditions pathologiques, et notamment lors de la progression tumorale. En effet, la croissance tumorale est dépendante de l'apparition de néovaisseaux. Plusieurs études ont également montré que la densité des microvaisseaux et l'invasion tumorale sont associées dans les tumeurs du sein à la production de VEGF (Cf. II.3.1).

Nous avons précédemment mis en évidence la phosphorylation sur tyrosine de la VE-cadhérine au cours de l'angiogenèse physiologique induite chez la souris, et montré son association au VEGF-R2 et à la tyrosine kinase Src. Nous avons par ailleurs montré la phosphorylation directe de la VE-cadhérine par Src, en réponse au VEGF, processus corrélé à la déstabilisation des jonctions. D'autres études ont également mis en évidence le rôle de Src dans l'extravasation de cellules tumorales exprimant le VEGF. En effet, la déficience en Src, ou son blocage pharmacologique stabilise la barrière endothéliale et protège des souris de l'extravasation tumorale (Weis, S., Cui, J. *et al.* 2004). Ces études soulèvent la question de l'existence d'une forme phosphorylée sur tyrosine de la VE-cadhérine dans des tumeurs humaines.

Pour répondre à cette question, nous avons mené des expériences sur des tumeurs humaines mammaires, étant donné le rôle avéré du VEGF dans la transformation néoplasique de cet organe, en comparaison avec des tissus normaux issus de réductions mammaires. Nous avons également examiné l'association potentielle de protéines de la signalisation cellulaire à la VE-cadhérine des cellules endothéliales de tumeurs.

III.2. Article

Evidence for VE-cadherin acting as adhesion signaling receptor in breast cancers

Yann Wallez¹, Zoya Daneshrad¹, Tiphaine Mannic¹, Francine Cand¹, Marie-Hélène Prandini¹, Isabelle Treilleux², Thomas Bachelot², Philippe Huber¹, Isabelle Vilgrain¹.

¹Université Joseph Fourier, Laboratoire de Développement et Vieillessement de l'Endothélium, Grenoble, F-38054 France ; Inserm, EMI 02-19, Grenoble, F-38054 France ; CEA, Grenoble, F-38054 France.

²Equipe Cytokine et Cancer, Inserm U 590, Centre Léon Berard, Lyon, F-69000, France.

Running title: VE-cadherin, Src kinase and PtdIns3^γ-kinase expression in breast carcinoma tissues

Key words: tyrosine kinases, VE-cadherin, angiogenesis, cell death resistance .

*Address all correspondance and requests for reprints to :
Isabelle Vilgrain, PhD
INSERM EMI 02-19
Laboratoire de Developement et Vieillessement de l'Endothelium,
Département Réponse et Dynamique Cellulaire
CEA Grenoble,
17, rue des Martyrs 38054 Grenoble Cedex 9, France..
e-mail : [ivilgrain @cea.fr](mailto:ivilgrain@cea.fr)

ABBREVIATIONS

The abbreviations used are: AA, amino acids; DTT, Dithiothreitol; EDTA, Ethylene diamine tetraacetic acid; EGTA, Ethylene bis (oxyethylene nitrilo) tetraacetic acid; PBS, phosphate-buffered saline; PtdIns3'-kinase, Phosphatidylinositol 3-kinase; PI, phosphatidylinositol; pTyr, Phosphotyrosine; Tris, Tri-hydroxy-methyl amino methane; SDS/ PAGE, Sodium dodecyl sulfate/ polyacrylamide gel electrophoresis; SH2, Src homology 2; VE-cadherin, vascular endothelial cadherin; VEGF, vascular endothelial growth factor; TLC, thin layer chromatography.

ABSTRACT

OBJECTIVE: VE-cadherin is an endothelium-specific cell-cell junctional protein that plays a critical role in vascular barrier function and angiogenesis. The breakdown of the endothelial cell barrier leads to vascular permeability and remodeling, which is associated with a number of disease processes including cancer, inflammation, and ischemic injury. We previously demonstrated that VE-cadherin tyrosine phosphorylation was increased during hormonally induced angiogenesis in ovary and uterus in the mouse.¹ In addition, VE-cadherin tyrosine phosphorylation was correlated to reduced VE-cadherin-mediated adhesion. In the present study, we examined whether VE-cadherin tyrosine phosphorylation was a process implicated in tumoral angiogenesis in the human breast tissues, and whether it could participate in cellular signalling.

METHODS: Expression of VE-cadherin was determined by RT-PCR and Westernblot. Src kinase and PtdIns3'-kinase activity were determined in immune complex kinase assays.

RESULTS: We found that VE-cadherin expression was increased in tumoral breast tissue as compared to normal tissues. A tyrosine phosphorylated form of VE-cadherin was detected only in tumoral tissues. Moreover, Src kinase and PtdIns3'-kinase activities were dramatically enhanced in the tumoral extracts and were found associated with VE-cadherin in co-immunoprecipitation experiments. Altogether, these results suggested that, upon tyrosine phosphorylation, VE-cadherin recruited signalling proteins at adhesive sites.

CONCLUSION: Our findings suggest that, in tumoral angiogenic tissues, VE-cadherin tyrosine phosphorylation may be one of the key upstream regulators in activating endothelial cells and thus increasing vascular endothelial survival and permeability to improve tumor supplies and metastatic dissemination.

INTRODUCTION

The tumor vasculature provides a new and attractive target for cancer therapy. Therapeutic targeting of the tumor vasculature includes antivasular approaches that occlude or destroy preexisting blood vessels in solid tumor and antiangiogenic approaches that target the formation of new blood vessel development. Tumors with a high microvascular density tend to be more aggressive and prone to metastases because of defective barrier function.² The maintenance and regulation of normal microvascular function depends upon the integrity of the endothelial cell-cell junction. The transmembrane adhesive protein, vascular endothelial (VE)-cadherin, is an endothelium-specific cell-cell junctional protein that plays a critical role in vascular barrier function.³ The inactivation of the corresponding gene, induced an early lethal phenotype in the mouse.⁴ VE-cadherin^{-/-} endothelial cells were still able to form a primitive vascular plexus but vascular remodeling was missing, suggesting the importance of VE-cadherin in angiogenesis during early development. In adult, the adhesive properties of VE-cadherin are crucial to maintain endothelial cells adherent to each other.

Recent studies have begun to identify mechanisms whereby cadherins can activate and/or modulate cellular signaling pathways. Because the cadherin cytoplasmic tail possesses no known catalytic activity, it is implied that membrane-associated signaling molecules must be recruited to the cadherin-catenin complex for signaling to occur. Ultimately, such recruitment is likely to involve coordinators of membrane signaling, such as ancillary adaptor proteins, scaffolds, and membrane microdomains. Recruitment commonly entails high affinity interactions between Src homology 2 domains and tyrosine-phosphorylated sequences in components of the receptor complex.⁵ Such upstream tyrosine phosphorylation may be due to either receptor tyrosine kinases or nonreceptor tyrosine kinases.

Currently, it is widely accepted that phosphorylation/dephosphorylation are mechanisms that trigger cell-cell disruption possibly through alteration in adherens junction composition.⁶ Importantly, it is likely that very tight regulation of tyrosine kinase signaling is critical for cadherin biology. VE-cadherin contains 9 tyrosines in its cytoplasmic domain, potential sites for phosphorylation. Indeed, stimulation of VEGF tyrosine kinase receptors has been reported to increase VE-cadherin tyrosine phosphorylation and to reduce VE-cadherin-mediated adhesion.^{1, 7} The same effect was observed in cells stimulated by several permeability-increasing agents.⁸⁻¹⁰ Our recent studies *in vivo* showed that, in adult mice, VE-cadherin tyrosine phosphorylation was weak or undetectable in resting tissues,¹ likely because of activation of tyrosine phosphatases which have been implicated in promoting cadherin-mediated adhesion, by dephosphorylating VE-cadherin and catenins.¹¹ In

contrast to resting tissues, in ovaries and uterus subjected to hormonal stimulation, angiogenesis was increased and VE-cadherin tyrosine phosphorylation dramatically upregulated *in vivo*.¹ These results were the first demonstration of VE-cadherin tyrosine phosphorylation *in vivo*. Moreover, we found that VE-cadherin was transiently associated with VEGF receptor 2 during hormonally induced angiogenesis *in vivo*¹ and was permanently associated with the tyrosine kinase Src in adult tissues. Other signaling proteins were found to co-immunoprecipitate with tyrosine-phosphorylated VE-cadherin such as the adaptor protein Shc.¹² Thus, VE-cadherin functions not only as an intercellular adhesion-stabilizing molecule but also as an intracellular signal-triggering molecule by providing binding sites for Src homology 2 (SH2)-containing molecules.

These studies raised an important question regarding the existence of VE-cadherin tyrosine phosphorylation process in tumoral angiogenesis in the human adult, and whether it can signal following phosphorylation. In the present study, we thus examined the expression of VE-cadherin protein in human normal and tumoral breast tissue and its level of tyrosine phosphorylation as well as its signalling partners.

MATERIAL AND METHODS

Material: Leupeptin, pepstatin A, triton X-100, tween 20, horseradish peroxidase-conjugated affinity purified, rabbit anti goat were purchased from Sigma, (Rueil Malmaison, France). The RNAgents Total RNA Isolation System was from Promega (Madison, WI). Hybond N+ was purchased from Amersham, (Les Ullis, France). The enhanced chemiluminescence detection reagents were purchased from Dupont NEN (Les Ullis, France). Nitrocellulose was obtained from Schleicher and Schuell (Ecquevilly, France). Micro BCA protein assay reagent kit was from Pierce (Oud Beijerland, the Netherlands).

Antibodies: Commercially available antibodies used were as follows : for immunoprecipitation, monoclonal antiphosphotyrosine mAb 4G10 (Upstate Biotechnology, Inc., Lake Placid, NY), mouse monoclonal anti-p85 subunit of PtdIns3'-kinase (Transduction Laboratories, Lexington, KY), and for western blotting, monoclonal antiphosphotyrosine mAb 4G10 (UBI), and horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG, goat anti-rabbit IgG, rabbit anti-rat (Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA). Mouse monoclonal antibody directed against human VE-Cadherin (clone BV9).¹³

RNA extraction and reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR): Total RNAs from human tissues were isolated using the RNAgents Total RNA Isolation System. RNA concentrations were determined spectrophotometrically in duplicate samples and confirmed after either washing and ethanol precipitation of samples. A260, A280 ratios were always >1.8. Samples were stored in ethanol at -80°C prior to assays. Semiquantitative RT-PCR was performed as previously described.¹⁴ Briefly, 200 ng of total RNA was reverse transcribed after prior treatment with RQ1 Dnase to eliminate any contaminating genomic DNA. The equivalent of 400 ng reverse-transcribed RNA was used for PCR experiments in a final volume of 50 µl. The amplification parameters were 94°C for 5 min, 94°C for 1 min, 68°C for 2.5 min, 72°C for 1 min, 72°C for 1 min during 30 cycles. These conditions were checked to be non-saturating for the amplification reaction. All PCR analyses were performed in parallel with RNA samples that were not treated with reverse transcriptase, and include a blank with no template. To ensure semiquantitative results, cDNA samples were adjusted to yield equivalent amplification of hypoxanthine phosphoribosyltransferase (*hpri*) as a reference standard.

Lysing tissues in Triton lysis buffer: To avoid potential dephosphorylation of tyrosine residues, tissues were rapidly homogenized using a polytron apparatus in cold buffer A (Weight:vol: 1/10) : 20mM Tris/acetate (pH7.0), 0.27M sucrose, 1% (v/v) Triton X-100, 1mM dithiothreitol (DTT), 1mM EDTA, 1mM EGTA, 1mM

Na₃VO₄, 1mM benzamidine, 4μg/ml leupeptin and 1μg/ml pepstatin A. The tissues homogenates were centrifuged and the supernatants were subjected to SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), or stored at -20°C.

Src kinase assay: The kinase assay was performed at 30°C for 10 min in the presence of 25 μM ATP and 5 μCi [γ -³²P]ATP in the absence or presence of 2.5 μg acid-treated enolase to discriminate between autophosphorylation and kinase activity, respectively. The phosphorylation reaction was stopped by the addition of concentrated electrophoresis solubilization buffer, and the proteins were heated for 5 min at 100°C and separated by SDS-PAGE. The gels were stained with Coomassie Brilliant Blue and then dried, and the phosphorylated proteins were visualized by autoradiography at -80°C using intensifying screens. For immunokinase assay, the same assay was performed using the immunoprecipitates on the sepharose beads in the reaction.

Immunoprecipitation: Equal amounts of protein from each cell lysate were incubated with 40 μl of a 50% (v/v) mixture of protein A-Sepharose beads (Amersham Biosciences) for 30 min at 4°C on a rotator. The supernatants were then incubated with the anti-phosphotyrosine antibody (1 μg/ml) or the anti- PtdIns3'-kinase antibody (2 μg/ml) or the anti-VE-cadherin antibody (2 μg/ml) overnight at 4°C. The immunoprecipitates were then collected by incubation with 20 μl of ProteinA-Sepharose. Immunoprecipitates were washed four times in ice-cold lysis buffer and collected by centrifugation for 10 min at 4°C. Samples were eluted from ProteinA-Sepharose beads by boiling in a 1:5 ratio (v/v) with 5X Laemmli buffer containing a final concentration of 2.5% (v/v) βmercaptoethanol, and subjected to SDS-PAGE.

PtdIns3'-kinase activity: PtdIns3'-kinase activity was measured by adding 100 μg of sonicated phosphatidylinositol and 10 μCi of [γ -³²P]ATP, 30 mM MgCl₂ and 15 μM ATP in a total volume of 60 μl. Reactions were performed for 20 min at 30°C and stopped by the addition of 100 μl of 1 M HCl and 200 μl of chloroform/methanol (1:1 by vol). After centrifugation and removal of the upper layer, 100 μl of methanol/HCl (1:1) was added. After further centrifugation, lipids were separated on thin layer chromatography (TLC) plates with a solvent system of chloroform/methanol/NH₄OH (45:35:10 by vol.). The TLC plates associated radioactivity was determined using Phosphorimager (Biorad) quantification. Immunoprecipitation with mouse monoclonal anti-p85 antibody was used as positive control for PtdIns3'-kinase activity.

SDS-PAGE and Western blotting :Tissue lysates were analyzed by SDS-PAGE (12% acrylamide, 0.2% bis-acrylamide). Proteins were then transferred from the gel to nitrocellulose for 1 h and the residual binding sites were blocked by incubating the filters for 1 h in phosphate buffer saline containing 0.05% (v/v) Tween 20 and

5% (v/v) non-fat milk. The blots were subsequently incubated with the primary antibody for 1 h. After being washed, the blots were incubated for 1h with horseradish peroxidase-conjugated rabbit anti-mouse IgG diluted in phosphate buffer saline containing 0.05% (v/v) Tween 20. Immunoreactive proteins were visualized by chemiluminescence.

RESULTS

Detection of VE-Cadherin messenger RNA and protein in normal breast tissue and breast carcinoma

The expression of VE-cadherin was determined in human tumoral breast tissues by RT-PCR. The analysis was performed using the sets of primers corresponding to the coding region of the human VE-cadherin CGC CTC TGT CAT GTA CCA AA (sens) and GTC TTC AGG CAC GAC AAA TG (anti sens) sequence (268 bp). For the negative control RNA was substituted by water (no template). The positive control for VE-cadherin expression was the human placenta as it is a highly vascularized tissue expressing large quantities of human VE-cadherin. As shown in Figure 1A, amplification of VE-cadherin transcripts by RT-PCR in placenta produced a single product (\approx 250 bp long), which corresponded in size to the mRNA expected for the human VE-cadherin. The amplification of VE-cadherin transcripts from breast tumoral tissue mRNA produced a single product identical to that obtained in human placenta.

To visualize the VE-cadherin protein, identical amount of protein extracts from normal tissue (Figure 1B, lane 1), tumoral tissues (Figure 1B, lane 2-5), and human placenta (Figure 1B, lane 6) were analyzed by westernblotting using the anti human VE-cadherin antibody. The protein VE-cadherin is a 784 AA polypeptide which cytoplasmic domain contains 164 AA. Fixation of Ca^{2+} on extracellular domain sites generally is required for homophilic interactions. As VE-cadherin is a glycosylated protein, in SDS-PAGE, it migrates with an apparent molecular weight of 125 kDalton. As illustrated in Figure 1, the protein of 125 kDa was detected in all the samples of breast tumoral tissue to a level similar to human placenta which is a highly vascularized tissue. This results suggested that the protein was synthesized in its normal conformation in breast tumoral tissue. In contrast, the protein was barely detectable in normal breast tissue, suggesting that the tumoral breast samples were highly vascularized.

Tyrosine phosphorylation of VE-cadherin in breast carcinoma tissue

We have previously shown that VE-cadherin is tyrosine phosphorylated during hormonally induced angiogenesis.¹ The level of tyrosine phosphorylated VE-cadherin in tumoral angiogenic process in human tissues has never been investigated. Thus, we examined whether VE-cadherin was phosphorylated on tyrosine in human tumoral breast tissues. We first examined the pattern of tyrosine phosphorylated proteins in normal and tumoral breast tissue. As shown in Figure 2A, the anti-phosphotyrosine antibody detected minor bands in normal tissue,

while it revealed the presence of phosphotyrosine-containing proteins of Mr ranging from 130 to 45 kDa in tumoral tissues (Figure 2B). To analyze whether VE-cadherin was present among these phosphotyrosine-containing proteins, increasing amount of tumoral protein extracts were immunoprecipitated with the anti-phosphotyrosine antibody and probed with the anti-VE-cadherin antibody. As shown in Figure 2C, phosphotyrosine immunoprecipitates from breast tumors contained VE-cadherin. Conversely, immunoprecipitation with the anti-VE-cadherin antibody and westernblotting with the antiphosphotyrosine antibody showed the presence of four phosphorylated proteins (Figure 2D). Immunoprobings the same membrane with the anti-VE-cadherin antibody revealed the presence of the VE-cadherin protein migrating at 125 kDa. This experiment showed that VE-cadherin is highly phosphorylated on tyrosine in endothelial cells from tumoral breast tissue and is associated with other phosphorylated proteins.

Src family tyrosine kinase activity in normal and tumoral tissues

We sought to identify candidate kinases that might be implicated in VE-cadherin regulation. We focused our attention on Src kinase, because we previously showed that Src protein was associated with VE-cadherin *in vivo* in mouse and *in vitro* in HUVECs.¹ Src kinase activity was first assayed in the whole breast tissue extracts by an *in vitro* kinase assay using enolase as substrate. As illustrated in Figure 3A, in normal breast tissue, (left upper panel) the basal phosphorylation level without enolase was barely detectable. When enolase, a substrate of Src family kinase, was added in the assay, ³²P incorporation was dependent upon increasing protein concentration, the phosphorylation being clearly detectable with 1 µg of proteins (Figure 3A, left lower panel). In tumoral extracts, the basal phosphorylation panel was higher than in normal tissues suggesting an increase in kinases activities in tumoral tissues (Figure 3A, middle upper panel). With enolase in the assay, the tumoral extract exhibited a high Src activity, the phosphorylation was clearly detectable with 0.25 µg of protein extracts. The dose response of the reaction is illustrated in Figure 3A, (right panel). In the normal tissue, ³²P incorporation into enolase proceeded at an extremely low rate, while in tumors, it was strikingly increased, exhibited half maximum incorporation after about 5 minutes and reached a plateau after 15 minutes of incubation (Figure 3B). Signal quantification showed that ³²P labelled enolase was increased 10-fold in tumors as compared to normal tissue (Figure 3B).

We then determined whether Src kinase activity was associated with the human VE-cadherin. As a control experiment, we used human placental extract which express high level of VE-cadherin. VE-cadherin immunoprecipitates incubated in the presence of $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP with or without enolase, exhibited a ³²P incorporation

dependent upon protein concentration (Figure 3C) suggesting that the Src protein associated to VE-cadherin is active. In tumoral breast tissue, VE-cadherin immunoprecipitates showed a high Src kinase activity while it was not detectable in normal tissues (Figure 3D). Altogether, these results showed that Src kinase is highly active in tumoral tissue and that part of it is associated with the human VE-cadherin.

PtdIns3'-kinase is activated in tumoral breast carcinoma and is associated with VE-cadherin

One key signaling molecule is PtdIns3'-kinase, which is activated by homophilic cadherin ligation. To evaluate the PtdIns3'-kinase activity, total cellular extracts from normal tissue or tumoral tissue were incubated in the presence of PI and γ -³²P-ATP, as described in Methods. After extraction, the phosphorylated lipids were separated by TLC. A kinetic (Figure 4A) and a dose response activity (Figure 4B) were performed in normal and tumoral tissue. As shown in Figure 4A, PtdIns3'-kinase activity was dramatically increased in the tumoral tissue as compared to normal tissue. In tumoral tissue, [³²P]Pi incorporation into PI was detected within 2 minutes of incubation and the lipid phosphorylation rate at 30°C was linear for 10 minutes. Half-maximal incorporation was apparent after approximately 15 minutes. In contrast, in normal tissue, the reaction proceeded at an extremely low rate (Figure 4A, lower panel). As shown in Figure 4B, incubation of PI with increasing concentrations of tissue extracts (from 0.5–10 μg) resulted in a dose-dependent phosphorylation of PI. Signal quantification showed that PtdIns3'-kinase activity was increased 10-15 fold in tumors as compared to normal tissue.

We further explored the potential recruitment of PtdIns3'-kinase to sites of VE-cadherin adhesion (Figure 5). PtdIns3'-kinase immune complexes were analyzed by SDS/PAGE, and western blotting with the anti-VE-cadherin antibody. As shown in Figure 5A, (left panel), the presence of VE-cadherin was detected in PtdIns3'-kinase immunoprecipitates. Conversely, VE-cadherin immunoprecipitates contained PtdIns3'-kinase protein (Figure 5A, right panel). PtdIns3'-kinase immunoprecipitates were tested for PtdIns3'-kinase activity in normal and tumoral tissues. As illustrated in Figure 5B, PtdIns3'-kinase activity was barely detectable in normal breast tissue, while the activity was strongly up regulated in tumoral tissue. To examine the activation level of VE-cadherin-associated PtdIns3'-kinase, VE-cadherin immunoprecipitates were assayed for PtdIns3'-kinase activity. As shown in Fig 5 C-D, PtdIns3'-kinase activity associated to VE-cadherin in tumoral breast tissue was detectable with increasing concentrations of anti-VE-cadherin antibody. No PtdIns3'-kinase activity was detectable in VE-cadherin immunoprecipitates from normal tissue (data not shown). These data strongly suggest that active PtdIns3'-kinase was associated with VE-cadherin in tumoral endothelial cells from breast tumors.

DICUSSION:

Tyrosine phosphorylation has commonly been reported to have a negative impact on cadherin adhesion.^{6, 15} VE-cadherin is the major cadherin found in the adherens junctions of endothelial cells. Interestingly, in our present study, we demonstrated that human breast tumors expressed a higher level of VE-cadherin *in vivo* as compared to normal breast tissue. This suggests an increase in vascularization since we found identical level of VE-cadherin in human placenta, a highly vascularized tissue. Indeed, it was previously shown that VE-cadherin was a good marker for assessing microvessels and angiogenesis because of its increased expression in human breast cancer.¹⁶ Moreover, Weidner and colleagues demonstrated a correlation between tumour microvessel density in breast cancer and the presence of axillary lymph node and distant metastases.¹⁷ Further studies have confirmed these results and have shown that tumour microvessel density in invasive breast carcinoma is an independent prognostic factor for disease free and overall survival.¹⁸⁻²¹ Moreover, we found that the level of tyrosine phosphorylated form of VE-cadherin was increased in tumoral breast tissue while it was barely detectable in normal breast tissue. Control of the disassembly of cadherin-mediated cell-cell adhesions is particularly relevant to cancer development. VE-cadherin tyrosine phosphorylation was early described in 1997, in endothelial cells in culture and was proposed to be related to a dissociation of endothelial cells junctions *in vitro*.²² Further, it was shown that cellular effectors known to increase endothelial permeability, such as VEGF and Histamine, were able to induce VE-cadherin tyrosine phosphorylation in cell cultures *in vitro*.^{7, 23} Our recent *in vivo* studies, demonstrated that VE-cadherin was not tyrosine phosphorylated in quiescent normal organs in mouse, while upon angiogenic stimulus in ovary, VE-cadherin became tyrosine phosphorylated. It was previously shown that, in this *in vivo* model, VEGF was the major effector responsible for ovarian angiogenesis.²⁴ Thus, in angiogenic human tumors, the presence of tyrosine phosphorylated form of VE-cadherin may represent a potential target site to inhibit tumoral permeability and metastasis. Interestingly, two other published reports demonstrating phosphorylation of VE-cadherin in breast cancer cells *in vitro*, support our *in vivo* observations.^{25, 26}

Our current data clearly demonstrate that Src tyrosine kinase activity is dramatically increased in human tumoral breast tissue as compared to normal. c-Src is the product of the SRC gene and has been found both over-expressed and highly activated in a number of human cancers.²⁷ Thus our results are in agreement with those

previous findings in other cancers. Interestingly, here we provide evidence that part of Src activity was associated with VE-cadherin. As VE-cadherin is exclusively expressed in endothelial cells, this result suggests that part of Src kinase from endothelial cells was able to bind VE-cadherin in tumoral tissue while no Src kinase activity was detectable associated with VE-cadherin in normal breast tissue. It has long been appreciated that classical cadherin-based adherens junctions are major sites for tyrosine kinase signaling, being enriched in tyrosine-phosphorylated proteins and a range of receptor and nonreceptor tyrosine kinases.²⁸⁻³⁰

The relationship between tyrosine kinase signaling and cadherin function is not yet well understood and is likely to be complex. Src family kinase activation has been shown to promote uncoupling of VE-cadherin and E-cadherin. In fact, mice deficient in pp60-Src or pp62-Yes or wild-type mice treated with a Src inhibitor have profound defects in VEGF-mediated vascular permeability associated with the stabilization of VE-cadherin-mediated endothelial cell-cell junctions.³¹ We previously demonstrated that Src kinase was associated with VE-cadherin in HUVECs and *in vivo* in mouse, and that Src inhibitors impaired VEGF-induced VE-cadherin tyrosine phosphorylation.¹ We suggested³² and further demonstrated that Src directly phosphorylates VE-cadherin on tyrosine 685 in response to VEGF.³³ In our current study, the agonists of the activation of endothelial cells in the breast tumors are not known. It can be speculated that VEGF might be the principal actor as its expression was shown to be increased in breast cancer.³⁴ In conjunction with our previous studies, we can speculate that Src kinase might be responsible for VE-cadherin tyrosine phosphorylation in tumoral breast tissues.

Importantly, in addition to Src kinase, we found that breast tumoral tissue expressed a highly active PtdIns3'-kinase as compared to normal tissue. Our results are in agreement with the previously described important role of the PtdIns3'-kinase –AKT signaling pathway in tumorigenesis. Frequent somatic mutations in the PI3K subunit p110- (*PIK3CA*) occur in a variety of cancer types.^{35, 36}

Interestingly, we demonstrated that VE-cadherin recruited an activated form of PtdIns3'-kinase in tumoral breast tissue. The mechanism of interaction of PtdIns3'-kinase with VE-cadherin in these tissues is not known. It is possible that both direct and indirect interactions exist between PtdIns3'-kinase and VE-cadherin. We previously shown that the tyrosine kinase inhibitors blocked the stable association of PtdIns3'-kinase with VE-cadherin, suggesting that tyrosine kinases might support cadherin function by promoting the assembly of the cadherin molecular complex.¹⁰ The covalent modification of the specific tyrosyl residues in growth factor receptors and in signaling molecules have been shown to be involved in cellular communication.⁵ A conserved

domain of about 100 amino acids, the SH2 domain, specifically recognizes and binds to phosphotyrosine, thereby promoting interactions of activated receptors and signaling molecules together.⁵ As the cytoplasmic tail of VE-cadherin contains several highly conserved tyrosine residues, we hypothesized that some tyrosine phosphorylated sites could serve as recognition sites for SH2 domain proteins involved in intracellular signal transduction like the prototypic p85 regulatory subunit of the PtdIns3'-kinase which has two SH2 domains.³⁷ As an example, mutational studies in the cytoplasmic domain of the type 2 VEGF receptor have suggested that the p85 subunit of PtdIns3'-kinase may bind directly to Tyr-799 and Tyr-1173.³⁸ The phosphorylation sites of the human VE-cadherin *in vivo* need to be determined to support this hypothesis. Altogether, these results suggest that tyrosine kinase signaling also promotes cadherin function by allowing this adhesion receptor to signal to PtdIns3'-kinase.

Our findings showing the coprecipitation of Src kinase and PtdIns3'-kinase with human VE-cadherin in breast tumoral tissue support the concept that VE-cadherin molecules can influence cellular behavior by acting as adhesion-activated signaling receptors, thus triggering signaling cascades among which are those leading to cellular survival. Indeed, in colon cancer cells, it was shown that increased Src kinase activity increase Akt phosphorylation, suggesting that Src activation contributes to cell death resistance through the PtdIns3'-kinase /Akt pathway.³⁹ In addition, it was reported that constitutively active PtdIns3'-kinase induced angiogenesis, while inhibition of PtdIns3'-kinase interfered with angiogenesis.⁴⁰ We therefore suggest that the concurrent VE-cadherin tyrosine phosphorylation and activation of downstream proliferation signals may enhance the proliferation and survival of breast cancer vasculature and consequently the proliferation of tumor cells. Altogether, these results provide an important insight into the functions of VE-cadherin in cancers that may therefore lead to improved therapeutic interventions for human tumoral angiogenesis.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by INSERM EMI-02-19, Commissariat à l'Energie Atomique, Direction des Sciences du Vivant/ Département Réponse et Dynamique Cellulaire, Association pour la Recherche contre le Cancer, Fédération Nationale des Centres de Lutte contre le Cancer, Fondation pour la Recherche Médicale, and Ligue Nationale contre le Cancer.

LEGENDS FOR FIGURES

Figure 1: Detection of VE-Cadherin messenger RNA and protein in breast carcinoma.

A. RT-PCR analysis. Approximately 200 ng of total RNA from tumoral breast tissue (right panel) was reverse-transcribed and amplified using exponential non saturating conditions with specific oligonucleotides for VE-cadherin. PCR products were separated on ethidium bromide-stained 2.5% agarose gel. RNA from human placenta were used as positive control (left panel). Arrow heads point to band corresponding to VE-cadherin mRNA. All cDNA samples were adjusted to yield equivalent amplification of hypoxanthine phosphoribosyltransferase (*hprt*) as a reference standard. Shown are data from a typical experiment out of three performed. B. Proteins from tissue extracts (80 µg) were analysed by SDS-PAGE (12% acrylamide) as described in Material and Methods. N, Normal; T1-T4, tumoral; P1, placenta. Immunoblot analysis was performed with the anti-VE-cadherin antibody directed against the extracellular domain of human VE-cadherin. Molecular mass standards (in kDa) are shown at the left. Shown are data from a typical experiment out of three performed.

Figure 2: VE-cadherin is tyrosine-phosphorylated in breast carcinoma tissue.

Westernblot analysis. A, B: Equal amounts of proteins from normal tissue lysates (A) or 2 tumoral tissue lysates T1 T2 (B) were analyzed by SDS/PAGE and westernblotting with the antiphosphotyrosine antibody (Clone 4G10, UBI). The molecular mass standards (in kDa) are shown at the left. Bands were detected by ECL revelation.

C: 500 µg of tissue protein were immunoprecipitated with an antiphosphotyrosine antibody (4G10) and analyzed by SDS-PAGE and westernblotting with the anti human VE-cadherin antibody and the antiphosphotyrosine antibody.

D: 500 µg of tissue protein were immunoprecipitated with the anti human VE-cadherin antibody and analyzed by SDS-PAGE and westernblotting. VE-cadherin immunoprecipitates were successively revealed with anti-P-Tyr (left panel) and anti-VE-cadherin (right panel) antibodies. This experiment is representative of three additional experiments.

Figure 3: Src tyrosine kinase activity in normal and tumoral breast tissues.

The kinase assay was performed at 30°C for 10 min in the presence of 10 µM ATP and 1 µCi [γ -³²P]ATP in the absence or presence of 2.5 µg acid-treated enolase. The phosphorylation reaction was stopped by the addition of

concentrated electrophoresis solubilization buffer, and the proteins were heated for 5 min at 100°C and separated by SDS-PAGE. The gels were stained with Coomassie Brilliant Blue, and the phosphorylated proteins were visualized by autoradiography at -80°C using intensifying screens.

A. Increasing concentration of protein of each tissue extract (from 0.1 to 5 µg) were tested for Src kinase activity in the absence and in the presence of enolase. The radioactive enolase spots were quantified using a phosphorImager and the values were plotted against incubation protein concentration (right panel).

B. The kinetic of the phosphorylation of enolase was studied with 1 µg of each extract and the reaction was run from 0 to 30 min at 37°C. The radioactive enolase spots were quantified using a phosphorImager and the values were plotted against time of incubation (right panel).

C. VE-cadherin was immunoprecipitated from human placental extract (100, 200, 500 µg of proteins) as positive control, and immunoprecipitates were subjected to kinase assay with or without enolase as substrate as described above: C1 shows the coomassie staining of the gel to visualize the presence or absence of enolase. C2 is the autoradiography of the gel showing the ³²P labelled enolase.

D. VE-cadherin was immunoprecipitated from human breast tissue (200 and 400 µg of proteins from normal or tumoral tissues). Immunoprecipitates were subjected to kinase assay in the presence of enolase. Arrow heads point to bands corresponding to the enolase. This experiment is representative of three additional experiments.

Figure 4: PtdIns3'-kinase activity in normal breast tissue extract and in breast carcinoma.

A. Kinetic analysis of PtdIns3'-kinase activity from normal breast tissue extract and from tumoral breast tissue. 20 µg cellular extract from normal breast tissue and from breast carcinoma tissue were incubated at different time from 0 to 30 min at 37°C in the presence of PI (2 mg/ml), (γ ³²P-ATP (5 µM, 5 µCi), MgCl₂ (25 mM). The reaction was stopped by the addition of 100 µl HCL 1N. The radioactive phospholipids were extracted in the presence of CHCL₃:CH₃OH (1:1)/(HCL 1N). The samples were dried and analyzed by TLC on silica gel plates and autoradiography. The radioactive spots were quantified using a phosphorImager program and the values were plotted against time of incubation (lower panel).

B. Increasing concentrations of cellular extract were incubated in the presence of PI (2 mg/ml), (γ ³²P-ATP (5 µM, 5 µCi), MgCl₂ (25 mM) for 20 min at 37°C. The radioactive phospholipids product were extracted in the presence of CHCL₃:CH₃OH (1:1)/(HCL 1N). After evaporation of the chloroformic phase, the samples were analyzed by silica gel TLC and autoradiography. The radioactive spots were quantified using a phosphorImager programm and the values were plotted against protein concentration (lower panel).

Figure 5: VE-cadherin is associated with the PtdIns3'-kinase in breast carcinoma

A. 1 mg of proteins from the breast carcinoma tissue were immunoprecipitated either with the anti PtdIns3'-kinase antibody or with the anti-VE-cadherin antibody. The immunoblotting analysis was performed with the anti human VE-cadherin antibody (left panel) or with the anti PtdIns3'-kinase antibody (right panel) . The molecular weight markers are indicated on the left lane: 250, 150, 100, 75 kDa. Arrows indicate the position of VE-cadherin (VE-cad), and of PtdIns3'-kinase.

B. Immunoprecipitation of PtdIns3'-kinase activity from normal breast tissue extract and from breast carcinoma. 500 µg of proteins from tissue extract of breast carcinoma and from normal breast tissue were immunoprecipitated with increasing concentration of anti PtdIns3'-kinase antibody specific for the p85 sub-unit of the PtdIns3'-kinase. The enzyme activity was assayed in the immunoprecipitates as described in Figure 4. The radioactive phospholipids were analyzed by silica gel TLC and autoradiography.

C. 500 µg of tissue extract from the breast carcinoma were immunoprecipitated with increasing concentrations of the anti-human VE-cadherin antibody. The PtdIns3'-kinase activity was assayed in the immunoprecipitates as described in Methods. The radioactive phospholipids were analyzed by silica gel TLC and autoradiography.

D. The radioactive spots from C were quantified using a phosphorImager program and the values were plotted against ul of VE-cadherin antibody.

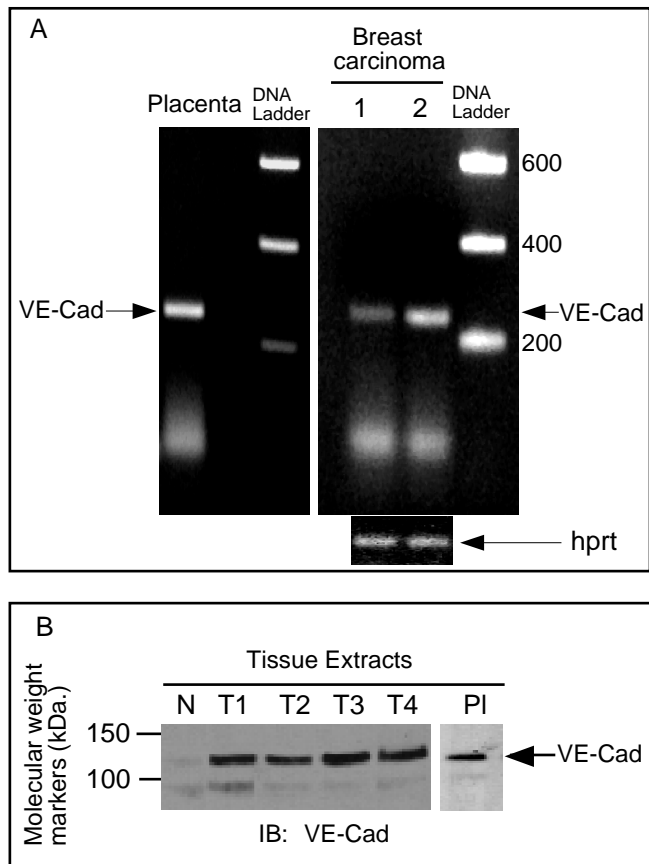
REFERENCES

1. Lambeng, N., Y. Wallez, C. Rampon, F. Cand, G. Christe, D. Gulino-Debrac, I. Vilgrain, and P. Huber. Vascular endothelial-cadherin tyrosine phosphorylation in angiogenic and quiescent adult tissues. *Circ Res*, 2005. **96**(3): p. 384-91.
2. Weidner, N. Intratumor microvessel density as a prognostic factor in cancer. *Am J Pathol*, 1995. **147**(1): p. 9-19.
3. Dejana, E., M. Corada, and M.G. Lampugnani. Endothelial cell-to-cell junctions. *Faseb J*, 1995. **9**(10): p. 910-8.
4. Vittet, D., T. Buchou, A. Schweitzer, E. Dejana, and P. Huber. Targeted null-mutation in the vascular endothelial-cadherin gene impairs the organization of vascular-like structures in embryoid bodies. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. **94**(12): p. 6273-8.
5. Pawson, T. Specificity in signal transduction: from phosphotyrosine-SH2 domain interactions to complex cellular systems. *Cell*, 2004. **116**(2): p. 191-203.
6. Gumbiner, B.M. Regulation of cadherin adhesive activity. *J Cell Biol*, 2000. **148**(3): p. 399-404.
7. Esser, S., M.G. Lampugnani, M. Corada, E. Dejana, and W. Risau. Vascular endothelial growth factor induces VE-cadherin tyrosine phosphorylation in endothelial cells. *J Cell Sci*, 1998. **111** (Pt 13): p. 1853-65.
8. Weis, S., S. Shintani, A. Weber, R. Kirchmair, M. Wood, A. Cravens, H. McSharry, A. Iwakura, Y.S. Yoon, N. Himes, D. Burstein, J. Doukas, R. Soll, D. Losordo, and D. Cheresch. Src blockade stabilizes a Flk/cadherin complex, reducing edema and tissue injury following myocardial infarction. *J Clin Invest*, 2004. **113**(6): p. 885-94.
9. Potter, M.D., S. Barbero, and D.A. Cheresch. Tyrosine phosphorylation of VE-cadherin prevents binding of p120- and beta-catenin and maintains the cellular mesenchymal state. *J Biol Chem*, 2005. **280**(36): p. 31906-12.
10. Hudry-Clergeon, H., D. Stengel, E. Ninio, and I. Vilgrain. Platelet-activating factor increases VE-cadherin tyrosine phosphorylation in mouse endothelial cells and its association with the PtdIns3'-kinase. *Faseb J*, 2005. **19**(6): p. 512-20.
11. Grazia Lampugnani, M., A. Zanetti, M. Corada, T. Takahashi, G. Balconi, F. Breviario, F. Orsenigo, A. Cattelino, R. Kemler, T.O. Daniel, and E. Dejana. Contact inhibition of VEGF-induced proliferation requires vascular endothelial cadherin, beta-catenin, and the phosphatase DEP-1/CD148. *J Cell Biol*, 2003. **161**(4): p. 793-804.
12. Zanetti, A., M.G. Lampugnani, G. Balconi, F. Breviario, M. Corada, L. Lanfrancone, and E. Dejana. Vascular endothelial growth factor induces SHC association with vascular endothelial cadherin: a potential feedback mechanism to control vascular endothelial growth factor receptor-2 signaling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002. **22**(4): p. 617-22.
13. Breviario, F., L. Caveda, M. Corada, I. Martin-Padura, P. Navarro, J. Golay, M. Introna, D. Gulino, M.G. Lampugnani, and E. Dejana. Functional properties of human vascular endothelial cadherin (7B4/cadherin-5), an endothelium-specific cadherin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1995. **15**(8): p. 1229-39.
14. Gaillard, I., M. Keramidas, P. Liakos, I. Vilgrain, J.J. Feige, and D. Vittet. ACTH-regulated expression of vascular endothelial growth factor in the adult bovine adrenal cortex: a possible role in the maintenance of the microvasculature. *J Cell Physiol*, 2000. **185**(2): p. 226-34.

15. Daniel, J.M. and A.B. Reynolds. Tyrosine phosphorylation and cadherin/catenin function. *Bioessays*, 1997. **19**(10): p. 883-91.
16. Martin, T.A., G. Watkins, J. Lane, and W.G. Jiang. Assessing microvessels and angiogenesis in human breast cancer, using VE-cadherin. *Histopathology*, 2005. **46**(4): p. 422-30.
17. Weidner, N., J.P. Semple, W.R. Welch, and J. Folkman. Tumor angiogenesis and metastasis--correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med*, 1991. **324**(1): p. 1-8.
18. Horak, E.R., R. Leek, N. Klenk, S. LeJeune, K. Smith, N. Stuart, M. Greenall, K. Stepniewska, and A.L. Harris. Angiogenesis, assessed by platelet/endothelial cell adhesion molecule antibodies, as indicator of node metastases and survival in breast cancer. *Lancet*, 1992. **340**(8828): p. 1120-4.
19. Bosari, S., A.K. Lee, R.A. DeLellis, B.D. Wiley, G.J. Heatley, and M.L. Silverman. Microvessel quantitation and prognosis in invasive breast carcinoma. *Hum Pathol*, 1992. **23**(7): p. 755-61.
20. Fox, S.B., R.D. Leek, K. Smith, J. Hollyer, M. Greenall, and A.L. Harris. Tumor angiogenesis in node-negative breast carcinomas--relationship with epidermal growth factor receptor, estrogen receptor, and survival. *Breast Cancer Res Treat*, 1994. **29**(1): p. 109-16.
21. Weidner, N., J. Folkman, F. Pozza, P. Bevilacqua, E.N. Allred, D.H. Moore, S. Meli, and G. Gasparini. Tumor angiogenesis: a new significant and independent prognostic indicator in early-stage breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst*, 1992. **84**(24): p. 1875-87.
22. Lampugnani, M.G., M. Corada, P. Andriopoulou, S. Esser, W. Risau, and E. Dejana. Cell confluence regulates tyrosine phosphorylation of adherens junction components in endothelial cells. *J Cell Sci*, 1997. **110** (Pt 17): p. 2065-77.
23. Andriopoulou, P., P. Navarro, A. Zanetti, M.G. Lampugnani, and E. Dejana. Histamine induces tyrosine phosphorylation of endothelial cell-to-cell adherens junctions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1999. **19**(10): p. 2286-97.
24. Maisonpierre, P.C., C. Suri, P.F. Jones, S. Bartunkova, S.J. Wiegand, C. Radziejewski, D. Compton, J. McClain, T.H. Aldrich, N. Papadopoulos, T.J. Daly, S. Davis, T.N. Sato, and G.D. Yancopoulos. Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science*, 1997. **277**(5322): p. 55-60.
25. Lewalle, J.M., K. Bajou, J. Desreux, M. Mareel, E. Dejana, A. Noel, and J.M. Foidart. Alteration of interendothelial adherens junctions following tumor cell-endothelial cell interaction in vitro. *Exp Cell Res*, 1997. **237**(2): p. 347-56.
26. Cai, J., W.G. Jiang, and R.E. Mansel. Phosphorylation and disorganization of vascular-endothelial cadherin in interaction between breast cancer and vascular endothelial cells. *Int J Mol Med*, 1999. **4**(2): p. 191-5.
27. Alper, O. and E.T. Bowden. Novel insights into c-Src. *Curr Pharm Des*, 2005. **11**(9): p. 1119-30.
28. Tsukita, S., K. Oishi, T. Akiyama, Y. Yamanashi, and T. Yamamoto. Specific proto-oncogenic tyrosine kinases of src family are enriched in cell-to-cell adherens junctions where the level of tyrosine phosphorylation is elevated. *J Cell Biol*, 1991. **113**(4): p. 867-79.
29. Takata, K. and S.J. Singer. Phosphotyrosine-modified proteins are concentrated at the membranes of epithelial and endothelial cells during tissue development in chick embryos. *J Cell Biol*, 1988. **106**(5): p. 1757-64.
30. Volberg, T., Y. Zick, R. Dror, I. Sabanay, C. Gilon, A. Levitzki, and B. Geiger. The effect of tyrosine-specific protein phosphorylation on the assembly of adherens-type junctions. *Embo J*, 1992. **11**(5): p. 1733-42.

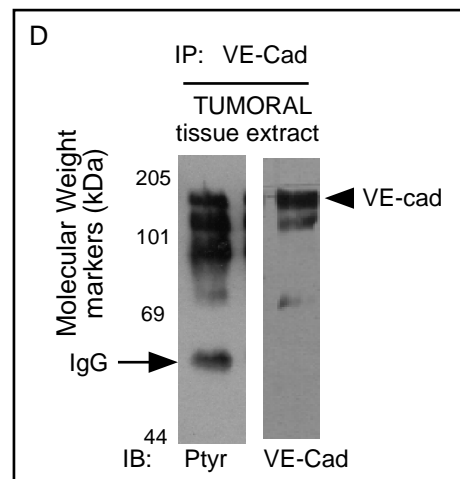
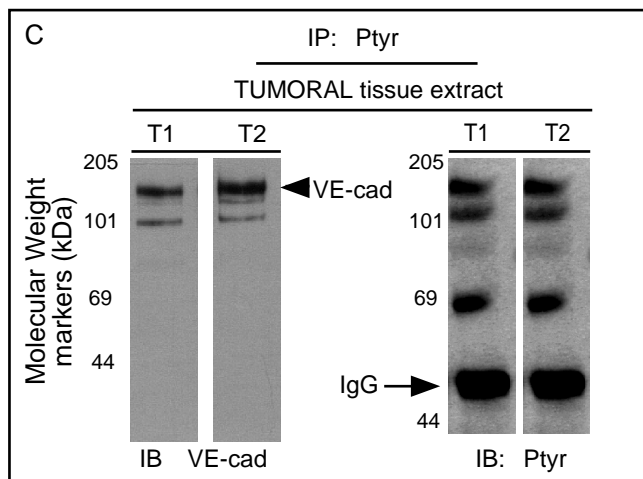
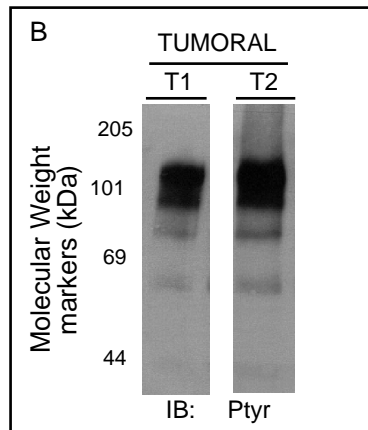
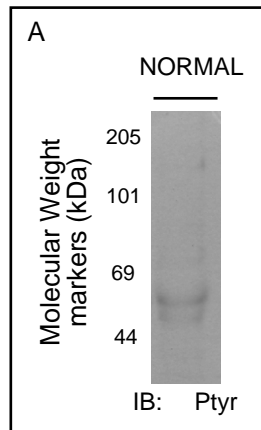
31. Weis, S.M. and D.A. Cheresh. Pathophysiological consequences of VEGF-induced vascular permeability. *Nature*, 2005. **437**(7058): p. 497-504.
32. Wallez, Y., I. Vilgrain, and P. Huber. Angiogenesis: the VE-cadherin switch. *Trends Cardiovasc Med*, 2006. **16**(2): p. 55-9.
33. Wallez, Y., F. Cand, F. Cruzalegui, C. Wernstedt, S. Souchelnytskyi, I. Vilgrain, and P. Huber. Src kinase phosphorylates VE-cadherin in response to VEGF: Identification of Tyrosine 685 as the unique target site. *Oncogene*, 2006. **In press**.
34. Toi, M., K. Inada, S. Hoshina, H. Suzuki, S. Kondo, and T. Tominaga. Vascular endothelial growth factor and platelet-derived endothelial cell growth factor are frequently coexpressed in highly vascularized human breast cancer. *Clin Cancer Res*, 1995. **1**(9): p. 961-4.
35. Li, S.Y., M. Rong, F. Grieu, and B. Iacopetta. PIK3CA mutations in breast cancer are associated with poor outcome. *Breast Cancer Res Treat*, 2006. **96**(1): p. 91-5.
36. Samuels, Y. and K. Ericson. Oncogenic PI3K and its role in cancer. *Curr Opin Oncol*, 2006. **18**(1): p. 77-82.
37. Wymann, M.P., M. Zvelebil, and M. Laffargue. Phosphoinositide 3-kinase signalling--which way to target? *Trends Pharmacol Sci*, 2003. **24**(7): p. 366-76.
38. 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.
39. Windham, T.C., N.U. Parikh, D.R. Siwak, J.M. Summy, D.J. McConkey, A.J. Kraker, and G.E. Gallick. Src activation regulates anoikis in human colon tumor cell lines. *Oncogene*, 2002. **21**(51): p. 7797-807.
40. Jiang, B.H., J.Z. Zheng, M. Aoki, and P.K. Vogt. Phosphatidylinositol 3-kinase signaling mediates angiogenesis and expression of vascular endothelial growth factor in endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. **97**(4): p. 1749-53.

↑
TOP



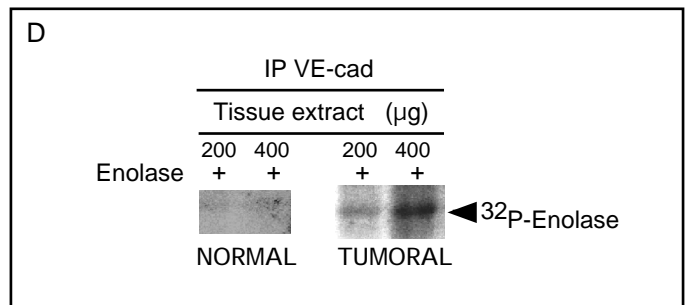
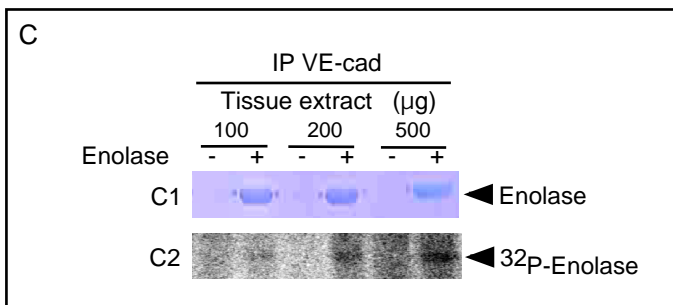
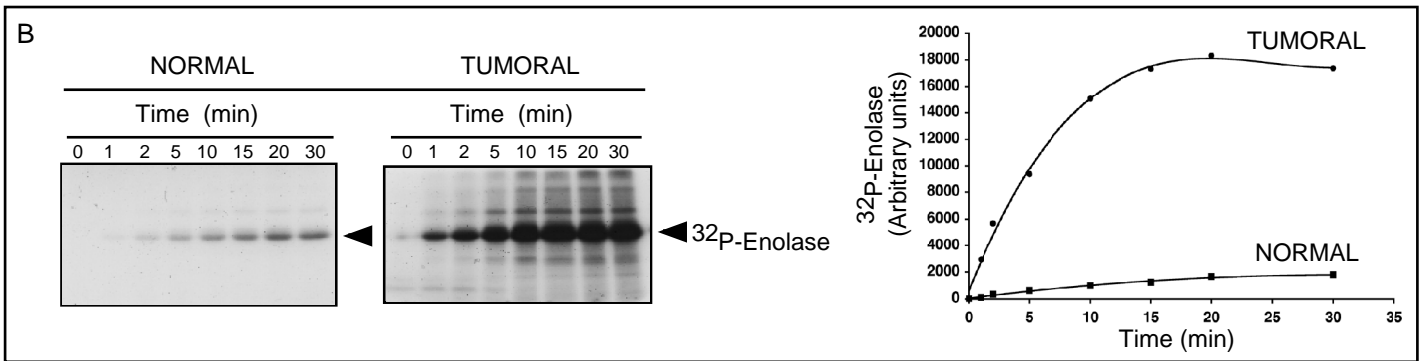
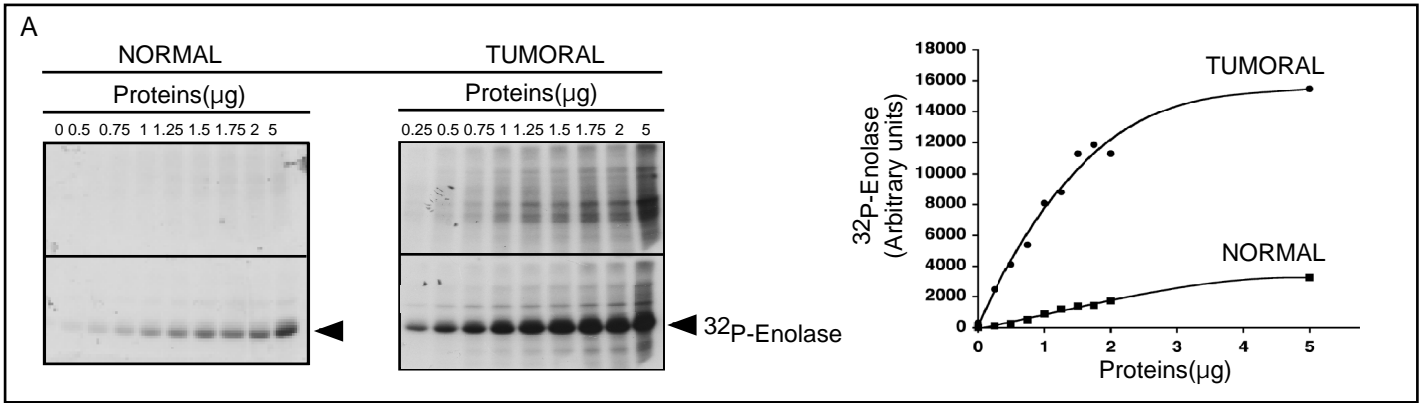
Wallez. Figure 1

TOP

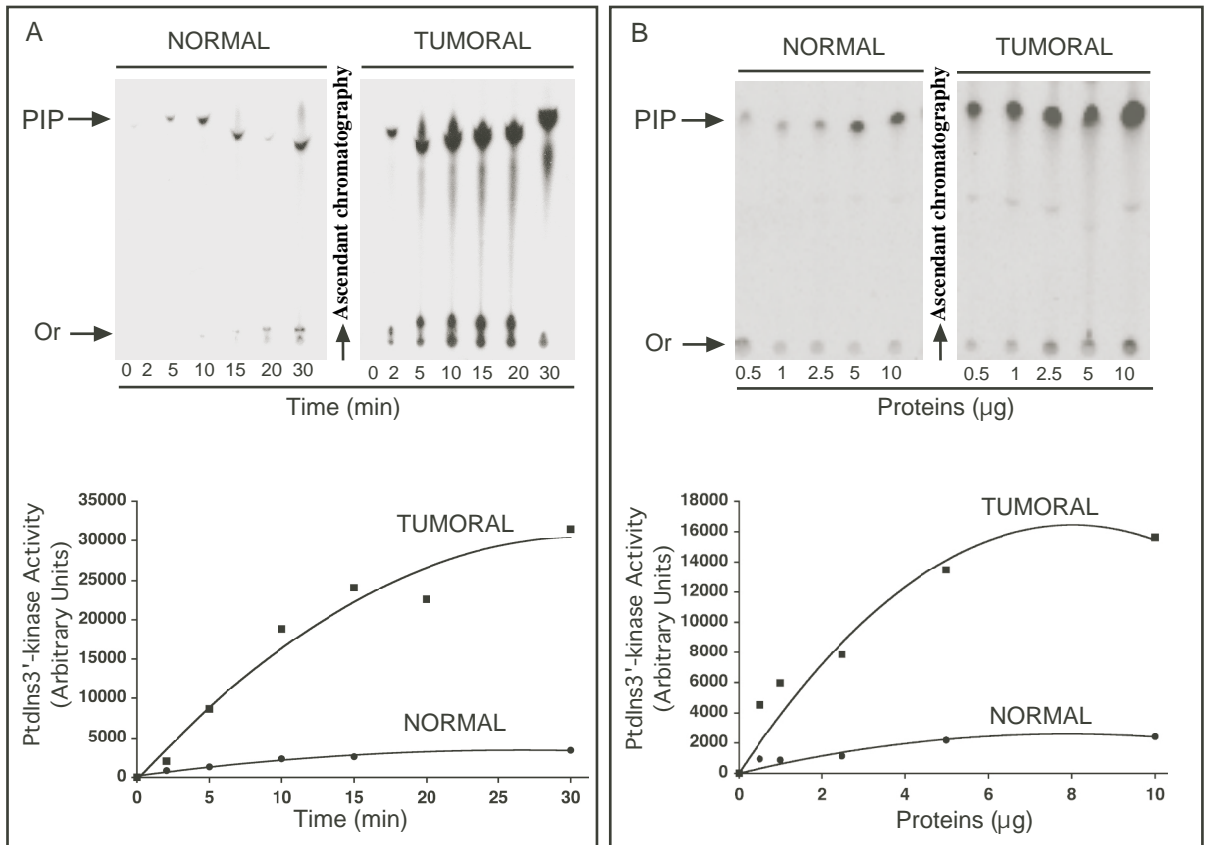


Wallez. Figure 2

TOP

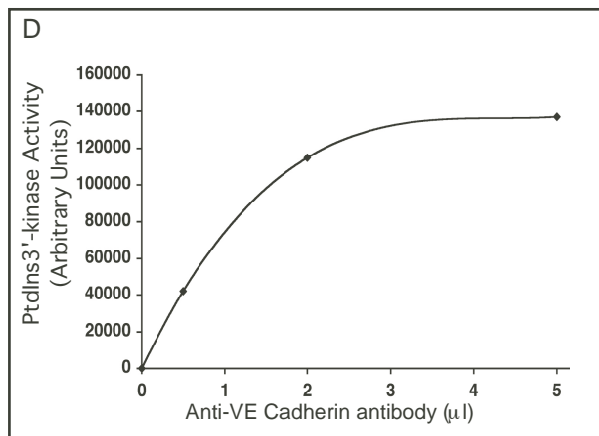
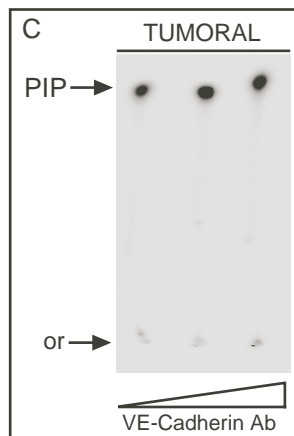
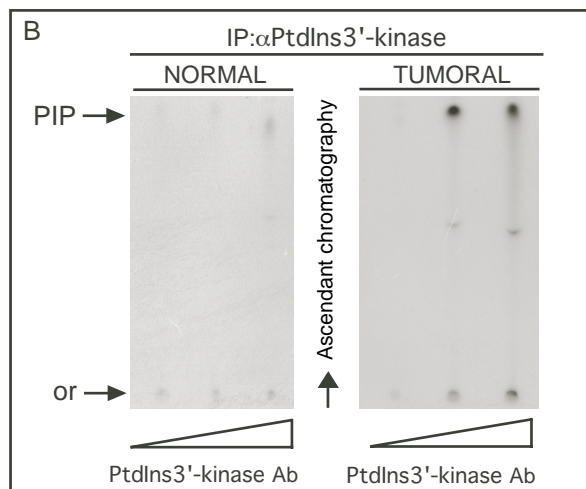
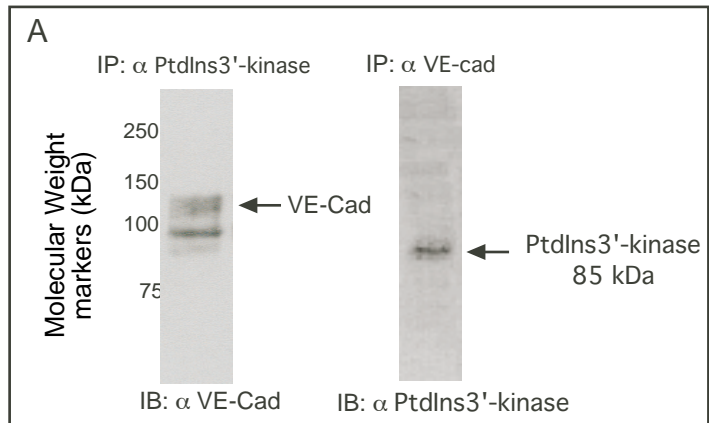


Wallez. Figure 3



Wallez. Figure 4

↑
TOP



Wallez. Figure 5

III.3. Discussion

III.3.1. Augmentation de l'expression de VE-cadhérine dans les carcinomes mammaires

Dans cette étude, avons détecté une augmentation de l'expression de VE-cadhérine dans les tumeurs mammaires par rapport aux tissus sains. Cette augmentation peut correspondre à une vascularisation accrue des carcinomes mammaires, car le niveau de VE-cadhérine y est comparable à celui du placenta, qui est un tissu richement vascularisé. De fait, la VE-cadhérine a été utilisée comme marqueur efficace de l'angiogenèse et des microvaisseaux des tumeurs mammaires (Martin, T.A. *et al.* 2005). En outre, Weidner et coll. ont mis en évidence une corrélation entre la densité des microvaisseaux tumoraux dans les cancers du sein et les métastases à distance (Weidner, N. *et al.* 1991). D'autres études ont démontré que la densité des microvaisseaux des carcinomes mammaires invasifs est un facteur pronostic de survie indépendant (Horak, E.R. *et al.* 1992; Weidner, N. *et al.* 1992).

III.3.2. Détection d'une forme phosphorylée de la VE-cadhérine dans les tumeurs mammaires

De façon intéressante, nous montrons la présence d'une forme phosphorylée sur tyrosine de la VE-cadhérine dans les carcinomes mammaires, alors que la phosphorylation est à peine détectable dans les tissus normaux.

L'existence de cette forme phosphorylée de la VE-cadhérine est en accord avec nos précédentes études *in vivo* montrant que cette protéine n'est pas phosphorylée dans les tissus quiescents de souris adultes, alors qu'elle le devient au cours de l'angiogenèse induite dans l'ovaire et l'utérus, où le rôle prépondérant du VEGF a clairement été démontré. La forte production de VEGF par les tumeurs mammaires peut l'impliquer dans la phosphorylation de la VE-cadhérine dans ces tissus tumoraux. En accord avec nos résultats, deux autres études rapportent la phosphorylation de la VE-cadhérine et la dissociation des jonctions suite à l'association *in vitro* de cellules endothéliales et tumorales (Cai, J. *et al.* 1999; Lewalle, J.M. *et al.* 1997).

III.3.3. Association d'une activité kinase de type Src à la VE-cadhérine dans les tumeurs mammaires

Dans ces échantillons mammaires, nous avons mesuré une très forte augmentation d'activité kinase de type Src dans les tissus néoplasiques par rapport aux tissus normaux. Ceci

est en accord avec les données de la littérature, qui rapportent l'augmentation de l'expression de Src ainsi que son activation dans de nombreux cancers humains (Alper, O. *et al.* 2005). De plus, nous montrons ici par « immuno kinase assay », qu'une partie de l'activité de Src est associée à la VE-cadhérine dans les carcinomes mammaires et non dans les tissus normaux. À la différence des deux précédentes études, où nous trouvions une association constante de Src à la VE-cadhérine *in vivo* et *in vitro*, cette association n'a pas pu être mise en évidence ici dans les tissus normaux. Par contre, en corrélation avec nos résultats *in vivo* chez la souris et *in vitro* dans les HUVECs, l'association Src/ VE-cadhérine dans les tumeurs pourrait représenter la signature d'un endothélium activé.

III.3.4. Association de la PI3K à la VE-cadhérine dans les tumeurs mammaires

De façon intéressante, notre étude sur les tissus tumoraux montre une activité PI3K très élevée, en comparaison des tissus normaux. Ceci est en accord avec les données de la littérature qui attribuent un rôle important à la voie de signalisation PI3K-AKT dans la tumorigenèse (Li, S.Y. *et al.* 2006; Samuels, Y. *et al.* 2006). De plus, dans les tumeurs du sein, nous montrons qu'une partie de l'activité PI3K est associée à la VE-cadhérine. Le mécanisme impliqué dans cette association n'est pas encore connu, mais l'association de la PI3K au VEGF-R2 a été décrite, suggérant l'existence d'un complexe multimérique. En effet, la sous-unité régulatrice p85 de la PI3K contient deux domaines SH2 (Wymann, M.P. *et al.* 2003), qui sont impliqués dans la liaison de phosphotyrosines spécifiques du domaine cytoplasmique du VEGF-R2 (Dayanir, V. *et al.* 2001). D'autres données de notre laboratoire montrent que l'association VE-cadhérine/ PI3K est bloquée par des inhibiteurs de tyrosine kinases, supportant l'importance de ces enzymes pour l'assemblage du complexe VE-cadhérine-PI3K (Hudry-Clergeon, H. *et al.* 2005).

L'ensemble de nos résultats établit l'existence de la phosphorylation sur tyrosine de la VE-cadhérine au cours de l'angiogenèse tumorale. Le rôle direct de la tyrosine kinase Src dans cette phosphorylation n'a pas encore été démontré, et les sites phosphorylés ne sont pas encore identifiés. Cependant, cette phosphorylation pourrait avoir un rôle direct dans l'ouverture des jonctions, nécessaire aux étapes précoces de l'angiogenèse ainsi que dans l'extravasation des cellules tumorales. En outre la phosphorylation de la VE-cadhérine pourrait, via le recrutement de la PI3K, augmenter les signaux de prolifération et de survie du

système vasculaire tumoral, favorisant ainsi la prolifération des cellules tumorales elles-mêmes.

Discussion et perspectives

Dans ce travail de thèse, nous avons étudié le mécanisme moléculaire de la phosphorylation de la cadhérine endothéliale, et son existence dans les processus d'angiogenèse physiologique et tumorale. Les résultats présentés ici montrent :

- 1- La détection d'une forme phosphorylée sur tyrosine de la VE-cadhérine au cours de l'angiogenèse hormono régulée, ainsi que l'association de cette forme phosphorylée avec le VEGF-R2.
- 2- Une association Src/ VE-cadhérine *in vivo* et *in vitro*.
- 3- La phosphorylation de la VE-cadhérine par Src sur la tyrosine 685 en réponse au VEGF dans des cellules endothéliales.
- 4- L'existence d'une VE-cadhérine phosphorylée dans un tissu humain tumoral angiogénique et sa capacité à recruter des protéines de la signalisation cellulaire.

L'ensemble de ces données démontre une régulation de l'intégrité de l'endothélium vasculaire par un mécanisme de phosphorylation ciblant une protéine exclusivement endothéliale, sur un site unique (Y685) dans la signalisation dépendante de VEGF. Ces résultats, en perspective avec les données de la littérature, nous conduisent à discuter les points suivants :

I. Conséquences de la phosphorylation de la VE-cadhérine

I.1. Phosphorylation de la tyrosine 685 et rôle de la liaison avec Csk

De façon intéressante, cette tyrosine 685 du domaine cytoplasmique de la VE-cadhérine, se trouve dans un site consensus (YxxV/I/L) favorable à la phosphorylation par les kinases de la famille Src (Lindquist, J.A. *et al.* 2003). De plus, elle est la seule tyrosine du domaine cytoplasmique de la VE-cadhérine (à l'exception de la tyrosine C-terminale qui est présente dans la VE-cadhérine humaine mais pas murine), qui ne trouve pas d'équivalents dans d'autres cadhérines. En outre, cette tyrosine spécifique de la VE-cadhérine, est la seule parmi l'ensemble des tyrosines des cadhérines qui se trouve dans un site consensus pY(T/A/S)X(M/I/V) pour la liaison de Csk (Songyang, Z. *et al.* 1994). En effet, en accord

avec les travaux de Baumeister et coll. (Baumeister, U. *et al.* 2005), nous montrons que la liaison du domaine SH2 de Csk à la VE-cadhérine est fortement augmentée dans les CHO transfectées par Src actif, et nous concluons donc que le recrutement de Csk par la VE-cadhérine est induit par Src. Comme Csk est un régulateur négatif de l'activité de Src, son recrutement par la VE-cadhérine pourrait être un processus efficace de régulation du niveau de phosphorylation de la kinase. Baumeister et coll. présentent d'ailleurs un certain nombre d'évidences démontrant le rôle du recrutement de Csk dans l'inhibition de contact induite par la VE-cadhérine (Cf. III.4.2.4, p47).

Un tel mécanisme de rétrocontrôle négatif des kinases de type Src, par le recrutement de Csk par les kinases elles-mêmes, n'est pas un cas isolé. En effet, dans les lymphocytes, l'activation du TCR qui fait intervenir les kinases Lck et Fyn, est réprimé par recrutement de Csk au niveau de la protéine PAG (Lindquist, J.A. *et al.* 2003). Un autre cas a été rapporté, tout à fait similaire à celui de l'inhibition de la voie du VEGF-R2 par la VE-cadhérine, où le recrutement de Csk par Dok-R inhibe la prolifération induite par l'EGF (Van Slyke, P. *et al.* 2005) (Cf. Figure 21 : Le recrutement de Csk par Dok-R neutralise l'action proliférative de l'EGF).

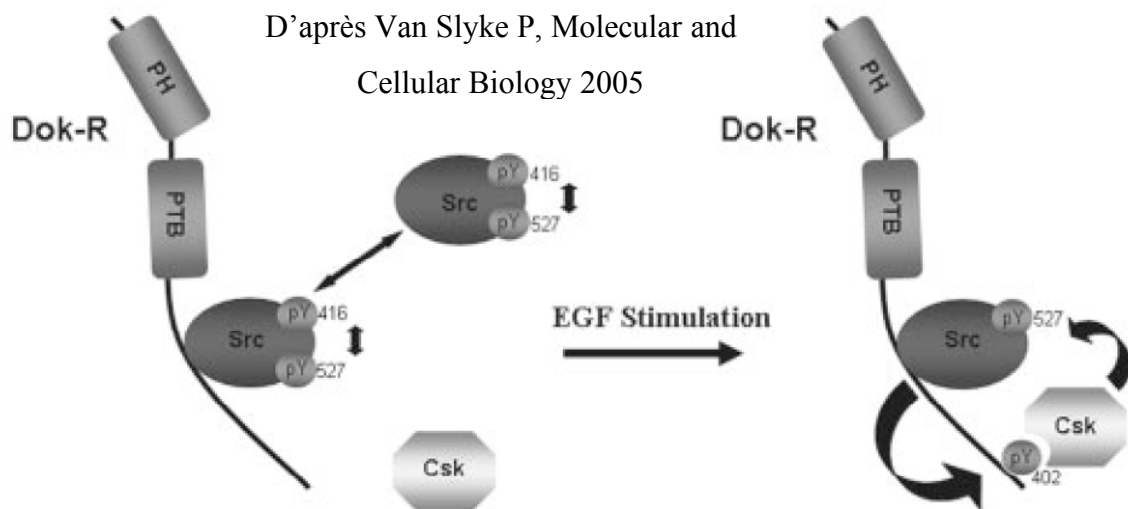


Figure 21 : Le recrutement de Csk par Dok-R neutralise l'action proliférative de l'EGF

I.2. Phosphorylation sur les tyrosines 658 et 731

Récemment, Potter et coll. ont rapporté que Src actif ou l'inactivation des PTP induisent la phosphorylation de la VE-cadhérine sur les tyrosines 658 et 731, mais pas 685, ce qui est en contradiction avec nos résultats (Potter, M.D. *et al.* 2005).

Les auteurs utilisent des cellules CHO qu'ils transfectent avec différentes VE-cadhérines portant des mutations des résidus tyrosine soit en phénylalanine, pour empêcher la phosphorylation, soit en acide glutamique pour au contraire la mimer. Ils observent que les mutations Y658E et Y731E préviennent respectivement l'interaction de p120 et de la β -caténine. De plus, la mutation phospho-mimétique d'un seul de ces sites diminue l'étanchéité de la monocouche de CHO, et augmente la migration et le caractère invasif de ces cellules. De façon troublante, les auteurs remarquent qu'aucune des mutations Y-E ou Y-F ne diminue le niveau d'expression de la cadhérine ou sa capacité adhésive. La perte d'étanchéité provoquée par ces mutations pourrait donc être due au décrochage du cytosquelette via la dissociation de la β -caténine ou de p120.

Cependant, la perte de p120 pourrait directement agir sur le niveau d'expression membranaire de la VE-cadhérine. En effet, en utilisant des cellules endothéliales, plusieurs groupes ont montré que p120 protège la VE-cadhérine de l'internalisation dans des vésicules de clathrine et la dégradation de la protéine par la voie endolysosomale (Iyer, S. *et al.* 2004; Xiao, K., Allison, D.F., Buckley, K.M. *et al.* 2003; Xiao, K., Allison, D.F., Kottke, M.D. *et al.* 2003; Xiao, K. *et al.* 2005).

Dans une revue récente, Mukherjee et coll. mettent en lien ces données et annoncent que dans les cellules endothéliales (Cf. leur figure 3), le VEGF dissocie les jonctions en provoquant l'internalisation de la VE-cadhérine via la phosphorylation des tyrosines 658 et 731, qui provoque la dissociation de la β -caténine et de p120 (Mukherjee, S. *et al.* 2006). Quelques éléments nécessaires à cette conclusion sont cependant manquants. D'une part, la phosphorylation de la tyrosine 658, dont la mutation en acide glutamique prévient la liaison de p120, n'a pas pu être mise en évidence dans des cellules endothéliales. D'autre part, si la phosphorylation de la tyrosine 731 a pu être observée dans les HUVECs, c'est en réponse à un traitement des cellules au pervanadate de sodium, et non pas en réponse au VEGF (Potter, M.D. *et al.* 2005). Pour notre part, nous n'avons jamais pu montrer dans nos marquages métaboliques de cellules HUVECs, d'autres phosphorylations que celle de la Y685 en réponse au VEGF.

I.3. Phosphorylation de la sérine 665

Tout récemment, une étude convaincante a identifié un site de phosphorylation sur sérine dans le domaine cytoplasmique de la VE-cadhérine. La Ser/ Thr kinase PAK1 phosphoryle la sérine 665 de la VE-cadhérine, et ceci est nécessaire et suffisante à l'endocytose de la protéine dans des vésicules de clathrine, en réponse au VEGF (Gavard, J. *et al.* 2006).

Cette étude offre une nouvelle vision du processus d'ouverture des jonctions par le VEGF, mais ne permet pas de répondre quant au rôle des phosphorylations sur tyrosines, qui y sont toujours associées.

L'ensemble de ces résultats révèle la complexité de l'étude du rôle de la phosphorylation d'un résidu tyrosine unique, en réponse à un facteur de croissance tel que le VEGF, impliqué dans de multiples voies de signalisation.

II. VE-cadhérine et PTP

Une caractéristique importante des processus de phosphorylation est leur réversibilité, qui permet un contrôle et une adaptation rapides des cellules.

L'inhibition des PTP dans les cellules endothéliales induit la phosphorylation des protéines des jonctions et augmente la perméabilité et la transmigration des neutrophiles (Young, B.A. *et al.* 2003). Nous montrons, dans notre étude *in vivo*, que la phosphorylation de la VE-cadhérine dans les vaisseaux quiescents est réprimée par une activité phosphatase. Il se trouve que plusieurs études rapportent l'association de la VE-cadhérine à des PTP.

II.1. SHP2

Cette phosphatase, qui interagit avec la β -caténine, semble maintenir les caténines associées à la VE-cadhérine (β -caténine, γ -caténine et p120) dans un état non phosphorylé (Ukropec, J.A. *et al.* 2000). La stimulation des cellules endothéliales par la thrombine provoque la dissociation de SHP2 du complexe, et la phosphorylation subséquente des protéines jonctionnelles, qui aboutit à l'augmentation de la perméabilité endothéliale.

II.2. VE-PTP

La VE-PTP est une PTP de type récepteur à un domaine transmembranaire, qui a la capacité d'interagir avec le domaine extracellulaire de la VE-cadhérine, et de neutraliser sa phosphorylation induite par l'activation du VEGF-R2, ainsi que l'augmentation subséquente de la perméabilité (Nawroth, R. *et al.* 2002). L'expression de la VE-PTP est restreinte à l'endothélium et la phosphatase a également la capacité d'interagir et d'induire la déphosphorylation de Tie 2 (Fachinger, G. *et al.* 1999). L'inactivation génique de la VE-PTP a été réalisée (Baumer, S. *et al.* 2006). Bien que la formation initiale des vaisseaux sanguins ne soit pas affectée, leur remodelage subséquent et leur maintien sont abolis, ce qui conduit à la mort des embryons de souris au stade 10 jours.

II.3. Dep-1

La PTP Dep-1 est aussi une PTP de type récepteur qui est surexprimée par la densité cellulaire (Ostman, A. *et al.* 1994). Cette phosphatase s'associe aux jonctions endothéliales par l'intermédiaire de la VE-cadhérine, et participe à l'inhibition de contact (Cf. III.4.2.2, p46) en induisant la déphosphorylation du VEGF-R2 (Grazia Lampugnani, M. *et al.* 2003).

II.4. PTP μ

La PTP de type récepteur, PTP μ , est presque exclusivement exprimée par l'endothélium où elle se localise au niveau des jonctions interendothéliales (Bianchi, C. *et al.* 1999). Dans des cellules endothéliales humaines en culture, l'inhibition de la phosphatase par interférence ARN augmente fortement la perméabilité, tandis que sa surexpression la réduit (Sui, X.F. *et al.* 2005). De plus, PTP μ interagit directement avec la VE-cadhérine, et la surexpression de la phosphatase diminue la phosphorylation sur tyrosine de la VE-cadhérine mais pas celle de la β -caténine (Sui, X.F. *et al.* 2005).

Ainsi, deux PTP, VE-PTP et PTP μ , sont associées à la VE-cadhérine et pourraient dans les conditions physiologiques, préserver la fonction de barrière endothéliale en restreignant la phosphorylation sur tyrosine de la VE-cadhérine.

III. Perspectives

Nos expériences ont permis d'identifier la tyrosine 685 de la VE-cadhérine comme substrat direct de Src en réponse au VEGF. Les mécanismes de régulation de cette phosphorylation restent à élucider. En effet, la phosphatase qui déphosphoryle cette tyrosine n'est pas encore identifiée. Les phosphatases VE-PTP et PTP μ induisent une diminution de la phosphorylation de la VE-cadhérine et sont donc des candidats potentiels probables. Des expériences de phosphorylation/ déphosphorylation *in vitro* devront donc être entreprises pour élucider la question.

L'identification du site de phosphorylation de la VE-cadhérine *in vivo* reste à faire. Est-ce la tyrosine 685 ? Pour répondre à cette question, la production d'un anticorps antiphosphosite dirigé contre la phosphoY685 est en cours de production. Un tel anticorps constituerait un outil puissant qui permettrait de détecter spécifiquement les endothéliums activés, et pourrait devenir alors un outil diagnostique d'un site angiogénique tumoral.

Le rôle *in vivo* de la phosphorylation de la tyrosine 685 sera déterminé par la réalisation d'une souris transgénique « knock-in », exprimant une VE-cadhérine où la tyrosine 685 sera remplacée en phénylalanine. Le développement et la fonction vasculaire de ces animaux pourraient alors être étudiés, afin d'élucider la fonction de cette tyrosine dans les processus de vasculogénèse, d'angiogénèse et d'inflammation.

Nous avons observé une association constante de Src avec la VE-cadhérine aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*. Pourtant le niveau de phosphorylation de la kinase associée à la VE-cadhérine augmente au cours de l'angiogénèse. Cette interaction semble forte et directe, puisqu'elle est retrouvée même en présence de détergents en concentration suffisante pour dissocier les caténines. Ceci soulève la question des domaines permettant l'interaction de Src avec la VE-cadhérine. Une approche utilisant une lignée de cellules Src^{-/-} est en cours. L'objectif est de transfecter cette lignée de façon stable avec la VE-cadhérine, puis de réaliser des co-transfections avec différents mutants de délétion de Src, afin d'identifier les domaines de la kinase nécessaires à l'interaction, par des expériences de co-immunoprécipitation .

Enfin, la recherche d'inhibiteurs potentiels de cette phosphorylation (analogue de substrat, inhibiteurs de Src), permettra une approche pharmacologique visant à prévenir les modifications de perméabilité endothéliale dans l'angiogénèse tumorale et l'inflammation. Dans l'angiogénèse tumorale, rétablir une bonne intégrité endothéliale permet de restaurer une perfusion efficace et donc de favoriser la délivrance des molécules antitumorales, tout en minimisant les processus métastatiques.

La phosphorylation sur tyrosine de la VE-cadhérine est clairement corrélée à l'ouverture des jonctions, tandis que sa déphosphorylation par les PTP restaure la fonction de barrière endothéliale. Étant donné l'importance de cette fonction, comprendre les mécanismes par lesquels ces modifications covalentes aboutissent à l'augmentation ou la diminution de la perméabilité, constitue une véritable gageure. Comme toutes les jonctions à base de cadhérines, l'intégrité des jonctions intercellulaires endothéliales dépend à la fois, du niveau d'expression de la VE-cadhérine à la surface cellulaire, de sa capacité à se lier au cytosquelette sous-jacent, et de sa fonction adhésive. Ce dernier point, qui fait référence à la signalisation « inside-out » décrite pour les intégrines, est souvent évoqué pour la VE-cadhérine. Il permettrait en effet d'expliquer comment, par une régulation de l'activité adhésive du domaine extracellulaire, un changement intracellulaire peut être couplé à des

modifications fonctionnelles à l'extérieur de la cellule. Le fait que le domaine extracellulaire de la VE-cadhérine puisse subir des changements conformationnels suffisants pour démasquer des épitopes (May, C. *et al.* 2005) est un argument en faveur d'un tel mécanisme.

IV. Article 4 (review) : Angiogenesis: The VE-cadherin Switch.

- Molloy CJ, Taylor DS, Pawlowski JE: 1999. Novel cardiovascular actions of the actinins. *J Endocrinol* 161:179–185.
- Peterson TE, Kleppe LS, Caplice NM, et al.: 1999. The regulation of caveolin expression and localization by serum and heparin in vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 265:722–727.
- Peterson TE, Guicciardi ME, Gulati R, et al.: 2003. Caveolin-1 can regulate vascular smooth muscle cell fate by switching platelet-derived growth factor signaling from a proliferative to an apoptotic pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23:1521–1527.
- Razani B, Engelman JA, Wang XB, et al.: 2001. Caveolin-1 null mice are viable but show evidence of hyperproliferative and vascular abnormalities. *J Biol Chem* 276:38121–38138.
- Rizzo V, McIntosh DP, Oh P, Schnitzer JE: 1998. In situ flow activates endothelial nitric oxide synthase in luminal caveolae of endothelium with rapid caveolin dissociation and calmodulin association. *J Biol Chem* 273:34724–34729.
- Rizzo V, Morton C, DePaola N, et al.: 2003. Recruitment of endothelial caveolae into mechanotransduction pathways by flow conditioning in vitro. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285:H1720–H1729.
- Ross R: 1993. The pathogenesis of atherosclerosis: A perspective for the 1990s. *Nature* 362:801–809.
- Ross R, Glomset JA: 1973. Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell: Proliferation of smooth muscle is a key event in the genesis of the lesions of atherosclerosis. *Science* 180:1332–1339.
- Schnitzer JE, Oh P, Jacobson BS, Dvorak AM: 1995. Caveolae from luminal plasma-malemma of rat lung endothelium: Microdomains enriched in caveolin, Ca²⁺-ATPase, and inositol triphosphate receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:1759–1763.
- Schwartz SM, DeBlois D, O'Brien ERM: 1995. The intima. Soil for atherosclerosis and restenosis. *Circ Res* 77:445–465.
- Schwartz SM, Virmani R, Rosenfeld ME: 2000. The good smooth muscle cells in atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep* 2:422–429.
- Schwencke C, Schmeisser A, Walter C, et al.: 2005. Decreased caveolin-1 in atheroma: Loss of antiproliferative control of vascular smooth muscle cells in atherosclerosis. *Cardiovasc Res* 68:128–135.
- Sedding DG, Seay U, Fink L, et al.: 2003. Mechanosensitive p27Kip1 regulation and cell cycle entry in vascular smooth muscle cells. *Circulation* 108:616–622.
- Sedding DG, Hermsen J, Seay U, et al.: 2005. Caveolin-1 facilitates mechanosensitive protein kinase B (Akt) signaling in vitro and in vivo. *Circ Res* 96:635–642.
- Sonveaux P, Martinive P, DeWever J, et al.: 2004. Caveolin-1 expression is critical for vascular endothelial growth factor-induced ischemic hindlimb collateralization and nitric oxide-mediated angiogenesis. *Circ Res* 95:154–161.
- Virchow R: 1856. Der atheromathöse Prozess der Arterien. *Wien Med Wochenschr* 6: 825–832.
- Von der Leyen HE, Gibbons GH, Morishita R, et al.: 1995. Gene therapy inhibiting neointimal vascular lesion: In vivo transfer of endothelial cell nitric oxide synthase gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:1137–1141.
- Wary KK, Mariotti A, Zurzolo C, Giancotti FG: 1998. A requirement for caveolin-1 and associated kinase Fyn in integrin signaling and anchorage-dependent cell growth. *Cell* 94:625–634.
- Williams TM, Hassan GS, Li J, et al.: 2005. Caveolin-1 promotes tumor progression in an autochthonous mouse model of prostate cancer: Genetic ablation of cav-1 delays advanced prostate tumor development in tramp mice. *J Biol Chem* 280:25134–25145.
- Xu Q, Liu Y, Gorospe M, et al.: 1996. Acute hypertension activates mitogen-activated protein kinases in arterial wall. *J Clin Invest* 97:508–514.
- Yamamoto M, Toya Y, Schwencke C, et al.: 1998. Caveolin is an activator of insulin receptor signaling. *J Biol Chem* 273:26962–26968.
- Yang G, Truong LD, Timme TL, et al.: 1998. Elevated expression of caveolin is associated with prostate and breast cancer. *Clin Cancer Res* 4:1873–1880.

PII S1050-1738(06)00221-5

TCM

Angiogenesis: The VE-Cadherin Switch

Yann Wallez, Isabelle Vilgrain, and Philippe Huber*

Because angiogenesis is a key step in a number of pathologic processes, including tumor growth and atherosclerosis, many research studies have investigated the regulatory signals active at various stages of vascular invasion. The differential activities of the endothelial junction protein vascular endothelial (VE)-cadherin reflect the versatile behavior of endothelial cells between vascular quiescence and angiogenesis. VE-cadherin function and signaling are deeply modified in proliferating cells, and this conversion is accompanied by phosphorylation of the protein on tyrosine residues and enhanced transcription of its gene. Recent advances in the complex interplay between protein tyrosine kinases and phosphatases regulating VE-cadherin phosphorylation and function are discussed in this review. (Trends Cardiovasc Med 2006;16:55–59) © 2006, Elsevier Inc.

During the past decade, the prominent role of the neovascularization process in tumor growth and metastasis has been clearly established. The vascular endothelium forms a selective barrier between the blood stream and the underlying tissues. In addition, the endothelium is at the origin of neovessel formation through the extension of the existing vasculature in a process called angiogenesis. From the biologic point of view, the endothelial cells may be considered as epithelial cells, connected by cell–cell

Yann Wallez, Isabelle Vilgrain, and Philippe Huber are at the Laboratoire de Développement et Vieillesse de l'Endothélium, Université Joseph Fourier, Grenoble, France; Inserm, EMI 02-19, Grenoble, France; and CEA, Grenoble, France.

* Address correspondence to: Philippe Huber, PhD, DRDC-DVE, CEA-Grenoble, 17 rue des Martyrs, 38054 Grenoble, France. Tel.: (+33) 438-78-41-18; fax: (+33) 438-78-49-64; e-mail: phuber@cea.fr.

© 2006, Elsevier Inc. All rights reserved. 1050-1738/06/\$-see front matter

junctions and attached to a basal lamina, when embedded in stable vessels, whereas it behaves like mesenchymal cells during the angiogenic process. In established vessels, transmembrane adhesive proteins located at the cell-cell junction maintain the integrity of the endothelial cell lining. The vascular endothelial (VE)-cadherin, originally called cadherin-5 (Suzuki et al. 1991), is the transmembrane component of the endothelial adherens junction and plays a pivotal role in endothelium integrity and in the control of vascular permeability (Breviario et al. 1995). In this review, we will focus on the differential functions of this endothelial-specific molecule in quiescent and angiogenic endothelial cells and we will describe recent advances in our knowledge of its regulation between these two states. The organization of the endothelial intercellular contacts and the molecular description of the different junctional complexes are described in excellent reviews (Aurrand-Lions et al. 2002, Vestweber 2002, Bazzoni and Dejana 2004) and will not be reported here.

• VE-Cadherin in Quiescent Vessels

Adherens Junction Organization

VE-cadherin belongs to the cadherin family (for a review, see Wheelock and Johnson 2003), whose members develop homophilic adhesive activity through their extracellular domains. Classic cadherins, such as VE-cadherin, are associated with actin via interaction of their C-terminal domain with β -catenin/ α -catenin or plakoglobin/ α -catenin complexes. In addition, association of VE-cadherin with vimentin through plakoglobin/desmoplakin has been reported (Wheelock and Johnson 2003). The linkage of VE-cadherin with the cytoskeleton, especially when plakoglobin is involved, leads to strong cell-cell interaction. Two other catenins, p120 and the p120-related protein p0071, bind to an identical juxtamembrane intracellular domain of VE-cadherin. p120 exerts various functions, including the regulation of cadherin levels by controlling cadherin internalization and degradation as well as cadherin clustering at the junction. p0071 interacts with desmoplakin, which may provide an additional link between VE-cadherin and vimentin. For

a review on p120/p0071 in endothelial cells, see Vincent et al. (2004).

Vascular Permeability

Besides its preponderant role in endothelial homotypic adhesion, the presence of VE-cadherin at cell junctions decreases paracellular permeability. Endothelial junctions are highly dynamic and vascular permeability is increased by inflammatory cytokines, including histamine, tumor necrosis factor α (reviewed in Bazzoni and Dejana 2004), and platelet-activating factor (Hudry-Clergeon et al. 2005). In addition, vascular endothelial growth factor (VEGF) (Esser et al. 1998), a cytokine promoting vascular proliferation in angiogenic situations, also induces an increase in vascular permeability and endothelial cell survival in quiescent vessels. The cellular responses to these effectors involve disruption of the VE-cadherin-based adherens junction.

Cell Cycle Arrest

It is commonly accepted that contact inhibition of cell proliferation is at least partially mediated by the establishment of cadherin-based junctions. Endothelial cell division is inhibited when cells are plated onto a substrate containing the VE-cadherin extracellular domain (Caveda et al. 1996), indicating that VE-cadherin engagement limits endothelial cell proliferation. Several signaling pathways have been identified to explain the VE-cadherin-dependent cell cycle arrest. First, β -catenin may translocate in some conditions to the nucleus where it activates genes, including *cyclin D1* and *myc*, which induce cell cycle entry (reviewed in Conacci-Sorrell et al. 2002). β -Catenin localization at the junction may thus prevent target gene transcription and cell division. Second, VE-cadherin associates with VEGF receptor 2 (R2) upon VEGF induction or angiogenic stimulation (Carmeliet et al. 1999, Lambeng et al. 2005). This association inhibits VEGF R2 phosphorylation, through the action of junctional phosphatases such as DEP-1, and its MAP kinase-dependent proliferative signal (Lampugnani et al. 2003). Third, VEGF induces VE-cadherin association with the adaptor molecule Shc, and this association increases Shc dephosphory-

lation, probably through the action of junctional phosphatases (Zanetti et al. 2002). As Shc is known to activate the MAP kinase pathway, its capture at the junction by VE-cadherin and its subsequent dephosphorylation may interfere with the VEGF proliferative signal. Fourth, C-terminal Src kinase (Csk) binds to VE-cadherin when phosphorylated on Tyr 685 (see below), and this binding might also be involved in the inhibition of cell growth (Baumeister et al. 2005).

Endothelial Cell Survival

VEGF transduces a survival signal to endothelial cells through a VE-cadherin-dependent mechanism. This signal is mediated by the PI3-kinase/Akt pathway and needs VEGF R2-VE-cadherin association (Carmeliet et al. 1999). The upregulation of *Gas1*, a growth-arrest-specific gene, as one of the possible targets of PI3-kinase signaling, correlates with the inhibition of endothelial cell apoptosis (Spagnuolo et al. 2004).

• VE-Cadherin Requirement and Function in Angiogenesis

The first evidences of VE-cadherin implication in angiogenesis derive from experiments using function-blocking antibodies in in vitro angiogenesis (Matsumura et al. 1997, Bach et al. 1998). In VE-cadherin-deficient embryos and yolk sacs, the vascularization process was arrested at a very primitive stage, with no sign of angiogenic sprouting (Gory-Fauré et al. 1999). For example, the yolk sac blood islands formed normally but did not undergo vascular branching until fetal death at midgestation, indicating that VE-cadherin is required for developmental angiogenesis. More recently, tumor angiogenesis could be blocked by antibodies against VE-cadherin, suggesting that VE-cadherin activity is necessary for vascular proliferation in adults (Corada et al. 2002, Liao et al. 2002). Although cadherins are known to limit cell detachment and migration, downregulation of VE-cadherin activity does not seem to favor a mesenchymal phenotype and VE-cadherin-deficient endothelial cells remained round and weakly mobile (Feraud et al. 2001). The fact that VE-cadherin may be directly involved in endothelial invasive activity is supported

by data showing that the VE-cadherin cytoplasmic tail induces cell membrane protrusions (Kouklis et al. 2003). Alternatively, the vascular defects observed in null mice may be caused by increased endothelial cell apoptosis as, in the absence of VE-cadherin, VEGF-induced survival is inoperative. However, two features argue against that (a) yolk sac blood islands do not show any sign of leakiness at any time and that (b) the percentage of endothelial cells is normal in VE-cadherin-deficient yolk sacs (Rampon and Huber 2003). One possible reason is that basic fibroblast growth factor (bFGF) antiapoptotic signaling is not altered by VE-cadherin deficiency and may be sufficient to sustain endothelial survival.

During the angiogenesis process, VE-cadherin disappears from the adherens junction and epitopes are unmasked (Corada et al. 2002, Liao et al. 2002). This is in agreement with the increase in vascular permeability constantly observed in angiogenesis. Other VE-cadherin activities have been reported in the context of vascular proliferation. In the course of migration, VE-cadherin may develop heterophilic adhesive reactions with fibrin, a mechanism potentially relevant in healing angiogenesis (for a review, see Martinez et al. 2001). VE-cadherin also seems implicated in lumen formation (Yang et al. 1999) and in cell proliferation through Rho-mediated tension in the actin cytoskeleton (Nelson and Chen 2003). VE-cadherin modulation of VEGF R2 signaling might be modified in angiogenic cells compared to resting cells, as VEGF R2 activation (phosphorylation) by VEGF is stronger in sparse than in confluent cells (Rahimi and Kazlauskas 1999).

• Tyrosine Phosphorylation of VE-Cadherin

Incubation of endothelial cells with VEGF dramatically increases VE-cadherin phosphorylation levels on tyrosine residues (Esser et al. 1998). We recently showed that VE-cadherin phosphorylation levels were significantly increased in ovaries and uterus subjected to hormonal induction, in correlation with the angiogenic switch observed in these tissues, while they were weak or undetectable in resting tissues (Lambeng et al. 2005). We found that another tyrosine kinase, Src,

was constantly associated with VE-cadherin, independent of angiogenic stimulation in vivo or VEGF induction in vitro.

VE-cadherin-associated Src phosphorylation was increased in angiogenic tissues or VEGF-induced endothelial cells. VE-

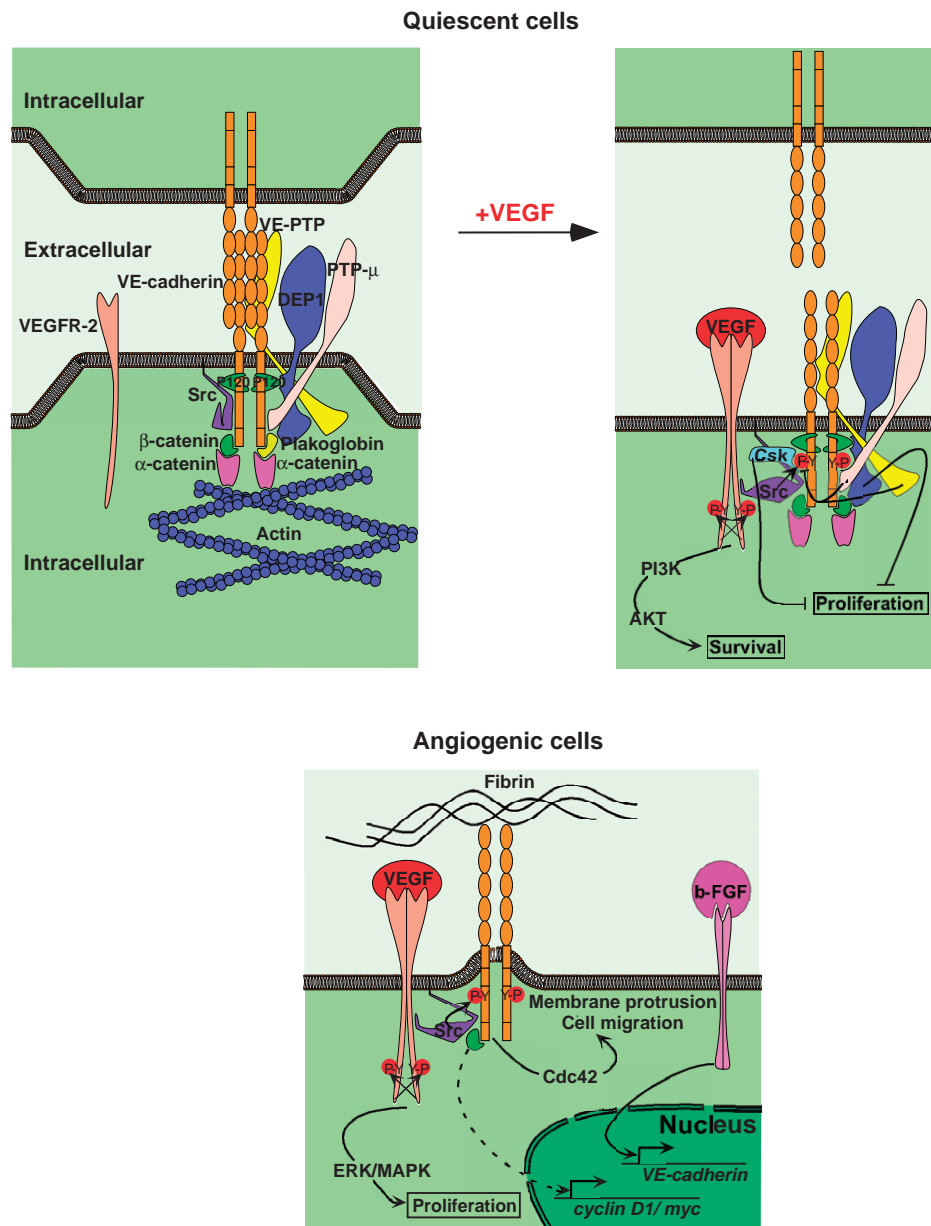


Figure 1. Model describing VE-cadherin differential activities in quiescent and angiogenic endothelial cells, in connection with VEGF signaling. In quiescent cells and in the absence of VEGF, VE-cadherin molecules are assembled in the adherens junction. Although Src is associated with the complex, VE-cadherin is maintained unphosphorylated by associated phosphatases, such as VE-PTP and PTP- μ . The identity of the targeted phosphotyrosines by either phosphatases is unknown. In the presence of VEGF, VEGF R2 associates with VE-cadherin and Src, and the adherens junction is disrupted. VEGF R2 and Src kinase activities lead to VE-cadherin phosphorylation on tyrosines, enabling Csk binding to phospho-VE-cadherin. Both Csk and DEP1 may inhibit VEGF-induced cell proliferation through independent pathways. In addition, VEGF R2/VE-cadherin association induces cell survival through PI3kinase/AKT signaling. In angiogenic cells, VEGF R2 also associates with the VE-cadherin/Src complex, leading to VE-cadherin phosphorylation. However, in the absence of protein tyrosine phosphatase activity, signaling is different: cell proliferation is stimulated by ERK/MAPK pathway activation, and membrane protrusions are induced through Cdc42 activation. β -Catenin may potentially translocate to the nucleus and subsequently activate cell cycle gene transcription. Independently, bFGF signaling presumably leads to enhanced VE-cadherin gene expression. In healing angiogenesis, VE-cadherin may develop heterophilic adhesion with fibrin.

cadherin phosphorylation through the VEGF/VEGFR2 pathway needs Src activity (Weis et al. 2004, Lambeng et al. 2005). Src is required for VEGF-induced angiogenesis and endothelial survival in the angiogenic process (Eliceiri et al. 1999). In addition, Src was shown to associate with VEGFR2 after VEGF induction (Chou et al. 2002). It can be deduced from these data that VEGF induction triggers VEGFR2 association with the VE-cadherin–Src complex. This association leads to Src phosphorylation, which in turn induces VE-cadherin phosphorylation. Furthermore, these results suggest that VE-cadherin phosphorylation is a necessary step for the endothelial switch from the quiescent to the angiogenic phenotype.

It is widely accepted that VE-cadherin phosphorylation triggers cell–cell disruption, possibly through modification of adherens junction composition. However, activation of Src in the VE-cadherin complex may also serve other purposes. Src may transduce a VEGF survival signal through activation of the PI3-kinase-AKT pathway. In addition, Src is known to regulate membrane ruffles and lamellipodia. Therefore, VE-cadherin-associated Src may also be directly involved in cell migration and vascular invasion.

Other Src family kinases, such as Fyn and Yes, are preferentially associated with VEGFR1 over VEGFR2 (Chou et al. 2002). There is no evidence that VEGFR1 is involved in VE-cadherin phosphorylation. However, activities of Src family members are partially redundant (Eliceiri et al. 1999), and one cannot exclude at present a role for Fyn and Yes in VE-cadherin tyrosine phosphorylation as well as VEGFR2 signal transduction in particular situations.

VE-cadherin contains nine tyrosines in its cytoplasmic domain. The Vestweber lab reported that Tyr685 could be phosphorylated, thereby promoting VE-cadherin-Csk association and eventually leading to contact inhibition of growth (Baumeister et al. 2005). Consistent with this, we identified Tyr685 as the unique phosphorylation target site in VEGF-induced endothelial cells (Wallez et al. unpublished results). Other tyrosines may be phosphorylated. The Chersesh lab showed that VE-cadherin phosphorylation on Tyr658 or Tyr731, but not on other tyrosines, was sufficient

to maintain cells in a mesenchymal state (Potter et al. 2005). More work is necessary to understand which tyrosine is targeted in which condition.

VE-cadherin phosphorylation in quiescent vessels is repressed by phosphatase activity (Lambeng et al. 2005). Several phosphatases are localized at endothelial junctions. Among them, protein tyrosine phosphatases VE-PTP and PTP-mu directly interact with VE-cadherin, and there is convincing evidence showing that the activities of either enzymes alter VE-cadherin phosphorylation state (Nawroth et al. 2002, Sui et al. 2005). In addition, Csk binding to phospho-VE-cadherin may inactivate Src by phosphorylation of the Src inhibitory site (Tyr527). This mechanism may represent a negative feedback regulation of VE-cadherin activation.

• Angiogenic Stimulation of VE-Cadherin Expression

VE-cadherin was initially considered as a constitutive protein with unregulated expression. However, this issue has to be reconsidered in view of several recent studies. The first description challenging the previous assumption was published by Parker et al. (2004). The authors showed that endothelial cells from human breast carcinoma contained elevated amounts of VE-cadherin mRNA compared to normal mammary vasculature. We recently reported that VE-cadherin levels in adrenal endothelial cells were dependent upon the experimental trophic variation of the gland (Huber et al. 2005). In this model, VE-cadherin promoter activity was down-regulated during gland regression and restored after its regeneration. Increased VE-cadherin promoter activity was also observed in mouse tumors and in Matrigel plugs impregnated with bFGF (Prandini et al. 2005), suggesting that this cytokine might be the angiogenic factor responsible for VE-cadherin transcription enhancement. VE-cadherin expression is under the control of Ets transcription factors (Gory et al. 1998). One of these factors, Ets1, is specifically expressed in angiogenic endothelial cells and is capable of transactivating the VE-cadherin promoter (Lelievre et al. 2000). Ets1 is thus a good candidate for VE-cadherin transcriptional activation in the angiogenesis process. Given that

VE-cadherin is involved in vascular morphogenesis and endothelial survival, the fact that its expression is upregulated during vascular proliferation further suggests that VE-cadherin may be a key player in this process.

• Conclusion and Future Directions

Whereas the pleiotropic functions of VE-cadherin in quiescent endothelium have been extensively studied, the role of VE-cadherin in angiogenesis remains poorly investigated. More specifically, its function in endothelial migration, possibly through membrane protrusion and actin remodeling, is elusive. The transition in VE-cadherin function from the quiescent to the angiogenic states is promoted by VE-cadherin tyrosine phosphorylation and is accompanied by promoter activation, leading to increased VE-cadherin content. We propose herein a model (Figure 1) in which the quiescent-to-angiogenic transition of endothelial cells requires a switch in VE-cadherin functions. The interplay between tyrosine kinases and phosphatases interacting with and regulating the VE-cadherin complex must be examined in detail to clarify the individual activity of each enzymatic partner.

References

- Aurrand-Lions M, Johnson-Leger C, Imhof BA: 2002. Role of interendothelial adhesion molecules in the control of vascular functions. *Vascul Pharmacol* 39:239–246.
- Bach TL, Barsigian C, Chalupowicz DG, et al.: 1998. VE-Cadherin mediates endothelial cell capillary tube formation in fibrin and collagen gels. *Exp Cell Res* 238:324–334.
- Baumeister U, Funke R, Ebnet K, et al.: 2005. Association of Csk to VE-cadherin and inhibition of cell proliferation. *EMBO J* 24:1686–1695.
- Bazzoni G, Dejana E: 2004. Endothelial cell-to-cell junctions: molecular organization and role in vascular homeostasis. *Physiol Rev* 84:869–901.
- Breviario F, Caveda L, Corada M, et al.: 1995. Functional properties of human vascular endothelial cadherin (7B4/cadherin-5), an endothelium-specific cadherin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15:1229–1239.
- Carmeliet P, Lampugnani MG, Moons L, et al.: 1999. Targeted deficiency or cytosolic truncation of the VE-cadherin gene in mice impairs VEGF-mediated endothelial survival and angiogenesis. *Cell* 98:147–157.

- Caveda L, Martin-Padura I, Navarro P, et al.: 1996. Inhibition of cultured cell growth by vascular endothelial cadherin (cadherin-5/VE-cadherin). *J Clin Invest* 98:886–893.
- Chou MT, Wang J, Fujita DJ: 2002. Src kinase becomes preferentially associated with the VEGFR, KDR/Flk-1, following VEGF stimulation of vascular endothelial cells. *BMC Biochem* 3:32.
- Conacci-Sorrell M, Zhurinsky J, Ben-Ze'ev A: 2002. The cadherin-catenin adhesion system in signaling and cancer. *J Clin Invest* 109:987–991.
- Corada M, Zanetta L, Orsenigo F, et al.: 2002. A monoclonal antibody to vascular endothelial-cadherin inhibits tumor angiogenesis without side effects on endothelial permeability. *Blood* 100:905–911.
- Eliceiri BP, Paul R, Schwartzberg PL, et al.: 1999. Selective requirement for Src kinases during VEGF-induced angiogenesis and vascular permeability. *Mol Cell* 4:915–924.
- Esser S, Lampugnani MG, Corada M, et al.: 1998. Vascular endothelial growth factor induces VE-cadherin tyrosine phosphorylation in endothelial cells. *J Cell Sci* 111:1853–1865.
- Feraud O, Cao Y, Vittet D: 2001. Embryonic stem cell-derived embryoid bodies development in collagen gels recapitulates sprouting angiogenesis. *Lab Invest* 81:1669–1681.
- Gory S, Dalmon J, Prandini MH, et al.: 1998. Requirement of a GT box (Sp1 site) and two Ets binding sites for vascular endothelial cadherin gene transcription. *J Biol Chem* 273:6750–6755.
- Gory-Fauré S, Prandini MH, Pointu H, et al.: 1999. Role of vascular endothelial-cadherin in vascular morphogenesis. *Development* 126:2093–2102.
- Huber P, Mallet C, Faure E, et al.: 2005. ACTH depletion represses vascular endothelial-cadherin transcription in mouse adrenal endothelium in vivo. *J Mol Endocrinol* 34:127–137.
- Hudry-Clergeon H, Stengel D, Ninio E, Vilgrain I: 2005. Platelet-activating factor increases VE-cadherin tyrosine phosphorylation in mouse endothelial cells and its association with the PtdIns3'-kinase. *FASEB J* 19:512–520.
- Kouklis P, Konstantoulaki M, Malik AB: 2003. VE-cadherin-induced Cdc42 signaling regulates formation of membrane protrusions in endothelial cells. *J Biol Chem* 278:16230–16236.
- Lambeng N, Wallez Y, Rampon C, et al.: 2005. Vascular endothelial-cadherin tyrosine phosphorylation in angiogenic and quiescent adult tissues. *Circ Res* 96:384–391.
- Lampugnani MG, Zanetti A, Corada M, et al.: 2003. Contact inhibition of VEGF-induced proliferation requires vascular endothelial cadherin, beta-catenin, and the phosphatase DEP-1/CD148. *J Cell Biol* 161:793–804.
- Lelievre E, Mattot V, Huber P, et al.: 2000. ETS1 lowers capillary endothelial cell density at confluence and induces the expression of VE-cadherin. *Oncogene* 19:2438–2446.
- Liao F, Doody JF, Overholser J, et al.: 2002. Selective targeting of angiogenic tumor vasculature by vascular endothelial-cadherin antibody inhibits tumor growth without affecting vascular permeability. *Cancer Res* 62:2567–2575.
- Martinez J, Ferber A, Bach TL, Yaen CH: 2001. Interaction of fibrin with VE-cadherin. *Ann N Y Acad Sci* 936:386–405.
- Matsumura T, Wolff K, Petzelbauer P: 1997. Endothelial cell tube formation depends on cadherin 5 and CD31 interactions with filamentous actin. *J Immunol* 158:3408–3416.
- Nawroth R, Poell G, Ranft A, et al.: 2002. VE-PTP and VE-cadherin ectodomains interact to facilitate regulation of phosphorylation and cell contacts. *EMBO J* 21:4885–4895.
- Nelson CM, Chen CS: 2003. VE-cadherin simultaneously stimulates and inhibits cell proliferation by altering cytoskeletal structure and tension. *J Cell Sci* 116:3571–3581.
- Parker BS, Argani P, Cook BP, et al.: 2004. Alterations in vascular gene expression in invasive breast carcinoma. *Cancer Res* 64:7857–7866.
- Potter MD, Barbero S, Cheresh DA: 2005. Tyrosine phosphorylation of VE-cadherin prevents binding of p120- and [beta]-catenin and maintains the cellular mesenchymal state. *J Biol Chem* 280:31906–31912.
- Prandini MH, Dreher I, Bouillot S, et al.: 2005. The human VE-cadherin promoter is subjected to organ-specific regulation and is activated in tumour angiogenesis. *Oncogene* 24:2992–3001.
- Rahimi N, Kazlauskas A: 1999. A role for cadherin-5 in regulation of vascular endothelial growth factor receptor 2 activity in endothelial cells. *Mol Biol Cell* 10:3401–3407.
- Rampon C, Huber P: 2003. Multilineage hematopoietic progenitor activity generated autonomously in the mouse yolk sac: analysis using angiogenesis-defective embryos. *Int J Dev Biol* 47:273–280.
- Spagnuolo R, Corada M, Orsenigo F, et al.: 2004. Gas1 is induced by VE-cadherin and vascular endothelial growth factor and inhibits endothelial cell apoptosis. *Blood* 103:3005–3012.
- Sui XF, Kiser TD, Hyun SW, et al.: 2005. Receptor protein tyrosine phosphatase micro regulates the paracellular pathway in human lung microvascular endothelia. *Am J Pathol* 166:1247–1258.
- Suzuki S, Sano K, Tanihara H: 1991. Diversity of the cadherin family: evidence for eight new cadherins in nervous tissue. *Cell Regul* 2:261–270.
- Vestweber D: 2002. Regulation of endothelial cell contacts during leukocyte extravasation. *Curr Opin Cell Biol* 14:587–593.
- Vincent PA, Xiao K, Buckley KM, Kowalczyk AP: 2004. VE-cadherin: adhesion at arm's length. *Am J Physiol Cell Physiol* 286:C987–C997.
- Weis S, Cui J, Barnes L, Cheresh D: 2004. Endothelial barrier disruption by VEGF-mediated Src activity potentiates tumor cell extravasation and metastasis. *J Cell Biol* 167:223–229.
- Wheelock MJ, Johnson KR: 2003. Cadherins as modulators of cellular phenotype. *Annu Rev Cell Dev Biol* 19:207–235.
- Yang S, Graham J, Kahn JW, et al.: 1999. Functional roles for PECAM-1 (CD31) and VE-cadherin (CD144) in tube assembly and lumen formation in three-dimensional collagen gels. *Am J Pathol* 155:887–895.
- Zanetti A, Lampugnani MG, Balconi G, et al.: 2002. Vascular endothelial growth factor induces SHC association with vascular endothelial cadherin: a potential feedback mechanism to control vascular endothelial growth factor receptor-2 signaling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22:617–622.

PII S1050-1738(06)00222-7

TCM

Bibliographie

- Abu-Ghazaleh, R., J. Kabir, H. Jia, M. Lobo and I. Zachary (2001). "Src mediates stimulation by vascular endothelial growth factor of the phosphorylation of focal adhesion kinase at tyrosine 861, and migration and anti-apoptosis in endothelial cells." Biochem J **360**(Pt 1): 255-64.
- Aird, W.C. (2006). "Mechanisms of endothelial cell heterogeneity in health and disease." Circ Res **98**(2): 159-62.
- Alitalo, K., T. Tammela and T.V. Petrova (2005). "Lymphangiogenesis in development and human disease." Nature **438**(7070): 946-53.
- Alon, T., I. Hemo, A. Itin, J. Pe'er, J. Stone and E. Keshet (1995). "Vascular endothelial growth factor acts as a survival factor for newly formed retinal vessels and has implications for retinopathy of prematurity." Nat Med **1**(10): 1024-8.
- Alper, O. and E.T. Bowden (2005). "Novel insights into c-Src." Curr Pharm Des **11**(9): 1119-30.
- Anastasiadis, P.Z. and A.B. Reynolds (2000). "The p120 catenin family: complex roles in adhesion, signaling and cancer." J Cell Sci **113** (Pt 8): 1319-34.
- Andriopoulou, P., P. Navarro, A. Zanetti, M.G. Lampugnani and E. Dejana (1999). "Histamine induces tyrosine phosphorylation of endothelial cell-to-cell adherens junctions." Arterioscler Thromb Vasc Biol **19**(10): 2286-97.
- Angst, B.D., C. Marozzi and A.I. Magee (2001). "The cadherin superfamily." J Cell Sci **114**(Pt 4): 625-6.
- Asahara, T., H. Masuda, T. Takahashi, C. Kalka, C. Pastore, M. Silver, M. Kearne, M. Magner, *et al.* (1999). "Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization." Circ Res **85**(3): 221-8.
- Asahara, T., T. Murohara, A. Sullivan, M. Silver, R. van der Zee, T. Li, B. Witzenbichler, G. Schatteman, *et al.* (1997). "Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis." Science **275**(5302): 964-7.
- Asahara, T., T. Takahashi, H. Masuda, C. Kalka, D. Chen, H. Iwaguro, Y. Inai, M. Silver, *et al.* (1999). "VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells." Embo J **18**(14): 3964-72.
- Bachelder, R.E., A. Crago, J. Chung, M.A. Wendt, L.M. Shaw, G. Robinson and A.M. Mercurio (2001). "Vascular endothelial growth factor is an autocrine survival factor for neuropilin-expressing breast carcinoma cells." Cancer Res **61**(15): 5736-40.
- Bachelder, R.E., E.A. Lipscomb, X. Lin, M.A. Wendt, N.H. Chadborn, B.J. Eickholt and A.M. Mercurio (2003). "Competing autocrine pathways involving alternative neuropilin-1 ligands regulate chemotaxis of carcinoma cells." Cancer Res **63**(17): 5230-3.
- Barleon, B., S. Sozzani, D. Zhou, H.A. Weich, A. Mantovani and D. Marme (1996). "Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor flt-1." Blood **87**(8): 3336-43.
- Bates, D.O. and S.J. Harper (2002). "Regulation of vascular permeability by vascular endothelial growth factors." Vascul Pharmacol **39**(4-5): 225-37.
- Bates, R.C., J.D. Goldsmith, R.E. Bachelder, C. Brown, M. Shibuya, P. Oettgen and A.M. Mercurio (2003). "Flt-1-dependent survival characterizes the epithelial-mesenchymal transition of colonic organoids." Curr Biol **13**(19): 1721-7.
- Baumeister, U., R. Funke, K. Ebnet, H. Vorschmitt, S. Koch and D. Vestweber (2005). "Association of Csk to VE-cadherin and inhibition of cell proliferation." Embo J **24**(9): 1686-95.

- Baumer, S., L. Keller, A. Holtmann, R. Funke, B. August, A. Gamp, H. Wolburg, K. Wolburg-Buchholz, *et al.* (2006). "Vascular endothelial cell-specific phosphotyrosine phosphatase (VE-PTP) activity is required for blood vessel development." Blood **107**(12): 4754-62.
- Beavon, I.R. (2000). "The E-cadherin-catenin complex in tumour metastasis: structure, function and regulation." Eur J Cancer **36**(13 Spec No): 1607-20.
- Behrens, J., L. Vakaet, R. Friis, E. Winterhager, F. Van Roy, M.M. Mareel and W. Birchmeier (1993). "Loss of epithelial differentiation and gain of invasiveness correlates with tyrosine phosphorylation of the E-cadherin/beta-catenin complex in cells transformed with a temperature-sensitive v-SRC gene." J Cell Biol **120**(3): 757-66.
- Bergers, G. and L.E. Benjamin (2003). "Tumorigenesis and the angiogenic switch." Nat Rev Cancer **3**(6): 401-10.
- Bernatchez, P.N., S. Soker and M.G. Sirois (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): 31047-54.
- Berx, G. and F. Van Roy (2001). "The E-cadherin/catenin complex: an important gatekeeper in breast cancer tumorigenesis and malignant progression." Breast Cancer Res **3**(5): 289-93.
- Bianchi, C., F.W. Sellke, R.L. Del Vecchio, N.K. Tonks and B.G. Neel (1999). "Receptor-type protein-tyrosine phosphatase mu is expressed in specific vascular endothelial beds in vivo." Exp Cell Res **248**(1): 329-38.
- Blankesteyn, W.M., M.E. van Gijn, Y.P. Essers-Janssen, M.J. Daemen and J.F. Smits (2000). "Beta-catenin, an inducer of uncontrolled cell proliferation and migration in malignancies, is localized in the cytoplasm of vascular endothelium during neovascularization after myocardial infarction." Am J Pathol **157**(3): 877-83.
- Blaschuk, O.W., R. Sullivan, S. David and Y. Pouliot (1990). "Identification of a cadherin cell adhesion recognition sequence." Dev Biol **139**(1): 227-9.
- Bolat, F., F. Kayaselcuk, T.Z. Nursal, M.C. Yagmurdur, N. Bal and B. Demirhan (2006). "Microvessel density, VEGF expression, and tumor-associated macrophages in breast tumors: correlations with prognostic parameters." J Exp Clin Cancer Res **25**(3): 365-72.
- Bracke, M.E., F.M. Van Roy and M.M. Mareel (1996). "The E-cadherin/catenin complex in invasion and metastasis." Curr Top Microbiol Immunol **213** (Pt 1): 123-61.
- Brady-Kalnay, S.M., T. Mourton, J.P. Nixon, G.E. Pietz, M. Kinch, H. Chen, R. Brackenbury, D.L. Rimm, *et al.* (1998). "Dynamic interaction of PTPmu with multiple cadherins in vivo." J Cell Biol **141**(1): 287-96.
- Brady-Kalnay, S.M., D.L. Rimm and N.K. Tonks (1995). "Receptor protein tyrosine phosphatase PTPmu associates with cadherins and catenins in vivo." J Cell Biol **130**(4): 977-86.
- Brain, J.D., R.M. Molina, M.M. DeCamp and A.E. Warner (1999). "Pulmonary intravascular macrophages: their contribution to the mononuclear phagocyte system in 13 species." Am J Physiol **276**(1 Pt 1): L146-54.
- Bremnes, R.M., R. Veve, F.R. Hirsch and W.A. Franklin (2002). "The E-cadherin cell-cell adhesion complex and lung cancer invasion, metastasis, and prognosis." Lung Cancer **36**(2): 115-24.
- Breviario, F., L. Caveda, M. Corada, I. Martin-Padura, P. Navarro, J. Golay, M. Introna, D. Gulino, *et al.* (1995). "Functional properties of human vascular endothelial cadherin (7B4/cadherin-5), an endothelium-specific cadherin." Arterioscler Thromb Vasc Biol **15**(8): 1229-39.

- Broman, M.T., P. Kouklis, X. Gao, R. Ramchandran, R.F. Neamu, R.D. Minshall and A.B. Malik (2006). "Cdc42 regulates adherens junction stability and endothelial permeability by inducing alpha-catenin interaction with the vascular endothelial cadherin complex." *Circ Res* **98**(1): 73-80.
- Bull, H.A., P.M. Brickell and P.M. Dowd (1994). "Src-related protein tyrosine kinases are physically associated with the surface antigen CD36 in human dermal microvascular endothelial cells." *FEBS Lett* **351**(1): 41-4.
- Burnstock, G., B. Gannon and T. Iwayama (1970). "Sympathetic innervation of vascular smooth muscle in normal and hypertensive animals." *Circ Res* **27**: Suppl 2:5-23.
- Burri, P.H., R. Hlushchuk and V. Djonov (2004). "Intussusceptive angiogenesis: its emergence, its characteristics, and its significance." *Dev Dyn* **231**(3): 474-88.
- Cai, J., W.G. Jiang and R.E. Mansel (1999). "Phosphorylation and disorganization of vascular-endothelial cadherin in interaction between breast cancer and vascular endothelial cells." *Int J Mol Med* **4**(2): 191-5.
- Calkins, C.C., B.L. Hoepner, C.M. Law, M.R. Novak, S.V. Setzer, M. Hatzfeld and A.P. Kowalczyk (2003). "The Armadillo family protein p0071 is a VE-cadherin- and desmoplakin-binding protein." *J Biol Chem* **278**(3): 1774-83.
- Carmeliet, P. (2005). "VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer." *Oncology* **69** Suppl 3: 4-10.
- Carmeliet, P., V. Ferreira, G. Breier, S. Pollefeyt, L. Kieckens, M. Gertsenstein, M. Fahrig, A. Vandenhoek, *et al.* (1996). "Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele." *Nature* **380**(6573): 435-9.
- Carmeliet, P. and R.K. Jain (2000). "Angiogenesis in cancer and other diseases." *Nature* **407**(6801): 249-57.
- Carmeliet, P., M.G. Lampugnani, L. Moons, F. Breviario, V. Compernelle, F. Bono, G. Balconi, R. Spagnuolo, *et al.* (1999). "Targeted deficiency or cytosolic truncation of the VE-cadherin gene in mice impairs VEGF-mediated endothelial survival and angiogenesis." *Cell* **98**(2): 147-57.
- Cattelino, A., S. Liebner, R. Gallini, A. Zanetti, G. Balconi, A. Corsi, P. Bianco, H. Wolburg, *et al.* (2003). "The conditional inactivation of the beta-catenin gene in endothelial cells causes a defective vascular pattern and increased vascular fragility." *J Cell Biol* **162**(6): 1111-22.
- Cavallaro, U. and G. Christofori (2001). "Cell adhesion in tumor invasion and metastasis: loss of the glue is not enough." *Biochim Biophys Acta* **1552**(1): 39-45.
- Cavallaro, U. and G. Christofori (2004). "Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer." *Nat Rev Cancer* **4**(2): 118-32.
- Caveda, L., I. Martin-Padura, P. Navarro, F. Breviario, M. Corada, D. Gulino, M.G. Lampugnani and E. Dejana (1996). "Inhibition of cultured cell growth by vascular endothelial cadherin (cadherin-5/VE-cadherin)." *J Clin Invest* **98**(4): 886-93.
- Chang, Y.S., E. di Tomaso, D.M. McDonald, R. Jones, R.K. Jain and L.L. Munn (2000). "Mosaic blood vessels in tumors: frequency of cancer cells in contact with flowing blood." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(26): 14608-13.
- Cherqui, S., S.M. Kurian, O. Schussler, J.A. Hewel, J.R. Yates, 3rd and D.R. Salomon (2006). "Isolation and angiogenesis by endothelial progenitors in the fetal liver." *Stem Cells* **24**(1): 44-54.
- Chou, M.T., J. Wang and D.J. Fujita (2002). "Src kinase becomes preferentially associated with the VEGFR, KDR/Flk-1, following VEGF stimulation of vascular endothelial cells." *BMC Biochem* **3**: 32.
- Claffey, K.P., L.F. Brown, L.F. del Aguila, K. Tognazzi, K.T. Yeo, E.J. Manseau and H.F. Dvorak (1996). "Expression of vascular permeability factor/vascular endothelial

- growth factor by melanoma cells increases tumor growth, angiogenesis, and experimental metastasis." Cancer Res **56**(1): 172-81.
- Cogle, C.R. and E.W. Scott (2004). "The hemangioblast: cradle to clinic." Exp Hematol **32**(10): 885-90.
- Cohen, P. (2002). "The origins of protein phosphorylation." Nat Cell Biol **4**(5): E127-30.
- Cohen, T., H. Gitay-Goren, R. Sharon, M. Shibuya, R. Halaban, B.Z. Levi and G. Neufeld (1995). "VEGF121, a vascular endothelial growth factor (VEGF) isoform lacking heparin binding ability, requires cell-surface heparan sulfates for efficient binding to the VEGF receptors of human melanoma cells." J Biol Chem **270**(19): 11322-6.
- Conacci-Sorrell, M., J. Zhurinsky and A. Ben-Ze'ev (2002). "The cadherin-catenin adhesion system in signaling and cancer." J Clin Invest **109**(8): 987-91.
- Conn, G., D.D. Soderman, M.T. Schaeffer, M. Wile, V.B. Hatcher and K.A. Thomas (1990). "Purification of a glycoprotein vascular endothelial cell mitogen from a rat glioma-derived cell line." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(4): 1323-7.
- Corada, M., L. Zanetta, F. Orsenigo, F. Breviario, M.G. Lampugnani, S. Bernasconi, F. Liao, D.J. Hicklin, *et al.* (2002). "A monoclonal antibody to vascular endothelial-cadherin inhibits tumor angiogenesis without side effects on endothelial permeability." Blood **100**(3): 905-11.
- Coultas, L., K. Chawengsaksophak and J. Rossant (2005). "Endothelial cells and VEGF in vascular development." Nature **438**(7070): 937-45.
- Crosby, C.V., P.A. Fleming, W.S. Argraves, M. Corada, L. Zanetta, E. Dejana and C.J. Drake (2005). "VE-cadherin is not required for the formation of nascent blood vessels but acts to prevent their disassembly." Blood **105**(7): 2771-6.
- Cross, M.J., J. Dixelius, T. Matsumoto and L. Claesson-Welsh (2003). "VEGF-receptor signal transduction." Trends Biochem Sci **28**(9): 488-94.
- Cuneo, K.C., L. Geng, J. Tan, J. Brousal, E.T. Shinohara, K. Osusky, A. Fu, Y. Shyr, *et al.* (2006). "SRC family kinase inhibitor SU6656 enhances antiangiogenic effect of irradiation." Int J Radiat Oncol Biol Phys **64**(4): 1197-203.
- Dayanir, V., R.D. Meyer, K. Lashkari and N. Rahimi (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): 17686-92.
- de Jong, J.S., P.J. van Diest, P. van der Valk and J.P. Baak (1998). "Expression of growth factors, growth-inhibiting factors, and their receptors in invasive breast cancer. II: Correlations with proliferation and angiogenesis." J Pathol **184**(1): 53-7.
- Dejana, E. (2004). "Endothelial cell-cell junctions: happy together." Nat Rev Mol Cell Biol **5**(4): 261-70.
- Dejana, E., G. Bazzoni and M.G. Lampugnani (1999). "Vascular endothelial (VE)-cadherin: only an intercellular glue?" Exp Cell Res **252**(1): 13-9.
- Dejana, E., M. Corada and M.G. Lampugnani (1995). "Endothelial cell-to-cell junctions." Faseb J **9**(10): 910-8.
- Del Maschio, A., A. Zanetti, M. Corada, Y. Rival, L. Ruco, M.G. Lampugnani and E. Dejana (1996). "Polymorphonuclear leukocyte adhesion triggers the disorganization of endothelial cell-to-cell adherens junctions." J Cell Biol **135**(2): 497-510.
- Dias, S., K. Hattori, Z. Zhu, B. Heissig, M. Choy, W. Lane, Y. Wu, A. Chadburn, *et al.* (2000). "Autocrine stimulation of VEGFR-2 activates human leukemic cell growth and migration." J Clin Invest **106**(4): 511-21.
- Dor, Y., V. Djonov, R. Abramovitch, A. Itin, G.I. Fishman, P. Carmeliet, G. Goelman and E. Keshet (2002). "Conditional switching of VEGF provides new insights into adult neovascularization and pro-angiogenic therapy." Embo J **21**(8): 1939-47.

- Drake, C.J. and P.A. Fleming (2000). "Vasculogenesis in the day 6.5 to 9.5 mouse embryo." Blood **95**(5): 1671-9.
- Duan, L.J., A. Imamoto and G.H. Fong (2004). "Dual roles of the C-terminal Src kinase (Csk) during developmental vascularization." Blood **103**(4): 1370-2.
- Dumont, D.J., L. Jussila, J. Taipale, A. Lymboussaki, T. Mustonen, K. Pajusola, M. Breitman and K. Alitalo (1998). "Cardiovascular failure in mouse embryos deficient in VEGF receptor-3." Science **282**(5390): 946-9.
- Dvorak, A.M. and D. Feng (2001). "The vesiculo-vacuolar organelle (VVO). A new endothelial cell permeability organelle." J Histochem Cytochem **49**(4): 419-32.
- Eberhart, C.G. and P. Argani (2001). "Wnt signaling in human development: beta-catenin nuclear translocation in fetal lung, kidney, placenta, capillaries, adrenal, and cartilage." Pediatr Dev Pathol **4**(4): 351-7.
- Eberhart, C.G., T. Tihan and P.C. Burger (2000). "Nuclear localization and mutation of beta-catenin in medulloblastomas." J Neuropathol Exp Neurol **59**(4): 333-7.
- Eliceiri, B.P. and D.A. Cheresh (1999). "The role of alphav integrins during angiogenesis: insights into potential mechanisms of action and clinical development." J Clin Invest **103**(9): 1227-30.
- Eliceiri, B.P., R. Paul, P.L. Schwartzberg, J.D. Hood, J. Leng and D.A. Cheresh (1999). "Selective requirement for Src kinases during VEGF-induced angiogenesis and vascular permeability." Mol Cell **4**(6): 915-24.
- Esser, S., M.G. Lampugnani, M. Corada, E. Dejana and W. Risau (1998). "Vascular endothelial growth factor induces VE-cadherin tyrosine phosphorylation in endothelial cells." J Cell Sci **111** (Pt 13): 1853-65.
- Esser, S., K. Wolburg, H. Wolburg, G. Breier, T. Kurzchalia and W. Risau (1998). "Vascular endothelial growth factor induces endothelial fenestrations in vitro." J Cell Biol **140**(4): 947-59.
- Fachinger, G., U. Deutsch and W. Risau (1999). "Functional interaction of vascular endothelial-protein-tyrosine phosphatase with the angiopoietin receptor Tie-2." Oncogene **18**(43): 5948-53.
- Farmer, P.J., S.G. Bernier, A. Lepage, G. Guillemette, D. Regoli and P. Sirois (2001). "Permeability of endothelial monolayers to albumin is increased by bradykinin and inhibited by prostaglandins." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **280**(4): L732-8.
- Ferrara, N. (2004). "Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress." Endocr Rev **25**(4): 581-611.
- Ferrara, N., K. Carver-Moore, H. Chen, M. Dowd, L. Lu, K.S. O'Shea, L. Powell-Braxton, K.J. Hillan, *et al.* (1996). "Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene." Nature **380**(6573): 439-42.
- Ferrara, N., H. Chen, T. Davis-Smyth, H.P. Gerber, T.N. Nguyen, D. Peers, V. Chisholm, K.J. Hillan, *et al.* (1998). "Vascular endothelial growth factor is essential for corpus luteum angiogenesis." Nat Med **4**(3): 336-40.
- Ferrara, N. and T. Davis-Smyth (1997). "The biology of vascular endothelial growth factor." Endocr Rev **18**(1): 4-25.
- Ferrara, N. and W.J. Henzel (1989). "Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells." Biochem Biophys Res Commun **161**(2): 851-8.
- Folkman, J. (1975). "Tumor angiogenesis: a possible control point in tumor growth." Ann Intern Med **82**(1): 96-100.
- Folkman, J. (1992). "The role of angiogenesis in tumor growth." Semin Cancer Biol **3**(2): 65-71.
- Folkman, J. and M. Klagsbrun (1987). "Angiogenic factors." Science **235**(4787): 442-7.

- Folkman, J. and Y. Shing (1992). "Angiogenesis." *J Biol Chem* **267**(16): 10931-4.
- Frame, M.C. (2002). "Src in cancer: deregulation and consequences for cell behaviour." *Biochim Biophys Acta* **1602**(2): 114-30.
- Fraser, H.M., S.E. Dickson, S.F. Lunn, C. Wulff, K.D. Morris, V.A. Carroll and R. Bicknell (2000). "Suppression of luteal angiogenesis in the primate after neutralization of vascular endothelial growth factor." *Endocrinology* **141**(3): 995-1000.
- Fujita, Y., G. Krause, M. Scheffner, D. Zechner, H.E. Leddy, J. Behrens, T. Sommer and W. Birchmeier (2002). "Hakai, a c-Cbl-like protein, ubiquitinates and induces endocytosis of the E-cadherin complex." *Nat Cell Biol* **4**(3): 222-31.
- Fukata, M. and K. Kaibuchi (2001). "Rho-family GTPases in cadherin-mediated cell-cell adhesion." *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**(12): 887-97.
- Fukuhara, S., A. Sakurai, H. Sano, A. Yamagishi, S. Somekawa, N. Takakura, Y. Saito, K. Kangawa, *et al.* (2005). "Cyclic AMP potentiates vascular endothelial cadherin-mediated cell-cell contact to enhance endothelial barrier function through an Epac-Rap1 signaling pathway." *Mol Cell Biol* **25**(1): 136-46.
- Fukuhara, S., A. Sakurai, A. Yamagishi, K. Sako and N. Mochizuki (2006). "Vascular endothelial cadherin-mediated cell-cell adhesion regulated by a small GTPase, Rap1." *J Biochem Mol Biol* **39**(2): 132-9.
- Fukumura, D., T. Gohongi, A. Kadambi, Y. Izumi, J. Ang, C.O. Yun, D.G. Buerk, P.L. Huang, *et al.* (2001). "Predominant role of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis and vascular permeability." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(5): 2604-9.
- Fukumura, D., R. Xavier, T. Sugiura, Y. Chen, E.C. Park, N. Lu, M. Selig, G. Nielsen, *et al.* (1998). "Tumor induction of VEGF promoter activity in stromal cells." *Cell* **94**(6): 715-25.
- Fukumura, D., F. Yuan, M. Endo and R.K. Jain (1997). "Role of nitric oxide in tumor microcirculation. Blood flow, vascular permeability, and leukocyte-endothelial interactions." *Am J Pathol* **150**(2): 713-25.
- Gaits, F., R.Y. Li, A. Ragab, J.M. Ragab-Thomas and H. Chap (1995). "Increase in receptor-like protein tyrosine phosphatase activity and expression level on density-dependent growth arrest of endothelial cells." *Biochem J* **311** (Pt 1): 97-103.
- Gallicano, G.I., C. Bauer and E. Fuchs (2001). "Rescuing desmoplakin function in extra-embryonic ectoderm reveals the importance of this protein in embryonic heart, neuroepithelium, skin and vasculature." *Development* **128**(6): 929-41.
- Gasparini, G. (2000). "Prognostic value of vascular endothelial growth factor in breast cancer." *Oncologist* **5 Suppl 1**: 37-44.
- Gasparini, G., M. Toi, M. Gion, P. Verderio, R. Dittadi, M. Hanatani, I. Matsubara, O. Vinante, *et al.* (1997). "Prognostic significance of vascular endothelial growth factor protein in node-negative breast carcinoma." *J Natl Cancer Inst* **89**(2): 139-47.
- Gavard, J. and J.S. Gutkind (2006). "VEGF controls endothelial-cell permeability by promoting the beta-arrestin-dependent endocytosis of VE-cadherin." *Nat Cell Biol* **8**(11): 1223-34.
- Gehling, U.M., S. Ergun, U. Schumacher, C. Wagener, K. Pantel, M. Otte, G. Schuch, P. Schafhausen, *et al.* (2000). "In vitro differentiation of endothelial cells from AC133-positive progenitor cells." *Blood* **95**(10): 3106-12.
- Gerber, H.P., V. Dixit and N. Ferrara (1998). "Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells." *J Biol Chem* **273**(21): 13313-6.
- Gerber, H.P., A. McMurtry, J. Kowalski, M. Yan, B.A. Keyt, V. Dixit and N. Ferrara (1998). "Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the

- phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation." *J Biol Chem* **273**(46): 30336-43.
- Gille, H., J. Kowalski, B. Li, J. LeCouter, B. Moffat, T.F. Zioncheck, N. Pelletier and N. Ferrara (2001). "Analysis of biological effects and signaling properties of Flt-1 (VEGFR-1) and KDR (VEGFR-2). A reassessment using novel receptor-specific vascular endothelial growth factor mutants." *J Biol Chem* **276**(5): 3222-30.
- Gory-Faure, S., M.H. Prandini, H. Pointu, V. Roullot, I. Pignot-Paintrand, M. Vernet and P. Huber (1999). "Role of vascular endothelial-cadherin in vascular morphogenesis." *Development* **126**(10): 2093-102.
- Gotsch, U., E. Borges, R. Bosse, E. Boggemeyer, M. Simon, H. Mossmann and D. Vestweber (1997). "VE-cadherin antibody accelerates neutrophil recruitment in vivo." *J Cell Sci* **110 (Pt 5)**: 583-8.
- Grazia Lampugnani, M., A. Zanetti, M. Corada, T. Takahashi, G. Balconi, F. Breviario, F. Orsenigo, A. Cattelino, *et al.* (2003). "Contact inhibition of VEGF-induced proliferation requires vascular endothelial cadherin, beta-catenin, and the phosphatase DEP-1/CD148." *J Cell Biol* **161**(4): 793-804.
- Greenblatt, M. and P. Shubi (1968). "Tumor angiogenesis: transfilter diffusion studies in the hamster by the transparent chamber technique." *J Natl Cancer Inst* **41**(1): 111-24.
- Grosskreutz, C.L., B. Anand-Apte, C. Duplaa, T.P. Quinn, B.I. Terman, B. Zetter and P.A. D'Amore (1999). "Vascular endothelial growth factor-induced migration of vascular smooth muscle cells in vitro." *Microvasc Res* **58**(2): 128-36.
- Guerrin, M., H. Moukadiri, P. Chollet, F. Moro, K. Dutt, F. Malecaze and J. Plouet (1995). "Vasculotropin/vascular endothelial growth factor is an autocrine growth factor for human retinal pigment epithelial cells cultured in vitro." *J Cell Physiol* **164**(2): 385-94.
- Gulino, D., E. Delachanal, E. Concord, Y. Genoux, B. Morand, M.O. Valiron, E. Sulpice, R. Scaife, *et al.* (1998). "Alteration of endothelial cell monolayer integrity triggers resynthesis of vascular endothelium cadherin." *J Biol Chem* **273**(45): 29786-93.
- Gumbiner, B.M. (2005). "Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis." *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**(8): 622-34.
- Hamaguchi, M., N. Matsuyoshi, Y. Ohnishi, B. Gotoh, M. Takeichi and Y. Nagai (1993). "p60v-src causes tyrosine phosphorylation and inactivation of the N-cadherin-catenin cell adhesion system." *Embo J* **12**(1): 307-14.
- Harmey, J.H. and D. Bouchier-Hayes (2002). "Vascular endothelial growth factor (VEGF), a survival factor for tumour cells: implications for anti-angiogenic therapy." *Bioessays* **24**(3): 280-3.
- Hattori, K., S. Dias, B. Heissig, N.R. Hackett, D. Lyden, M. Tateno, D.J. Hicklin, Z. Zhu, *et al.* (2001). "Vascular endothelial growth factor and angiopoietin-1 stimulate postnatal hematopoiesis by recruitment of vasculogenic and hematopoietic stem cells." *J Exp Med* **193**(9): 1005-14.
- Hendrix, M.J., E.A. Seftor, A.R. Hess and R.E. Seftor (2003). "Vasculogenic mimicry and tumour-cell plasticity: lessons from melanoma." *Nat Rev Cancer* **3**(6): 411-21.
- Hewat, E.A., C. Durmort, L. Jacquamet, E. Concord and D. Gulino-Debrac (2006). "Architecture of the VE-cadherin Hexamer." *J Mol Biol.*
- Hiratsuka, S., K. Nakamura, S. Iwai, M. Murakami, T. Itoh, H. Kijima, J.M. Shipley, R.M. Senior, *et al.* (2002). "MMP9 induction by vascular endothelial growth factor receptor-1 is involved in lung-specific metastasis." *Cancer Cell* **2**(4): 289-300.
- Hlatky, L., P. Hahnfeldt and J. Folkman (2002). "Clinical application of antiangiogenic therapy: microvessel density, what it does and doesn't tell us." *J Natl Cancer Inst* **94**(12): 883-93.

- Hoeben, A., B. Landuyt, M.S. Highley, H. Wildiers, A.T. Van Oosterom and E.A. De Bruijn (2004). "Vascular endothelial growth factor and angiogenesis." Pharmacol Rev **56**(4): 549-80.
- Holash, J., S.J. Wiegand and G.D. Yancopoulos (1999). "New model of tumor angiogenesis: dynamic balance between vessel regression and growth mediated by angiopoietins and VEGF." Oncogene **18**(38): 5356-62.
- Holmqvist, K., M.J. Cross, C. Rolny, R. Hagerkvist, N. Rahimi, T. Matsumoto, L. Claesson-Welsh and M. Welsh (2004). "The adaptor protein shb binds to tyrosine 1175 in vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor-2 and regulates VEGF-dependent cellular migration." J Biol Chem **279**(21): 22267-75.
- Horak, E.R., R. Leek, N. Klenk, S. LeJeune, K. Smith, N. Stuart, M. Greenall, K. Stepniowska, *et al.* (1992). "Angiogenesis, assessed by platelet/endothelial cell adhesion molecule antibodies, as indicator of node metastases and survival in breast cancer." Lancet **340**(8828): 1120-4.
- Huber, A.H. and W.I. Weis (2001). "The structure of the beta-catenin/E-cadherin complex and the molecular basis of diverse ligand recognition by beta-catenin." Cell **105**(3): 391-402.
- Hudry-Clergeon, H., D. Stengel, E. Ninio and I. Vilgrain (2005). "Platelet-activating factor increases VE-cadherin tyrosine phosphorylation in mouse endothelial cells and its association with the PtdIns3'-kinase." Faseb J **19**(6): 512-20.
- Imamoto, A. and P. Soriano (1993). "Disruption of the csk gene, encoding a negative regulator of Src family tyrosine kinases, leads to neural tube defects and embryonic lethality in mice." Cell **73**(6): 1117-24.
- Ishida, M., T. Ishida, S.M. Thomas and B.C. Berk (1998). "Activation of extracellular signal-regulated kinases (ERK1/2) by angiotensin II is dependent on c-Src in vascular smooth muscle cells." Circ Res **82**(1): 7-12.
- Islam, S., T.E. Carey, G.T. Wolf, M.J. Wheelock and K.R. Johnson (1996). "Expression of N-cadherin by human squamous carcinoma cells induces a scattered fibroblastic phenotype with disrupted cell-cell adhesion." J Cell Biol **135**(6 Pt 1): 1643-54.
- Issbrucker, K., H.H. Marti, S. Hippenstiel, G. Springmann, R. Voswinckel, A. Gaumann, G. Breier, H.C. Drexler, *et al.* (2003). "p38 MAP kinase--a molecular switch between VEGF-induced angiogenesis and vascular hyperpermeability." Faseb J **17**(2): 262-4.
- Ivanov, D., M. Philippova, J. Antropova, F. Gubaeva, O. Iljinskaya, E. Tararak, V. Bochkov, P. Erne, *et al.* (2001). "Expression of cell adhesion molecule T-cadherin in the human vasculature." Histochem Cell Biol **115**(3): 231-42.
- Iyer, S., D.M. Ferreri, N.C. DeCocco, F.L. Minnear and P.A. Vincent (2004). "VE-cadherin-p120 interaction is required for maintenance of endothelial barrier function." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **286**(6): L1143-53.
- Jain, R.K. (2001). "Normalizing tumor vasculature with anti-angiogenic therapy: a new paradigm for combination therapy." Nat Med **7**(9): 987-9.
- Jain, R.K. (2005). "Antiangiogenic therapy for cancer: current and emerging concepts." Oncology (Williston Park) **19**(4 Suppl 3): 7-16.
- Jain, R.K. (2005). "Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy." Science **307**(5706): 58-62.
- Jonca, F., N. Ortega, P.E. Gleizes, N. Bertrand and J. Plouet (1997). "Cell release of bioactive fibroblast growth factor 2 by exon 6-encoded sequence of vascular endothelial growth factor." J Biol Chem **272**(39): 24203-9.
- Katoh, O., H. Tauchi, K. Kawashishi, A. Kimura and Y. Satow (1995). "Expression of the vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor gene, KDR, in hematopoietic cells

- and inhibitory effect of VEGF on apoptotic cell death caused by ionizing radiation." Cancer Res **55**(23): 5687-92.
- Keck, P.J., S.D. Hauser, G. Krivi, K. Sanzo, T. Warren, J. Feder and D.T. Connolly (1989). "Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF." Science **246**(4935): 1309-12.
- Kennedy, L.J., Jr. and I.L. Weissman (1971). "Dual origin of intimal cells in cardiac-allograft arteriosclerosis." N Engl J Med **285**(16): 884-7.
- Kevil, C.G., N. Okayama and J.S. Alexander (2001). "H₂O₂-mediated permeability II: importance of tyrosine phosphatase and kinase activity." Am J Physiol Cell Physiol **281**(6): C1940-7.
- Kevil, C.G., D.K. Payne, E. Mire and J.S. Alexander (1998). "Vascular permeability factor/vascular endothelial cell growth factor-mediated permeability occurs through disorganization of endothelial junctional proteins." J Biol Chem **273**(24): 15099-103.
- Kilarski, W.W., N. Jura and P. Gerwins (2003). "Inactivation of Src family kinases inhibits angiogenesis in vivo: implications for a mechanism involving organization of the actin cytoskeleton." Exp Cell Res **291**(1): 70-82.
- Kim, S.W., X. Fang, H. Ji, A.F. Paulson, J.M. Daniel, M. Ciesiolka, F. van Roy and P.D. McCreath (2002). "Isolation and characterization of XKaiso, a transcriptional repressor that associates with the catenin Xp120(ctn) in *Xenopus laevis*." J Biol Chem **277**(10): 8202-8.
- Klagsbrun, M. and A. Eichmann (2005). "A role for axon guidance receptors and ligands in blood vessel development and tumor angiogenesis." Cytokine Growth Factor Rev **16**(4-5): 535-48.
- Kooistra, M.R., M. Corada, E. Dejana and J.L. Bos (2005). "Epc1 regulates integrity of endothelial cell junctions through VE-cadherin." FEBS Lett **579**(22): 4966-72.
- Kostopoulos, I., P. Arapantoni-Dadioti, H. Gogas, S. Papadopoulos, V. Malamou-Mitsi, C.D. Scopa, S. Markaki, E. Karagianni, *et al.* (2006). "Evaluation of the prognostic value of HER-2 and VEGF in breast cancer patients participating in a randomized study with dose-dense sequential adjuvant chemotherapy." Breast Cancer Res Treat **96**(3): 251-61.
- Kouklis, P., M. Konstantoulaki and A.B. Malik (2003). "VE-cadherin-induced Cdc42 signaling regulates formation of membrane protrusions in endothelial cells." J Biol Chem **278**(18): 16230-6.
- Kouklis, P., M. Konstantoulaki, S. Vogel, M. Broman and A.B. Malik (2004). "Cdc42 regulates the restoration of endothelial barrier function." Circ Res **94**(2): 159-66.
- Kovacs, A. and R.A. Walker (2003). "P-cadherin as a marker in the differential diagnosis of breast lesions." J Clin Pathol **56**(2): 139-41.
- Kowalczyk, A.P., P. Navarro, E. Dejana, E.A. Bornslaeger, K.J. Green, D.S. Kopp and J.E. Borgwardt (1998). "VE-cadherin and desmoplakin are assembled into dermal microvascular endothelial intercellular junctions: a pivotal role for plakoglobin in the recruitment of desmoplakin to intercellular junctions." J Cell Sci **111** (Pt 20): 3045-57.
- Kranz, A., T. Mattfeldt and J. Waltenberger (1999). "Molecular mediators of tumor angiogenesis: enhanced expression and activation of vascular endothelial growth factor receptor KDR in primary breast cancer." Int J Cancer **84**(3): 293-8.
- Lakka, S.S., C.S. Gondi, N. Yanamandra, D.H. Dinh, W.C. Olivero, M. Gujrati and J.S. Rao (2003). "Synergistic down-regulation of urokinase plasminogen activator receptor and matrix metalloproteinase-9 in SNB19 glioblastoma cells efficiently inhibits glioma cell invasion, angiogenesis, and tumor growth." Cancer Res **63**(10): 2454-61.

- Lambert, O., J.C. Taveau, J.L. Him, R. Al Kurdi, D. Gulino-Debrac and A. Brisson (2005). "The basic framework of VE-cadherin junctions revealed by cryo-EM." J Mol Biol **346**(5): 1193-6.
- Lampugnani, M.G. (1999). "Cell migration into a wounded area in vitro." Methods Mol Biol **96**: 177-82.
- Lampugnani, M.G., M. Corada, P. Andriopoulou, S. Esser, W. Risau and E. Dejana (1997). "Cell confluence regulates tyrosine phosphorylation of adherens junction components in endothelial cells." J Cell Sci **110** (Pt 17): 2065-77.
- Lampugnani, M.G., M. Corada, L. Caveda, F. Breviario, O. Ayalon, B. Geiger and E. Dejana (1995). "The molecular organization of endothelial cell to cell junctions: differential association of plakoglobin, beta-catenin, and alpha-catenin with vascular endothelial cadherin (VE-cadherin)." J Cell Biol **129**(1): 203-17.
- Lampugnani, M.G. and E. Dejana (1997). "Interendothelial junctions: structure, signalling and functional roles." Curr Opin Cell Biol **9**(5): 674-82.
- Lampugnani, M.G., F. Orsenigo, M.C. Gagliani, C. Tacchetti and E. Dejana (2006). "Vascular endothelial cadherin controls VEGFR-2 internalization and signaling from intracellular compartments." J Cell Biol **174**(4): 593-604.
- Lampugnani, M.G., A. Zanetti, F. Breviario, G. Balconi, F. Orsenigo, M. Corada, R. Spagnuolo, M. Betson, *et al.* (2002). "VE-cadherin regulates endothelial actin activating Rac and increasing membrane association of Tiam." Mol Biol Cell **13**(4): 1175-89.
- Lauren, J., Y. Gunji and K. Alitalo (1998). "Is angiopoietin-2 necessary for the initiation of tumor angiogenesis?" Am J Pathol **153**(5): 1333-9.
- Leek, R.D., C.E. Lewis, R. Whitehouse, M. Greenall, J. Clarke and A.L. Harris (1996). "Association of macrophage infiltration with angiogenesis and prognosis in invasive breast carcinoma." Cancer Res **56**(20): 4625-9.
- Lewalle, J.M., K. Bajou, J. Desreux, M. Mareel, E. Dejana, A. Noel and J.M. Foidart (1997). "Alteration of interendothelial adherens junctions following tumor cell-endothelial cell interaction in vitro." Exp Cell Res **237**(2): 347-56.
- Li, C.Y., S. Shan, Q. Huang, R.D. Braun, J. Lanzen, K. Hu, P. Lin and M.W. Dewhirst (2000). "Initial stages of tumor cell-induced angiogenesis: evaluation via skin window chambers in rodent models." J Natl Cancer Inst **92**(2): 143-7.
- Li, S.Y., M. Rong, F. Grieu and B. Iacopetta (2006). "PIK3CA mutations in breast cancer are associated with poor outcome." Breast Cancer Res Treat **96**(1): 91-5.
- Liao, F., J.F. Doody, J. Overholser, B. Finnerty, R. Bassi, Y. Wu, E. Dejana, P. Kussie, *et al.* (2002). "Selective targeting of angiogenic tumor vasculature by vascular endothelial-cadherin antibody inhibits tumor growth without affecting vascular permeability." Cancer Res **62**(9): 2567-75.
- Lickert, H., A. Bauer, R. Kemler and J. Stappert (2000). "Casein kinase II phosphorylation of E-cadherin increases E-cadherin/beta-catenin interaction and strengthens cell-cell adhesion." J Biol Chem **275**(7): 5090-5.
- Liebner, S., A. Cattelino, R. Gallini, N. Rudini, M. Iurlaro, S. Piccolo and E. Dejana (2004). "Beta-catenin is required for endothelial-mesenchymal transformation during heart cushion development in the mouse." J Cell Biol **166**(3): 359-67.
- Liebner, S., H. Gerhardt and H. Wolburg (2000). "Differential expression of endothelial beta-catenin and plakoglobin during development and maturation of the blood-brain and blood-retina barrier in the chicken." Dev Dyn **217**(1): 86-98.
- Lin, Y., D.J. Weisdorf, A. Solovey and R.P. Hebbel (2000). "Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood." J Clin Invest **105**(1): 71-7.

- Lindquist, J.A., L. Simeoni and B. Schraven (2003). "Transmembrane adapters: attractants for cytoplasmic effectors." *Immunol Rev* **191**: 165-82.
- Liu, Y., S.R. Cox, T. Morita and S. Kourembanas (1995). "Hypoxia regulates vascular endothelial growth factor gene expression in endothelial cells. Identification of a 5' enhancer." *Circ Res* **77**(3): 638-43.
- Liu, Y. and D.R. Senger (2004). "Matrix-specific activation of Src and Rho initiates capillary morphogenesis of endothelial cells." *Faseb J* **18**(3): 457-68.
- Lund, C.V., M.T. Nguyen, G.C. Owens, A.J. Pakchoian, A. Shaterian, C.A. Kruse and B.P. Eliceiri (2006). "Reduced glioma infiltration in Src-deficient mice." *J Neurooncol* **78**(1): 19-29.
- Luo, J.C., S. Yamaguchi, A. Shinkai, K. Shitara and M. Shibuya (1998). "Significant expression of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor in mouse ascites tumors." *Cancer Res* **58**(12): 2652-60.
- Luo, Y. and G.L. Radice (2005). "N-cadherin acts upstream of VE-cadherin in controlling vascular morphogenesis." *J Cell Biol* **169**(1): 29-34.
- Lyden, D., K. Hattori, S. Dias, C. Costa, P. Blaikie, L. Butros, A. Chadburn, B. Heissig, *et al.* (2001). "Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth." *Nat Med* **7**(11): 1194-201.
- Manning, G., D.B. Whyte, R. Martinez, T. Hunter and S. Sudarsanam (2002). "The protein kinase complement of the human genome." *Science* **298**(5600): 1912-34.
- Mantovani, A., S. Sozzani, B. Bottazzi, G. Peri, F.L. Sciacca, M. Locati and F. Colotta (1993). "Monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1): signal transduction and involvement in the regulation of macrophage traffic in normal and neoplastic tissues." *Adv Exp Med Biol* **351**: 47-54.
- Martin, T.A., G. Watkins, J. Lane and W.G. Jiang (2005). "Assessing microvessels and angiogenesis in human breast cancer, using VE-cadherin." *Histopathology* **46**(4): 422-30.
- Martinez, J., A. Ferber, T.L. Bach and C.H. Yaen (2001). "Interaction of fibrin with VE-cadherin." *Ann N Y Acad Sci* **936**: 386-405.
- Masood, R., J. Cai, T. Zheng, D.L. Smith, D.R. Hinton and P.S. Gill (2001). "Vascular endothelial growth factor (VEGF) is an autocrine growth factor for VEGF receptor-positive human tumors." *Blood* **98**(6): 1904-13.
- Matsumura, T., K. Wolff and P. Petzelbauer (1997). "Endothelial cell tube formation depends on cadherin 5 and CD31 interactions with filamentous actin." *J Immunol* **158**(7): 3408-16.
- May, C., J.F. Doody, R. Abdullah, P. Balderes, X. Xu, C.P. Chen, Z. Zhu, L. Shapiro, *et al.* (2005). "Identification of a transiently exposed VE-cadherin epitope that allows for specific targeting of an antibody to the tumor neovasculature." *Blood* **105**(11): 4337-44.
- McDonald, D.M. and P. Baluk (2002). "Significance of blood vessel leakiness in cancer." *Cancer Res* **62**(18): 5381-5.
- Miravet, S., J. Piedra, F. Miro, E. Itarte, A. Garcia de Herreros and M. Dunach (2002). "The transcriptional factor Tcf-4 contains different binding sites for beta-catenin and plakoglobin." *J Biol Chem* **277**(3): 1884-91.
- Moore, M.A. (2002). "Putting the neo into neoangiogenesis." *J Clin Invest* **109**(3): 313-5.
- Mukherjee, S., M. Tessema and A. Wandinger-Ness (2006). "Vesicular trafficking of tyrosine kinase receptors and associated proteins in the regulation of signaling and vascular function." *Circ Res* **98**(6): 743-56.

- Navarro, P., L. Ruco and E. Dejana (1998). "Differential localization of VE- and N-cadherins in human endothelial cells: VE-cadherin competes with N-cadherin for junctional localization." *J Cell Biol* **140**(6): 1475-84.
- Nawroth, R., G. Poell, A. Ranft, S. Kloep, U. Samulowitz, G. Fachinger, M. Golding, D.T. Shima, *et al.* (2002). "VE-PTP and VE-cadherin ectodomains interact to facilitate regulation of phosphorylation and cell contacts." *Embo J* **21**(18): 4885-95.
- Nelson, C.M., D.M. Pirone, J.L. Tan and C.S. Chen (2004). "Vascular endothelial-cadherin regulates cytoskeletal tension, cell spreading, and focal adhesions by stimulating RhoA." *Mol Biol Cell* **15**(6): 2943-53.
- Nose, A., A. Nagafuchi and M. Takeichi (1988). "Expressed recombinant cadherins mediate cell sorting in model systems." *Cell* **54**(7): 993-1001.
- Nwariaku, F.E., Z. Liu, X. Zhu, R.H. Turnage, G.A. Sarosi and L.S. Terada (2002). "Tyrosine phosphorylation of vascular endothelial cadherin and the regulation of microvascular permeability." *Surgery* **132**(2): 180-5.
- Obermair, A., E. Kucera, K. Mayerhofer, P. Speiser, M. Seifert, K. Czerwenka, A. Kaider, S. Leodolter, *et al.* (1997). "Vascular endothelial growth factor (VEGF) in human breast cancer: correlation with disease-free survival." *Int J Cancer* **74**(4): 455-8.
- Osawa, M., M. Masuda, K. Kusano and K. Fujiwara (2002). "Evidence for a role of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 in endothelial cell mechanosignal transduction: is it a mechanoresponsive molecule?" *J Cell Biol* **158**(4): 773-85.
- Ostman, A., Q. Yang and N.K. Tonks (1994). "Expression of DEP-1, a receptor-like protein-tyrosine-phosphatase, is enhanced with increasing cell density." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(21): 9680-4.
- Ozawa, M. and R. Kemler (1998). "Altered cell adhesion activity by pervanadate due to the dissociation of alpha-catenin from the E-cadherin.catenin complex." *J Biol Chem* **273**(11): 6166-70.
- Page, C., M. Rose, M. Yacoub and R. Pigott (1992). "Antigenic heterogeneity of vascular endothelium." *Am J Pathol* **141**(3): 673-83.
- Panorchan, P., J.P. George and D. Wirtz (2006). "Probing intercellular interactions between vascular endothelial cadherin pairs at single-molecule resolution and in living cells." *J Mol Biol* **358**(3): 665-74.
- Parenti, A., L. Morbidelli, X.L. Cui, J.G. Douglas, J.D. Hood, H.J. Granger, F. Ledda and M. Ziche (1998). "Nitric oxide is an upstream signal of vascular endothelial growth factor-induced extracellular signal-regulated kinase1/2 activation in postcapillary endothelium." *J Biol Chem* **273**(7): 4220-6.
- Park, J.E., H.H. Chen, J. Winer, K.A. Houck and N. Ferrara (1994). "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* **269**(41): 25646-54.
- Park, J.I., S.W. Kim, J.P. Lyons, H. Ji, T.T. Nguyen, K. Cho, M.C. Barton, T. Deroo, *et al.* (2005). "Kaiso/p120-catenin and TCF/beta-catenin complexes coordinately regulate canonical Wnt gene targets." *Dev Cell* **8**(6): 843-54.
- Patel, S.D., C. Ciatto, C.P. Chen, F. Bahna, M. Rajebhosale, N. Arkus, I. Schieren, T.M. Jessell, *et al.* (2006). "Type II cadherin ectodomain structures: implications for classical cadherin specificity." *Cell* **124**(6): 1255-68.
- Paul, R., C.M. Ewing, J.C. Robinson, F.F. Marshall, K.R. Johnson, M.J. Wheelock and W.B. Isaacs (1997). "Cadherin-6, a cell adhesion molecule specifically expressed in the proximal renal tubule and renal cell carcinoma." *Cancer Res* **57**(13): 2741-8.
- Paul, R., Z.G. Zhang, B.P. Eliceiri, Q. Jiang, A.D. Boccia, R.L. Zhang, M. Chopp and D.A. Cheresh (2001). "Src deficiency or blockade of Src activity in mice provides cerebral protection following stroke." *Nat Med* **7**(2): 222-7.

- Pawson, T. (2004). "Specificity in signal transduction: from phosphotyrosine-SH2 domain interactions to complex cellular systems." *Cell* **116**(2): 191-203.
- Pedram, A., M. Razandi and E.R. Levin (1998). "Extracellular signal-regulated protein kinase/Jun kinase cross-talk underlies vascular endothelial cell growth factor-induced endothelial cell proliferation." *J Biol Chem* **273**(41): 26722-8.
- Peichev, M., A.J. Naiyer, D. Pereira, Z. Zhu, W.J. Lane, M. Williams, M.C. Oz, D.J. Hicklin, *et al.* (2000). "Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors." *Blood* **95**(3): 952-8.
- Pelicci, G., L. Lanfrancone, F. Grignani, J. McGlade, F. Cavallo, G. Forni, I. Nicoletti, F. Grignani, *et al.* (1992). "A novel transforming protein (SHC) with an SH2 domain is implicated in mitogenic signal transduction." *Cell* **70**(1): 93-104.
- Perl, A.K., P. Wilgenbus, U. Dahl, H. Semb and G. Christofori (1998). "A causal role for E-cadherin in the transition from adenoma to carcinoma." *Nature* **392**(6672): 190-3.
- Pierce, M., C. Wang, M. Stump and A. Kamb (2003). "Overexpression of the beta-catenin binding domain of cadherin selectively kills colorectal cancer cells." *Int J Cancer* **107**(2): 229-37.
- Plouet, J., J. Schilling and D. Gospodarowicz (1989). "Isolation and characterization of a newly identified endothelial cell mitogen produced by AtT-20 cells." *Embo J* **8**(12): 3801-6.
- Potter, M.D., S. Barbero and D.A. Cheresh (2005). "Tyrosine phosphorylation of VE-cadherin prevents binding of p120- and beta-catenin and maintains the cellular mesenchymal state." *J Biol Chem* **280**(36): 31906-12.
- Praloran, V., S. Mirshahi, C. Favard, H. Moukadiri and J. Plouet (1991). "[Mitogenic activity of vasculotropin for peripheral human lymphocytes]." *C R Acad Sci III* **313**(1): 21-6.
- Price, D.J., T. Miralem, S. Jiang, R. Steinberg and H. Avraham (2001). "Role of vascular endothelial growth factor in the stimulation of cellular invasion and signaling of breast cancer cells." *Cell Growth Differ* **12**(3): 129-35.
- Qi, L., W.A. Robinson, B.M. Brady and L.M. Glode (2003). "Migration and invasion of human prostate cancer cells is related to expression of VEGF and its receptors." *Anticancer Res* **23**(5A): 3917-22.
- Ribatti, D., M. Presta, A. Vacca, R. Ria, R. Giuliani, P. Dell'Era, B. Nico, L. Roncali, *et al.* (1999). "Human erythropoietin induces a pro-angiogenic phenotype in cultured endothelial cells and stimulates neovascularization in vivo." *Blood* **93**(8): 2627-36.
- Rimm, D.L., E.R. Koslov, P. Kebriaei, C.D. Cianci and J.S. Morrow (1995). "Alpha 1(E)-catenin is an actin-binding and -bundling protein mediating the attachment of F-actin to the membrane adhesion complex." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(19): 8813-7.
- Risau, W. (1997). "Mechanisms of angiogenesis." *Nature* **386**(6626): 671-4.
- Risau, W. and I. Flamme (1995). "Vasculogenesis." *Annu Rev Cell Dev Biol* **11**: 73-91.
- Roura, S., S. Miravet, J. Piedra, A. Garcia de Herreros and M. Dunach (1999). "Regulation of E-cadherin/Catenin association by tyrosine phosphorylation." *J Biol Chem* **274**(51): 36734-40.
- Rousseau, S., F. Houle, J. Landry and J. Huot (1997). "p38 MAP kinase activation by vascular endothelial growth factor mediates actin reorganization and cell migration in human endothelial cells." *Oncogene* **15**(18): 2169-77.
- Rubin, L.L. (1992). "Endothelial cells: adhesion and tight junctions." *Curr Opin Cell Biol* **4**(5): 830-3.
- Rugo, H.S. (2004). "Bevacizumab in the treatment of breast cancer: rationale and current data." *Oncologist* **9 Suppl 1**: 43-9.
- Sakurai, A., S. Fukuhara, A. Yamagishi, K. Sako, Y. Kamioka, M. Masuda, Y. Nakaoka and N. Mochizuki (2006). "MAGI-1 is required for Rap1 activation upon cell-cell contact

- and for enhancement of vascular endothelial cadherin-mediated cell adhesion." Mol Biol Cell **17**(2): 966-76.
- Sakurai, Y., K. Ohgimoto, Y. Kataoka, N. Yoshida and M. Shibuya (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): 1076-81.
- Samuels, Y. and K. Ericson (2006). "Oncogenic PI3K and its role in cancer." Curr Opin Oncol **18**(1): 77-82.
- Schmelz, M. and W.W. Franke (1993). "Complexus adhaerentes, a new group of desmoplakin-containing junctions in endothelial cells: the syndesmos connecting rethelial cells of lymph nodes." Eur J Cell Biol **61**(2): 274-89.
- Schmelz, M., R. Moll, C. Kuhn and W.W. Franke (1994). "Complexus adhaerentes, a new group of desmoplakin-containing junctions in endothelial cells: II. Different types of lymphatic vessels." Differentiation **57**(2): 97-117.
- Schnittler, H.J., B. Puschel and D. Drenckhahn (1997). "Role of cadherins and plakoglobin in interendothelial adhesion under resting conditions and shear stress." Am J Physiol **273**(5 Pt 2): H2396-405.
- Scott, P.A., K. Smith, R. Poulson, A. De Benedetti, R. Bicknell and A.L. Harris (1998). "Differential expression of vascular endothelial growth factor mRNA vs protein isoform expression in human breast cancer and relationship to eIF-4E." Br J Cancer **77**(12): 2120-8.
- Seebach, J., H.J. Madler, B. Wojciak-Stothard and H.J. Schnittler (2005). "Tyrosine phosphorylation and the small GTPase rac cross-talk in regulation of endothelial barrier function." Thromb Haemost **94**(3): 620-9.
- Senger, D.R., S.J. Galli, A.M. Dvorak, C.A. Perruzzi, V.S. Harvey and H.F. Dvorak (1983). "Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid." Science **219**(4587): 983-5.
- Serini, G., D. Valdembrì and F. Bussolino (2006). "Integrins and angiogenesis: a sticky business." Exp Cell Res **312**(5): 651-8.
- Shasby, D.M., D.R. Ries, S.S. Shasby and M.C. Winter (2002). "Histamine stimulates phosphorylation of adherens junction proteins and alters their link to vimentin." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **282**(6): L1330-8.
- Shay-Salit, A., M. Shushy, E. Wolfvitz, H. Yahav, F. Breviario, E. Dejana and N. Resnick (2002). "VEGF receptor 2 and the adherens junction as a mechanical transducer in vascular endothelial cells." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(14): 9462-7.
- Shi, Q., S. Rafii, M.H. Wu, E.S. Wijelath, C. Yu, A. Ishida, Y. Fujita, S. Kothari, *et al.* (1998). "Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells." Blood **92**(2): 362-7.
- Shi, S., A.D. Verin, K.L. Schaphorst, L.I. Gilbert-McClain, C.E. Patterson, R.P. Irwin, V. Natarajan and J.G. Garcia (1998). "Role of tyrosine phosphorylation in thrombin-induced endothelial cell contraction and barrier function." Endothelium **6**(2): 153-71.
- Shi, Y., S. Inoue, R. Shinozaki, K. Fukue and T. Kougo (1998). "Release of cytokines from human umbilical vein endothelial cells treated with platinum compounds in vitro." Jpn J Cancer Res **89**(7): 757-67.
- Shimazui, T., L.A. Girolidi, P.P. Bringuier, E. Oosterwijk and J.A. Schalken (1996). "Complex cadherin expression in renal cell carcinoma." Cancer Res **56**(14): 3234-7.
- Soga, N., J.O. Connolly, M. Chellaiah, J. Kawamura and K.A. Hruska (2001). "Rac regulates vascular endothelial growth factor stimulated motility." Cell Commun Adhes **8**(1): 1-13.

- Soler, C., P. Rousselle and O. Damour (1998). "Cadherin mediated cell-cell adhesion is regulated by tyrosine phosphatases in human keratinocytes." Cell Adhes Commun **5**(1): 13-25.
- Sondell, M., G. Lundborg and M. Kanje (1999). "Vascular endothelial growth factor has neurotrophic activity and stimulates axonal outgrowth, enhancing cell survival and Schwann cell proliferation in the peripheral nervous system." J Neurosci **19**(14): 5731-40.
- Songyang, Z., S.E. Shoelson, J. McGlade, P. Olivier, T. Pawson, X.R. Bustelo, M. Barbacid, H. Sabe, *et al.* (1994). "Specific motifs recognized by the SH2 domains of Csk, 3BP2, fps/fes, GRB-2, HCP, SHC, Syk, and Vav." Mol Cell Biol **14**(4): 2777-85.
- Sorby, M. and A. Ostman (1996). "Protein-tyrosine phosphatase-mediated decrease of epidermal growth factor and platelet-derived growth factor receptor tyrosine phosphorylation in high cell density cultures." J Biol Chem **271**(18): 10963-6.
- Spagnuolo, R., M. Corada, F. Orsenigo, L. Zanetta, U. Deuschle, P. Sandy, C. Schneider, C.J. Drake, *et al.* (2004). "Gas1 is induced by VE-cadherin and vascular endothelial growth factor and inhibits endothelial cell apoptosis." Blood **103**(8): 3005-12.
- Speirs, V., D.S. Walton, M.C. Hall and S.L. Atkin (1999). "In vivo and in vitro expression of steroid-converting enzymes in human breast tumours: associations with interleukin-6." Br J Cancer **81**(4): 690-5.
- Spyridopoulos, I., E. Brogi, M. Kearney, A.B. Sullivan, C. Cetrulo, J.M. Isner and D.W. Losordo (1997). "Vascular endothelial growth factor inhibits endothelial cell apoptosis induced by tumor necrosis factor-alpha: balance between growth and death signals." J Mol Cell Cardiol **29**(5): 1321-30.
- Stein, P.L., H. Vogel and P. Soriano (1994). "Combined deficiencies of Src, Fyn, and Yes tyrosine kinases in mutant mice." Genes Dev **8**(17): 1999-2007.
- Stelzner, T.J., J.V. Weil and R.F. O'Brien (1989). "Role of cyclic adenosine monophosphate in the induction of endothelial barrier properties." J Cell Physiol **139**(1): 157-66.
- Stump, M.M., G.L. Jordan, Jr., M.E. Debakey and B. Halpert (1963). "Endothelium Grown from Circulating Blood on Isolated Intravascular Dacron Hub." Am J Pathol **43**: 361-7.
- Sui, X.F., T.D. Kiser, S.W. Hyun, D.J. Angelini, R.L. Del Vecchio, B.A. Young, J.D. Hasday, L.H. Romer, *et al.* (2005). "Receptor protein tyrosine phosphatase micro regulates the paracellular pathway in human lung microvascular endothelia." Am J Pathol **166**(4): 1247-58.
- Suzuki, S.T. (1996). "Protocadherins and diversity of the cadherin superfamily." J Cell Sci **109** (Pt 11): 2609-11.
- Takahashi, H. and M. Shibuya (2005). "The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions." Clin Sci (Lond) **109**(3): 227-41.
- Takahashi, T., C. Kalka, H. Masuda, D. Chen, M. Silver, M. Kearney, M. Magner, J.M. Isner, *et al.* (1999). "Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization." Nat Med **5**(4): 434-8.
- Takahashi, T., S. Yamaguchi, K. Chida and M. Shibuya (2001). "A single autophosphorylation site on KDR/Flk-1 is essential for VEGF-A-dependent activation of PLC-gamma and DNA synthesis in vascular endothelial cells." Embo J **20**(11): 2768-78.
- Takeichi, M. (1990). "Cadherins: a molecular family important in selective cell-cell adhesion." Annu Rev Biochem **59**: 237-52.
- Tanihara, H., K. Sano, R.L. Heimark, T. St John and S. Suzuki (1994). "Cloning of five human cadherins clarifies characteristic features of cadherin extracellular domain and

- provides further evidence for two structurally different types of cadherin." Cell Adhes Commun **2**(1): 15-26.
- Telo, P., F. Breviario, P. Huber, C. Panzeri and E. Dejana (1998). "Identification of a novel cadherin (vascular endothelial cadherin-2) located at intercellular junctions in endothelial cells." J Biol Chem **273**(28): 17565-72.
- Thakker, G.D., D.P. Hajjar, W.A. Muller and T.K. Rosengart (1999). "The role of phosphatidylinositol 3-kinase in vascular endothelial growth factor signaling." J Biol Chem **274**(15): 10002-7.
- Tillet, E., D. Vittet, O. Feraud, R. Moore, R. Kemler and P. Huber (2005). "N-cadherin deficiency impairs pericyte recruitment, and not endothelial differentiation or sprouting, in embryonic stem cell-derived angiogenesis." Exp Cell Res **310**(2): 392-400.
- Tinsley, J.H., E.E. Ustinova, W. Xu and S.Y. Yuan (2002). "Src-dependent, neutrophil-mediated vascular hyperpermeability and beta-catenin modification." Am J Physiol Cell Physiol **283**(6): C1745-51.
- Tinsley, J.H., M.H. Wu, W. Ma, A.C. Taulman and S.Y. Yuan (1999). "Activated neutrophils induce hyperpermeability and phosphorylation of adherens junction proteins in coronary venular endothelial cells." J Biol Chem **274**(35): 24930-4.
- Toi, M., K. Inada, H. Suzuki and T. Tominaga (1995). "Tumor angiogenesis in breast cancer: its importance as a prognostic indicator and the association with vascular endothelial growth factor expression." Breast Cancer Res Treat **36**(2): 193-204.
- Tran, J., J. Rak, C. Sheehan, S.D. Saibil, E. LaCasse, R.G. Korneluk and R.S. Kerbel (1999). "Marked induction of the IAP family antiapoptotic proteins survivin and XIAP by VEGF in vascular endothelial cells." Biochem Biophys Res Commun **264**(3): 781-8.
- Tzima, E., M. Irani-Tehrani, W.B. Kiosses, E. Dejana, D.A. Schultz, B. Engelhardt, G. Cao, H. DeLisser, *et al.* (2005). "A mechanosensory complex that mediates the endothelial cell response to fluid shear stress." Nature **437**(7057): 426-31.
- Ukropec, J.A., M.K. Hollinger, S.M. Salva and M.J. Woolkalis (2000). "SHP2 association with VE-cadherin complexes in human endothelial cells is regulated by thrombin." J Biol Chem **275**(8): 5983-6.
- Urbich, C. and S. Dimmeler (2004). "Endothelial progenitor cells functional characterization." Trends Cardiovasc Med **14**(8): 318-22.
- Urbich, C. and S. Dimmeler (2004). "Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology." Circ Res **95**(4): 343-53.
- Vajkoczy, P., S. Blum, M. Lamparter, R. Mailhammer, R. Erber, B. Engelhardt, D. Vestweber and A.K. Hatzopoulos (2003). "Multistep nature of microvascular recruitment of ex vivo-expanded embryonic endothelial progenitor cells during tumor angiogenesis." J Exp Med **197**(12): 1755-65.
- Valiron, O., V. Chevrier, Y. Usson, F. Breviario, D. Job and E. Dejana (1996). "Desmoplakin expression and organization at human umbilical vein endothelial cell-to-cell junctions." J Cell Sci **109** (Pt 8): 2141-9.
- Valtola, R., P. Salven, P. Heikkila, J. Taipale, H. Joensuu, M. Rehn, T. Pihlajaniemi, H. Weich, *et al.* (1999). "VEGFR-3 and its ligand VEGF-C are associated with angiogenesis in breast cancer." Am J Pathol **154**(5): 1381-90.
- van Buul, J.D., E.C. Anthony, M. Fernandez-Borja, K. Burrige and P.L. Hordijk (2005). "Proline-rich tyrosine kinase 2 (Pyk2) mediates vascular endothelial-cadherin-based cell-cell adhesion by regulating beta-catenin tyrosine phosphorylation." J Biol Chem **280**(22): 21129-36.
- van Hinsbergh, V.W. (2001). "The endothelium: vascular control of haemostasis." Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol **95**(2): 198-201.

- van Nieuw Amerongen, G.P., R. Draijer, M.A. Vermeer and V.W. van Hinsbergh (1998). "Transient and prolonged increase in endothelial permeability induced by histamine and thrombin: role of protein kinases, calcium, and RhoA." Circ Res **83**(11): 1115-23.
- Van Slyke, P., M.L. Coll, Z. Master, H. Kim, J. Filmus and D.J. Dumont (2005). "Dok-R mediates attenuation of epidermal growth factor-dependent mitogen-activated protein kinase and Akt activation through processive recruitment of c-Src and Csk." Mol Cell Biol **25**(9): 3831-41.
- van Wetering, S., J.D. van Buul, S. Quik, F.P. Mul, E.C. Anthony, J.P. ten Klooster, J.G. Collard and P.L. Hordijk (2002). "Reactive oxygen species mediate Rac-induced loss of cell-cell adhesion in primary human endothelial cells." J Cell Sci **115**(Pt 9): 1837-46.
- Verin, A.D., L.I. Gilbert-McClain, C.E. Patterson and J.G. Garcia (1998). "Biochemical regulation of the nonmuscle myosin light chain kinase isoform in bovine endothelium." Am J Respir Cell Mol Biol **19**(5): 767-76.
- Vinals, F., J.C. Chambard and J. Pouyssegur (1999). "p70 S6 kinase-mediated protein synthesis is a critical step for vascular endothelial cell proliferation." J Biol Chem **274**(38): 26776-82.
- Vos, C.B., A.M. Cleton-Jansen, G. Berx, W.J. de Leeuw, N.T. ter Haar, F. van Roy, C.J. Cornelisse, J.L. Peterse, *et al.* (1997). "E-cadherin inactivation in lobular carcinoma in situ of the breast: an early event in tumorigenesis." Br J Cancer **76**(9): 1131-3.
- Wang, X., Y. Xiao, Y. Mou, Y. Zhao, W.M. Blankesteyn and J.L. Hall (2002). "A role for the beta-catenin/T-cell factor signaling cascade in vascular remodeling." Circ Res **90**(3): 340-7.
- Waschke, J., W. Baumgartner, R.H. Adamson, M. Zeng, K. Aktories, H. Barth, C. Wilde, F.E. Curry, *et al.* (2004). "Requirement of Rac activity for maintenance of capillary endothelial barrier properties." Am J Physiol Heart Circ Physiol **286**(1): H394-401.
- Waschke, J., D. Drenckhahn, R.H. Adamson, H. Barth and F.E. Curry (2004). "cAMP protects endothelial barrier functions by preventing Rac-1 inhibition." Am J Physiol Heart Circ Physiol **287**(6): H2427-33.
- Waschke, J., D. Drenckhahn, R.H. Adamson and F.E. Curry (2004). "Role of adhesion and contraction in Rac 1-regulated endothelial barrier function in vivo and in vitro." Am J Physiol Heart Circ Physiol **287**(2): H704-11.
- Weidner, N., J. Folkman, F. Pozza, P. Bevilacqua, E.N. Allred, D.H. Moore, S. Meli and G. Gasparini (1992). "Tumor angiogenesis: a new significant and independent prognostic indicator in early-stage breast carcinoma." J Natl Cancer Inst **84**(24): 1875-87.
- Weidner, N., J.P. Semple, W.R. Welch and J. Folkman (1991). "Tumor angiogenesis and metastasis--correlation in invasive breast carcinoma." N Engl J Med **324**(1): 1-8.
- Weis, S., J. Cui, L. Barnes and D. Cheresh (2004). "Endothelial barrier disruption by VEGF-mediated Src activity potentiates tumor cell extravasation and metastasis." J Cell Biol **167**(2): 223-9.
- Weis, S., S. Shintani, A. Weber, R. Kirchmair, M. Wood, A. Cravens, H. McSharry, A. Iwakura, *et al.* (2004). "Src blockade stabilizes a Flk/cadherin complex, reducing edema and tissue injury following myocardial infarction." J Clin Invest **113**(6): 885-94.
- Werdich, X.Q. and J.S. Penn (2005). "Src, Fyn and Yes play differential roles in VEGF-mediated endothelial cell events." Angiogenesis **8**(4): 315-26.
- Wheelock, M.J. and K.R. Johnson (2003). "Cadherin-mediated cellular signaling." Curr Opin Cell Biol **15**(5): 509-14.
- Willett, C.G., Y. Boucher, D.G. Duda, E. di Tomaso, L.L. Munn, R.T. Tong, S.V. Kozin, L. Petit, *et al.* (2005). "Surrogate markers for antiangiogenic therapy and dose-limiting

- toxicities for bevacizumab with radiation and chemotherapy: continued experience of a phase I trial in rectal cancer patients." J Clin Oncol **23**(31): 8136-9.
- Wilting, J., B. Brand-Saberi, H. Kurz and B. Christ (1995). "Development of the embryonic vascular system." Cell Mol Biol Res **41**(4): 219-32.
- Winkler, F., S.V. Kozin, R.T. Tong, S.S. Chae, M.F. Booth, I. Garkavtsev, L. Xu, D.J. Hicklin, *et al.* (2004). "Kinetics of vascular normalization by VEGFR2 blockade governs brain tumor response to radiation: role of oxygenation, angiopoietin-1, and matrix metalloproteinases." Cancer Cell **6**(6): 553-63.
- Wojciak-Stothard, B., L.Y. Tsang and S.G. Haworth (2005). "Rac and Rho play opposing roles in the regulation of hypoxia/reoxygenation-induced permeability changes in pulmonary artery endothelial cells." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **288**(4): L749-60.
- Wu, L.W., L.D. Mayo, J.D. Dunbar, K.M. Kessler, M.R. Baerwald, E.A. Jaffe, D. Wang, R.S. Warren, *et al.* (2000). "Utilization of distinct signaling pathways by receptors for vascular endothelial cell growth factor and other mitogens in the induction of endothelial cell proliferation." J Biol Chem **275**(7): 5096-103.
- Wu, W., X. Shu, H. Hovsepian, R.D. Mosteller and D. Broek (2003). "VEGF receptor expression and signaling in human bladder tumors." Oncogene **22**(22): 3361-70.
- Wymann, M.P., M. Zvelebil and M. Laffargue (2003). "Phosphoinositide 3-kinase signalling--which way to target?" Trends Pharmacol Sci **24**(7): 366-76.
- Xiao, K., D.F. Allison, K.M. Buckley, M.D. Kottke, P.A. Vincent, V. Faundez and A.P. Kowalczyk (2003). "Cellular levels of p120 catenin function as a set point for cadherin expression levels in microvascular endothelial cells." J Cell Biol **163**(3): 535-45.
- Xiao, K., D.F. Allison, M.D. Kottke, S. Summers, G.P. Sorescu, V. Faundez and A.P. Kowalczyk (2003). "Mechanisms of VE-cadherin processing and degradation in microvascular endothelial cells." J Biol Chem **278**(21): 19199-208.
- Xiao, K., J. Garner, K.M. Buckley, P.A. Vincent, C.M. Chiasson, E. Dejana, V. Faundez and A.P. Kowalczyk (2005). "p120-Catenin regulates clathrin-dependent endocytosis of VE-cadherin." Mol Biol Cell **16**(11): 5141-51.
- Xu, F., M.J. Xu, R. Zhao, A. Guerrah, F. Zeng and Z.J. Zhao (2002). "Tyrosine phosphatases SHP-1 and SHP-2 are associated with distinct tyrosine-phosphorylated proteins." Exp Cell Res **272**(1): 75-83.
- Xu, Y. and G. Carpenter (1999). "Identification of cadherin tyrosine residues that are phosphorylated and mediate Shc association." J Cell Biochem **75**(2): 264-71.
- Xu, Y., D.F. Guo, M. Davidson, T. Inagami and G. Carpenter (1997). "Interaction of the adaptor protein Shc and the adhesion molecule cadherin." J Biol Chem **272**(21): 13463-6.
- Yap, A.S. (1998). "The morphogenetic role of cadherin cell adhesion molecules in human cancer: a thematic review." Cancer Invest **16**(4): 252-61.
- Yap, A.S., C.M. Niessen and B.M. Gumbiner (1998). "The juxtamembrane region of the cadherin cytoplasmic tail supports lateral clustering, adhesive strengthening, and interaction with p120ctn." J Cell Biol **141**(3): 779-89.
- Yoshiji, H., D.E. Gomez, M. Shibuya and U.P. Thorgeirsson (1996). "Expression of vascular endothelial growth factor, its receptor, and other angiogenic factors in human breast cancer." Cancer Res **56**(9): 2013-6.
- Yoshiji, H., S.R. Harris and U.P. Thorgeirsson (1997). "Vascular endothelial growth factor is essential for initial but not continued in vivo growth of human breast carcinoma cells." Cancer Res **57**(18): 3924-8.

- Young, B.A., X. Sui, T.D. Kiser, S.W. Hyun, P. Wang, S. Sakarya, D.J. Angelini, K.L. Schaphorst, *et al.* (2003). "Protein tyrosine phosphatase activity regulates endothelial cell-cell interactions, the paracellular pathway, and capillary tube stability." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **285**(1): L63-75.
- Zachary, I. and G. Glikli (2001). "Signaling transduction mechanisms mediating biological actions of the vascular endothelial growth factor family." Cardiovasc Res **49**(3): 568-81.
- Zachary, I. and E. Rozengurt (1992). "Focal adhesion kinase (p125FAK): a point of convergence in the action of neuropeptides, integrins, and oncogenes." Cell **71**(6): 891-4.
- Zanetti, A., M.G. Lampugnani, G. Balconi, F. Breviario, M. Corada, L. Lanfrancone and E. Dejana (2002). "Vascular endothelial growth factor induces SHC association with vascular endothelial cadherin: a potential feedback mechanism to control vascular endothelial growth factor receptor-2 signaling." Arterioscler Thromb Vasc Biol **22**(4): 617-22.
- Zebrowski, B.K., S. Yano, W. Liu, R.M. Shaheen, D.J. Hicklin, J.B. Putnam, Jr. and L.M. Ellis (1999). "Vascular endothelial growth factor levels and induction of permeability in malignant pleural effusions." Clin Cancer Res **5**(11): 3364-8.
- Zhou, X., A. Stuart, L.E. Dettin, G. Rodriguez, B. Hoel and G.I. Gallicano (2004). "Desmoplakin is required for microvascular tube formation in culture." J Cell Sci **117**(Pt 15): 3129-40.
- Zimmermann, R.C., T. Hartman, S. Kavic, S.A. Pauli, P. Bohlen, M.V. Sauer and J. Kitajewski (2003). "Vascular endothelial growth factor receptor 2-mediated angiogenesis is essential for gonadotropin-dependent follicle development." J Clin Invest **112**(5): 659-69.

Résumé

L'intégrité de l'endothélium vasculaire est dépendante de l'organisation des jonctions adhérentes entre les cellules endothéliales. La VE (Vascular Endothelial)-cadhérine un constituant essentiel de ces jonctions et sa phosphorylation sur tyrosine pourrait être un moyen de régulation de la perméabilité endothéliale.

Ce travail de thèse a permis de valider l'existence *in vivo* de la phosphorylation sur tyrosine de la VE-cadhérine. Nous montrons en effet la très forte induction de cette phosphorylation au cours de l'angiogenèse physiologique dans l'ovaire et l'utérus, par rapport aux tissus quiescents. Pour la première fois, nous rapportons l'association constante de la tyrosine kinase Src à la VE-cadhérine, à la fois *in vivo* et *in vitro*. De plus, en accord avec les données de la littérature *in vitro*, nous confirmons *in vivo* l'association transitoire du VEGF-R2 à la VE-cadhérine dans un contexte angiogénique.

Par différentes approches, nous apportons la preuve que la VE-cadhérine est un substrat direct de Src, et que la tyrosine 685 du domaine cytoplasmique est la cible unique de la kinase en réponse au VEGF. Grâce à un test de blessure d'HUVECs, nous montrons l'importance de la phosphorylation par Src de la tyrosine 685 dans la migration des cellules endothéliales induite par le VEGF.

Enfin, l'étude de carcinomes mammaires nous a permis de démontrer l'existence d'une forme phosphorylée sur tyrosine de la VE-cadhérine également dans l'angiogenèse tumorale, et son association avec une activité kinase de type Src et PI3K.

L'ensemble de ce travail permet de conclure à la phosphorylation par Src de la VE-cadhérine sur la Y685 en réponse au VEGF, et suggère que cette phosphorylation représente *in vivo* la signature d'un endothélium activé.