HAL
open science

Nouvelle architecture de la jonction adhérente endothéliale

Stéphanie Heyraud

To cite this version:

Stéphanie Heyraud. Nouvelle architecture de la jonction adhérente endothéliale. Biologie cellulaire. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2007. Français. NNT : . tel-00179647

HAL Id: tel-00179647

https://theses.hal.science/tel-00179647

Submitted on 16 Oct 2007

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
Ecole Doctorale Chimie et Sciences du Vivant

Laboratoire d'Ingénierie des Macromolécules
Institut de Biologie Structurale
Grenoble

et

Laboratoire de Physiopathologies Vasculaires : Interactions cellulaires, Signalisation et Vieillissement, U INSERM 882
CEA, Grenoble

THESE

Réalisée sous la direction du **Dr Danielle Gulino-Debrac**

Pour l'obtention du titre de

Docteur de l'Université Joseph Fourier Grenoble 1

Discipline : biologie cellulaire et moléculaire

Nouvelle architecture de la jonction adhérente endothéliale

Présentée et soutenue publiquement par

Stéphanie HEYRAUD

Le 8 octobre 2007

Composition du jury :

Président : Dr Françoise RUSSO-MARIE

Rapporteurs : Dr Cécile GAUTHIER-ROUVIERE
Dr René-Marc MEGE

Examinateurs : Dr Muriel JACQUIER-SARLIN
Dr Philippe HUBER
Dr Danielle GULINO-DEBRAC

Université Joseph Fourier Grenoble 1
Ecole Doctorale Chimie et Sciences du Vivant

Laboratoire d'Ingénierie des Macromolécules
Institut de Biologie Structurale
Grenoble

et

Laboratoire de Physiopathologies Vasculaires : Interactions cellulaires, Signalisation et Vieillissement, U INSERM 882
CEA, Grenoble

THESE

Réalisée sous la direction du **Dr Danielle Gulino-Debrac**

Pour l'obtention du titre de

Docteur de l'Université Joseph Fourier Grenoble 1

Discipline : biologie cellulaire et moléculaire

Nouvelle architecture de la jonction adhérente endothéliale

Présentée et soutenue publiquement par

Stéphanie HEYRAUD

Le 8 octobre 2007

Composition du jury :

Président : Dr Françoise RUSSO-MARIE

Rapporteurs : Dr Cécile GAUTHIER-ROUVIERE
Dr René-Marc MEGE

Examinateurs : Dr Muriel JACQUIER-SARLIN
Dr Philippe HUBER
Dr Danielle GULINO-DEBRAC

Remerciements

Merci à toutes celles et à tous ceux qui, tout au long du chemin tortueux de la thèse, auront su

Guider mes pas vers le bout du chemin,
Me faire profiter de leur expérience, de leur savoir, parfois de leur sagesse,
M'enseigner la rigueur, la persévérance, et la patience (non sans mal),
Me prodiguer de judicieux conseils,
M'éviter les embûches,
Me motiver dans les instants de faiblesse,
Me protéger de mes erreurs,
Me soutenir dans l'adversité,
M'offrir leur amitié, leur oreille attentive, et parfois leur épaule pour m'y épancher,
Et même m'ouvrir leur cœur

A toutes ces personnes à qui j'espère avoir apporté en retour au moins autant qu'elles ne m'ont donné,

Du fond du cœur : MERCI !

Une pensée toute particulière pour toi, qui m'a offert ton cœur, et à qui je remets le mien sans condition...

RESUME

Nouvelle architecture de la jonction adhérente endothéliale

L'intégrité de l'endothélium vasculaire est maintenue par les jonctions intercellulaires, notamment les jonctions adhérentes. Ces jonctions voient leur structure perturbée lors de phénomènes physiologiques tels que l'angiogenèse ou l'inflammation.

Afin de comprendre les mécanismes sous-jacents à la perturbation de la structure des jonctions, nous avons tout d'abord établi la composition protéique du complexe à base de VE-cadhérine des jonctions adhérentes matures de cellules endothéliales primaires confluentes de type HUVEC. Pour cela, nous avons couplé immunoprécipitation et analyse protéomique par spectrométrie de masse (LC-nanoESI-MS/MS). Nous avons ainsi identifié de nouveaux partenaires du complexe à base de VE-cadhérine jamais identifiés auparavant au niveau de la jonction adhérente endothéliale. Parmi ceux-ci se trouvent des protéines liant l'actine telle l'annexine 2. Nos résultats indiquent que l'annexine 2, qui s'accumule à la membrane plasmique au niveau des radeaux de cholestérol, entre en interaction directe avec le complexe à base de VE-cadhérine. Ainsi, l'annexine 2 connecte le complexe jonctionnel au cytosquelette d'actine dans les HUVEC confluentes. L'utilisation de siRNA nous a permis d'établir que l'expression de l'annexine 2 est absolument nécessaire au maintien de la VE-cadhérine à la membrane plasmique. Nos résultats suggèrent que l'annexine 2, connectée à l'actine, arrime le complexe à base de VE-cadhérine au niveau des radeaux de cholestérol. En limitant la diffusion membranaire du complexe jonctionnel, ces interactions aboutissent à une consolidation des jonctions adhérentes ce qui contribue à maintenir l'intégrité de l'endothélium vasculaire. Lorsque les HUVEC sont soumises à des molecules destabilisant les jonctions adhérentes, une délocalisation de l'annexine 2 de la membrane vers le cytosol et une perturbation de la localisation de la VE-cadhérine sont observés. Ceci suggère que le prérequis à l'ouverture des jonctions adhérentes nécessite une rupture de l'interaction existant entre le complexe à base de VE-cadhérine et l'annexine 2.

La moésine, quant à elle, semble interagir avec le complexe à base de VE-cadhérine dans les jonctions immatures formées entre cellules sub-confluentes. La moésine serait donc impliquée dans l'établissement des contacts intercellulaires précoces plutôt que dans la maturation des jonctions endothéliales.

Mots-clés :

VE-cadhérine, Jonction adhérente, Actine, Annexine 2

ABSTRACT

New architecture of the endothelial adherens junction

Tumoral cells as leucocytes get through the vascular endothelium across adherens junctions, mainly composed of VE-cadherin. This transmigration process disturbs transiently the junctions, impairing so the endothelium integrity.

To understand the mechanisms leading to the opening of adherens junctions, we first determined the proteic composition of the VE-cadherin-based complex of primary endothelial cell (HUVEC) mature adherens junctions. To do so, we developed a method coupling immunoprecipitation and mass spectrometry-based proteomic analysis (LC-nanoESI-MS/MS). Partners of VE-cadherin, so far unknown such as annexin 2 and moesin, were so identified.

Our results demonstrated that, in confluent HUVECs, the VE-cadherin-based complex interacts with annexin 2 and that annexin 2 translocates from the cytoplasm to the plasma membrane as cell reach confluence. Annexin 2, located in cholesterol rafts, binds both to the actin cytoskeleton and the VE-cadherin-based complex so the complex is docked to cholesterol rafts. These multiple connections prevent the lateral diffusion of the VE-cadherin-based complex thus strengthening adherens junctions in the ultimate steps of maturation. Moreover, we observed that the down-regulation of annexin 2 by siRNA induces a delocalization of VE-cadherin from adherens junctions and consequently a destabilization of these junctions. Furthermore, our data suggest that the decoupling of the annexin 2/p11 complex from the VE-cadherin-based junction, triggered by Vascular Endothelial Growth Factor facilitates the switch from a quiescent to an immature state.

Moesin seems to interact with the VE-cadherin-based complex in immature junctions of sub-confluent HUVECs. Moesin might be involved in production of early cell-cell contact rather than in adherens junction maturation.

Key words:

VE-cadherin, Adherens Junction, Actin, Annexin 2

SOMMAIRE

SOMMAIRE

LISTE DES ABREVIATIONS I

LISTE DES FIGURES IV

INTRODUCTION 1

1. LE RESEAU VASCULAIRE 1
2. L'ENDOTHELIUM VASCULAIRE 2
   - 2.1 La vasculogenèse 2
   - 2.2 L'angiogenèse 3
3. LES JONCTIONS ENDOTHELIALES 3
   - 3.1 Les complexus adhaerentes 4
   - 3.2 Les jonctions communicantes 4
   - 3.3 Les jonctions serrées (zonula occludens) 6
     - 3.3.1 Les protéines majeures constitutives des jonctions serrées 7
     - 3.3.2 Les fonctions des jonctions serrées 9
   - 3.4 Les jonctions adhérentes 10
   - 3.5 Les autres systèmes d'adhérence 10
     - 3.5.1 Le système nectine/afadine 11
     - 3.5.2 Le système PECAM-1/β-caténine/SHP2 12

4 LES CADHERINES DE L'ENDOTHELIUM VASCULAIRE 14
   - 4.1 Classification des cadhérines 14
     - 4.1.1 Les cadhérines classiques 14
     - 4.1.2 Les protocadhérines 16
     - 4.1.3 Les autres sous-familles 16
   - 4.2 Les cadhérines endothéliales 17
     - 4.2.1 La VE-cadhérine (Vascular Endothelial-cadherin, cadhérine 5 ou CD144) 17
       - 4.2.1.1 Structure 17
       - 4.2.1.2 Auto-association 18
     - 4.2.2 N-cadhérine (Neural -cadherin ou cadhérine 2) 22
     - 4.2.3 La protocadhérine 12 (PCDH12 ou VE-cadhérine-2) 23
     - 4.2.4 La T-cadhérine (H-cadhérine ou cadhérine 13) 24

5 LA JONCTION ADHERENTE ENDOTHELIALE 25
   - 5.1 Les fonctions de la VE-cadhérine 25

5.1.1 Contrôle de l'intégrité et de la perméabilité vasculaires 25
5.1.2 Régulation de la prolifération 27
5.1.3 Rôle dans la morphogenèse vasculaire 27
5.1.4 La transmission du signal 28
5.1.5 Signalisation induite par le VEGF 30
5.1.6 Implication dans l'inflammation et la transmigration leucocytaire 32
5.2 Les caténines 34
5.2.1 La β-caténine 34
5.2.2 La γ-caténine (ou plakoglobine) 38
5.2.3 La sous-famille p120 39
5.2.3.1 p120 (p120-caténine ou $p120^{ctn}$) 39
5.2.3.2 Les autres membres de la sous-famille p120 42
5.3 Les partenaires indirects de la VE-cadhérine 43
5.3.1 L'α-caténine 43
5.3.2 IQGAP1 44
5.3.3 La connexion au cytosquelette 48
5.3.3.1 Les filaments intermédiaires 48
5.3.3.2 Les microtubules 48
5.3.3.3 Le cytosquelette d'actine 49
5.3.3.3.1 Les régulateurs du cytosquelette d'actine 49
5.3.3.3.1.1 Les GTPases Rho 50
5.3.3.3.1.2 Les nucléateurs de l'actine 56
5.3.3.3.1.3 La dynamique du cytosquelette dans l'établissement des jonctions adhérentes 57

OBJECTIFS DE L'ETUDE 65

RESULTATS 69

1 COMPOSITION PROTEIQUE DE LA JONCTION ADHERENTE ENDOTHELIALE QUIESCENTE 69
1.1 Contexte expérimental 69
1.2 Article n°1 : étude du complexe protéique de la jonction adhérente 72
1.3 Discussion : Nouvelle conception de la jonction adhérente 73
2 ETUDES DU ROLE DES NOUVEAUX PARTENAIRES DE LA VE-CADHERINE IDENTIFIES PAR ANALYSE PROTEOMIQUE 76

2.1 L'annexine 2 76
2.1.1 Présentation des annexines 76
2.1.1.1 Oligomérisation 76
2.1.1.2 Trafic intracellulaire 77
2.1.1.3 Organisation membranaire et association à l'actine 78
2.1.2 Article n°2 : rôle d'un partenaire de la jonction : l'annexine2 82
2.1.3 Discussion et perspectives : Implication de l'annexine 2 dans la stabilisation des jonctions adhérentes 83
2.2 La moésine 85
2.2.1 Les protéines ERM 86
2.2.2 Résultats 87
2.2.3 Discussion et perspectives : Rôle potentiel de la moésine dans les jonctions adhérentes naissantes 89
3 DEVELOPPEMENT TECHNIQUE : RECHERCHE D'INHIBITEURS DE LA TRANSMIGRATION LEUCOCYTAIRE (CRIBLAGE A HAUT DEBIT) 90
3.1 Contexte scientifique 90
3.2 Principe du test 92
3.3 Matériel et méthodes 93
3.3.1 Fragments recombinants 93
3.3.2 Digestion des fragments recombinants par l'élastase et la cathepsine G 94
3.3.3 Anticorps 94
3.3.4 ELISA 95
3.4 Résultats 95
3.5 Poursuite du développement 97

DISCUSSION ET CONCLUSIONS GENERALES 101

1 CONNEXION AU CYTOSQUELETTE D'ACTINE 101
2 SIGNALISATION INTRACELLULAIRE ET STABILITE JONCTIONNELLE 103
3 POTENTIALITES DE L'OUTIL PROTEOMIQUE 104
4 INHIBITION DE LA TRANSMIGRATION LEUCOCYTAIRE 105

ANNEXES 107
1 ANNEXE 1 : *VE-CADHERIN AND NEUTROPHIL TRANSMIGRATION* 108

2 ANNEXE 2 : *FORMATION OF ENDOTHELIAL ADHERENS JUNCTIONS VISUALIZED IN REAL TIME* 110

BIBLIOGRAPHIE 111

LISTE DES ABREVIATIONS

ABD: *F-Actin Binding Domain*

APC: *Adenomatous Polyposis Coli*

Arp: *Actin-Related Protein*

ARPC: *Actin-Related Protein Complex*

ARVCF: *Armadillo-Related gene deleted in Velo-Cardio-Facial syndrome*

BHK: *Baby Hamster Kidney*

BTB/POZ: *Broad, complex, Tramtrak, Bric à brac/Pox virus and Zinc finger*

CBD: *Catenin-Binding Domain*

Cellules EL: cellules L exprimant stablement la E-cadhérine

Cellules ES: cellules Souches Embryonnaires

CHO: *Chinese Hamster Ovary*

Csk: *C-terminal Src kinase*

Cx: Connexine

DEP1: *Density Enhanced Phosphatase*

Dsh: *Dishevelled*

E-cadhérine: Epithelial-cadhérine

ELISA: *Enzyme Link ImmunoSorbent Assay*

ERK: *Extracellular Signal regulated Kinase*

ERM: Ezrine, Radixine, Moésine

FERM: *band Four point one ERM*

FH: *Formin Homology*

GDI: *GDP Dissociation Inhibitor*

GSK3β: Glycognène Synthase Kinase-3-β

HUVEC: *Human Umbilical Vein Endothelial Cell*

ICAM: *Ig like-Cell Adhesion Molecule*

Ig: Immunoglobuline

ITAM/ITIM: *Immunoregulatory Tyrosine-based Activation/Inhibition Domain*

JAM: *Junctional Adhesion Molecule*

JMD: *JuxtaMembrane Domain*

LDL: *Light Density Lipoprotein*

Lef: *Leucocyte-enhancing factor*

MAGUK: *Membrane-Associated GUanylate Kinase*

MAPK: *Mitogen-Activated Protein Kinase*

MDCK: *Madin-Darby Canine Kidney*

Module EC: module ExtraCellulaire

N-cadhérine: Neural -cadherin

NES: *Nuclear Export Signal*

NLS: *Nuclear Locating Signal*

PAF: *Platelet-Activating Factor*

PAS: Protéine A-Sépharose

PDZ: *Post-synaptic Disc-large Zonula*

PECAM-1: *Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule 1*

PI3: Phosphatidylinositol-3

PR: Polyarthrite Rhumatoïde

Rho-GEF: *Rho-GTPase Exchange Factor*

SH2: *Src-Homolgy*-2

SHC: *SH2-domain-Containing protein*

SHP: *Src Homology domain containing protein tyrosine Phosphatase*

Tcf: *T cell factor*

TGFβ: *Tumor Growth Factor β*

TNFα: *Tumor Necrosis Factor α*

VE-cadhérine: *Vascular Endothelial*-cadhérine

VE-EC1-4: fragment recombinant comprenant les modules EC1 à EC4 du domaine extracellulaire de la VE-cadhérine

VE-EC1-4-His: fragment VE-EC1-4 auquel une étiquette histidine a été ajoutée

VEGF: *Vascular Endothelium Growth Factor*

VEGFR: Récepteur au VEGF

WASP: *Wiscott-Aldrich Protein Syndrome*

WAVE: *WASP-family Verprolin-homologous protein*

WH2: *Wiscott-Aldrich syndrome protein-homology*

ZO-1: Zonula Occludens-1

ZONAB: *ZO-1-associated nucleic acid binding protein*

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Représentation schématique de la paroi d'un vaisseau sanguin p1

Figure 2 : Structure schématique d'une jonction communicante p5

Figure 3 : Diagramme de l'organisation moléculaire des jonctions endothéliales et de leur entrelacement p7

Figure 4 : Modèle de formation des jonctions adhérentes à partir de contacts initiés par le complexe nectine/afadine p12

Figure 5 : Structure de la protéine PECAM-1 p13

Figure 6 : Arbre phylogénique de la superfamille des cadhérines basé sur l'étude des similitudes de séquence du module EC1 p15

Figure 7 : Organisation modulaire des cadhérines classiques p16

Figure 8 : Architecture de l'hexamère de VE-cadhérine p20

Figure 9 : Représentation schématique de l'agencement de molécules de VE-cadhérine au sein d'une jonction adhérente p21

Figure 10 : Modèle d'association des cadhérines classiques p22

Figure 11 : Composition et organisation de la jonction adhérente inter-endothéliale traditionnellement décrite p26

Figure 12 : Hypothèse de mécanisme de diapédèse des neutrophiles p33

Figure 13 : Structure modulaire des principales caténines associées à la VE-cadhérine au sein des jonctions adhérentes p36

Figure 14 : Voie de signalisation Wnt p37

Figure 15 : Connexion de la VE-cadhérine aux filaments intermédiaires p38

Figure 16 : Modèles de régulation de la stabilisation des cadhérines à la surface cellulaire par p120 p41

Figure 17A : Représentation schématique de la structure multi-modulaire de IQGAP1 p45

Figure 17B : Implication de IQGAP1 dans la régulation des jonctions adhérentes p47

Figure 18 : Régulation des GTPases Rho p50

Figure 19 : Régulation de la dynamique du cytosquelette d'actine dans les protrusions membranaires par les Rho-GTPases p51

Figure 20 : Régulation de la contractilité actomyosine par Rho p52

Figure 21 : Voies de signalisation antagonistes engendrées par Rho p55

Figure 22 : Remodelage du cytosquelette d'actine au cours de l'augmentation de la densité des cellules HUVEC p62

Figure 23: Représentation schématique des jonctions adhérentes des cellules endothéliales sub-confluentes (A) et confluentes (B) p75

Figure 24 : Modèle d'interaction de l'annexine A2 avec les membranes p77

Figure 25 : Modèle d'agrégation des radeaux de cholestérol induit par l'annexine A2 p79

Figure 26 : Schéma hypothétique de l'organisation des complexes protéiques formant les jonctions adhérentes endothéliales p84

Figure 27 : Représentation schématique de la régulation de la moésine p86

Figure 28 : Représentation des moésines recombinantes disponibles au laboratoire p87

Figure 29 : L'association de la moésine à la membrane n'est affectée ni par un traitement cellulaire par la MβCD ni par la latrunculine B p88

Figure 30 : Localisation sub-cellulaire de la moésine et de la VE-cadhérine en fonction de la confluence cellulaire p89

Figure 31 : Principe du test ELISA p93

Figure 32 : Structure modulaire des fragments recombinants de la VE-cadhérine utilisés dans le dosage ELISA p94

Figure 33 : Mise au point du test ELISA pour le criblage de la chimiothèque p96

Figure 34 : Digestion du fragment Cad 1-4-His par l'élastase et la cathepsine G p96

Figure 35 : Test de perméabilité cellulaire p97

Figure 36 : Test fonctionnel des inhibiteurs sélectionnés dans la chimiothèque p98

INTRODUCTION

1. LE RESEAU VASCULAIRE

Les vaisseaux sanguins et lymphatiques constituent le premier organe qui se met en place durant l'embryogenèse et forment le plus grand réseau du corps humain **(Carmeliet, 2003)**. Il est organisé en un réseau branché et hiérarchisé dont le rôle est de distribuer l'oxygène, les nutriments, ainsi que les cellules immunitaires à tous les organes.

Schématiquement, la paroi des vaisseaux est constituée de trois couches différentes superposées (**figure 1**). La plus externe, l'adventis, contient des fibroblastes, une matrice extracellulaire et les lames élastiques. Puis vient la media, qui comprend les cellules musculaires lisses. Enfin, au contact du flux sanguin, se situe l'intima composée de cellules endothéliales. Plus le diamètre du vaisseau diminue, plus la composition de sa paroi se simplifie. Les vaisseaux les plus gros sont entourés de cellules musculaires lisses tandis que les autres vaisseaux disposent uniquement d'une paroi composée de péricytes, parfois épars, reposant sur la monocouche de cellules endothéliales.

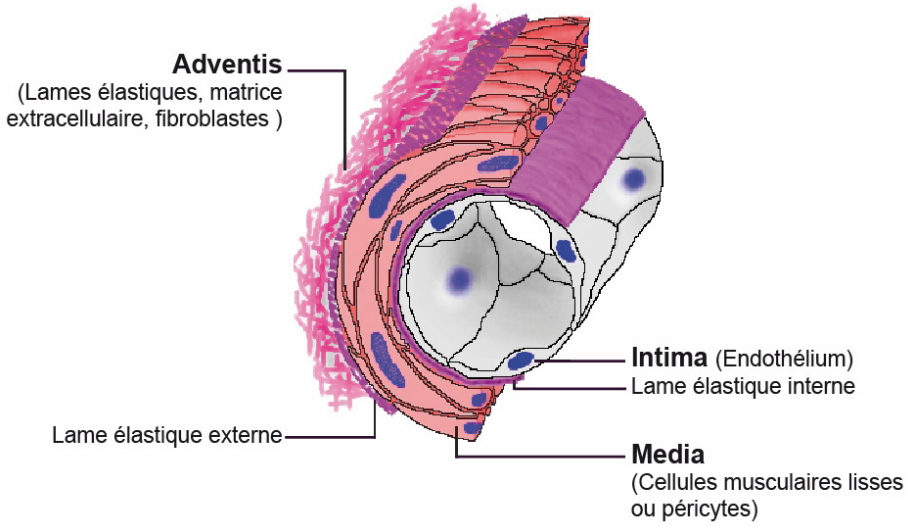


Figure 1 : Représentation schématique de la paroi d'un vaisseau sanguin. D'après **(Jain, 2003)** et http://www.ucc.ie/bluehist/CorePages/Vascular/Vascular.htm
Les vaisseaux de gros diamètre sont composés de trois couches (ou tuniques) successives. La plus interne, l'intima, est constituée de cellules endothéliales jointives qui forment l'endothélium vasculaire. Vient ensuite la média, dont les cellules musculaires lisses assurent essentiellement les fonctions vasomotrices du vaisseau. La couche la plus externe, l'adventis, est constituée de tissu conjonctif et de fibroblastes. Les vaisseaux de plus faible calibre, comme les capillaires, sont composés uniquement de cellules endothéliales, et sont le plus souvent recouverts de péricytes épars.

2. L'ENDOTHELIUM VASCULAIRE

L'endothélium vasculaire est la monocouche de cellules endothéliales jointives qui tapisse la paroi interne des vaisseaux sanguins (**figure 1**) **(Breviario et al., 1995; Dejana, 2004; Hermant, 2006; Ilan and Madri, 2003; Wallez et al., 2006b)**. Les cellules endothéliales sont en contact direct avec le flux sanguin par leur pôle apical (ou luminal), et leur pôle basal (ou abluminal) repose sur la paroi vasculaire. L'endothélium constitue entre le sang et les tissus sous-jacents une barrière dont la perméabilité est finement régulée. Il contribue significativement à de nombreuses fonctions comme la régulation de la pression sanguine, l'hémostase, les échanges d'oxygène, de nutriments et de métabolites, et la transmigration de leucocytes.

2.1 La vasculogenèse

Durant le développement embryonnaire, un réseau vasculaire primitif se met en place grâce au phénomène de vasculogenèse **(Carmeliet, 2003; Jain, 2003)**. Il s'agit de la formation des premiers vaisseaux à partir de cellules précurseurs endothéliaux (ou angioblastes) qui se différencieront en cellules endothéliales. Ce phénomène intervient précocement et est limité dans le temps au cours du développement embryonnaire **(Ferguson et al., 2005)**. Deux types de vasculogenèse se mettent en place durant cette période. L'une, qualifiée de vasculogenèse extra-embryonnaire, correspond à la mise en place du réseau vasculaire du sac vitellin. La seconde, la vasculogenèse intra-embryonnaire, débute par l'installation d'une aorte et d'un cœur primitifs (le tube endocardial). Par la suite, le cœur en croissance va se doter d'un réseau vasculaire coronaire. Le devenir des vaisseaux (artères, veines, et vaisseaux lymphatiques) est en partie déterminé génétiquement, très tôt dans le développement. Ce réseau immature sera ensuite stabilisé par le recrutement de cellules formant la paroi vasculaire et par la sécrétion d'une matrice extracellulaire **(Jain, 2003)**.

Le développement du système vasculaire embryonnaire est régulé par des facteurs solubles, dont un facteur de croissance spécifique de l'endothélium vasculaire, le VEGF (Vascular Endothelium Growth Factor) **(Ferguson et al., 2005)**. Ce facteur de croissance agit sur les cellules exprimant ses récepteurs de type I (VEGFR1 ou Flt1) et de type II (VEGFR2 ou Flk1, voir paragraphe 5.1.5). Le VEGF s'avère primordial pour le développement de l'embryon, et son absence est létale, comme l'atteste le modèle de souris transgénique pour lequel la mort intervient précocement (entre E11 et E12) dans le développement alors qu'un seul allèle codant cette cytokine ne manque **(Byrne et al., 2005; Ferrara et al., 1996)**.

En plus des récepteurs au VEGF, la VE-cadhérine (Vascular Endothelial-cadhérine, voir paragraphe 4.2.1) et PECAM-1 (Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule 1 ou CD31, voir paragraphe 3.5.2) sont deux molécules essentielles à la formation, au remodelage et à l'homéostasie de l'endothélium. Elles sont communément utilisées comme marqueurs de la différenciation endothéliale au cours du développement.

2.2 L'angiogenèse

L'angiogenèse définit le processus de formation de nouveaux vaisseaux sanguins par extension ou remodelage des vaisseaux préexistants **(Byrne et al., 2005; Ferguson et al., 2005)**. Ce phénomène intervient au cours du développement embryonnaire et chez l'adulte dans deux cas physiologiques précis : la réparation tissulaire et le cycle menstruel. L'angiogenèse permet l'obtention d'un réseau fonctionnel optimal, et parfois spécialisé, comme c'est le cas pour l'endothélium fenêtré.

L'angiogenèse est également associée à de nombreuses pathologies telles que la polyarthrite rhumatoïde, la rétinopathie diabétique, ou la progression tumorale **(Norrby, 2006)**. Dans les cas de tumeurs solides, le VEGF est surexprimé et la néo-angiogenèse tumorale qui en résulte produit des vaisseaux tortueux, dilatés, perméables, anormaux tant sur le plan structural que fonctionnel **(Jain, 2005)**. Afin de pouvoir à terme lutter contre ces pathologies, il est donc d'un grand intérêt de comprendre les mécanismes qui régissent l'angiogenèse, tant physiologique que pathologique.

3. LES JONCTIONS ENDOTHELIALES

Les jonctions intercellulaires constituent les points d'ancrage des cellules endothéliales entre elles **(Broman et al., 2006; Carmeliet et al., 1999; Dejana, 2004; Esser et al., 1998; Gavard and Gutkind, 2006; Grazia Lampugnani et al., 2003)**. Ces jonctions qui maintiennent jointives les cellules assurent la fonction de barrière de l'endothélium. Pourtant aujourd'hui, il est admis que les jonctions n'ont pas uniquement un rôle architectural. Elles constituent également des structures permettant la transmission de signaux qui régulent des phénomènes tels que la perméabilité vasculaire, l'inhibition de contact ou l'apoptose. Les jonctions sont impliquées dans la signalisation intracellulaire grâce aux interactions de leurs composantes avec des facteurs de transcription, des récepteurs de facteurs de croissance, ou des protéines de signalisation.

Il existe quatre types de jonctions endothéliales : les complexus adhaerentes, les jonctions communicantes, les jonctions serrées, et les jonctions adhérentes, toutes décrites ci-après.

3.1 Les complexus adhaerentes

La majorité des endothélia ne présente pas de jonctions desmosomales aussi bien définies que celles des épithélia. Cependant, certains tissus tels que les vaisseaux lymphatiques et les micro-vaisseaux disposent de structures apparentées aux desmosomes, les complexus adhaerentes **(Dejana, 2004; Zhou et al., 2004)**.

La VE-cadhérine des complexus adhaerentes est associée de façon indirecte aux filaments intermédiaires par le biais de la desmoplakine, (voir paragraphe 5.2.2) **(Calkins et al., 2003; Cattelino et al., 2003; Gallicano et al., 2001; Kowalczyk et al., 1998; Leung et al., 2001; Valiron et al., 1996; Venkiteswaran et al., 2002)**. Bien qu'encore très peu étudiées, ces jonctions semblent être des acteurs importants dans la vasculogenèse embryonnaire. En effet, des embryons murins dépourvus de desmoplakine n'élaborent que des structures capillaires qui s'avèrent perméables et sujettes à la rupture, ce qui limite rapidement le développement de ces animaux **(Gallicano et al., 2001)**. De plus, *in vitro*, la présence de desmoplakine dans des cellules endothéliales humaines microvasculaires est absolument nécessaire à la formation de tubes capillaires **(Zhou et al., 2004)**. Enfin, ces jonctions, de par leur liaison aux filaments intermédiaires, constitueraient des acteurs majeurs dans la régulation de la perméabilité vasculaire, la vasculogenèse et/ou l'angiogenèse.

3.2 Les jonctions communicantes

Les jonctions communicantes, comme leur nom l'indique, autorisent une communication directe entre cellules adjacentes en formant des conduits au travers desquels peut avoir lieu l'échange de métabolites, d'ions et de petites molécules de signalisation de masse inférieure à 1 kDa **(Sohl and Willecke, 2004)**. Ces structures sont présentes dans toutes les cellules de tous les vaisseaux sanguins. Elles sont abondantes et intimement associées aux jonctions serrées, formant un réseau qui interconnecte les cellules **(Figueroa et al., 2006; Saez et al., 2003)**. La protéine de base des jonctions communicantes est la connexine (Cx). Elle présente quatre domaines transmembranaires, deux boucles extracellulaires, une boucle intracellulaire, et ses extrémités N- et C-terminales sont cytoplasmiques **(Figueroa et al., 2006; Saez et al., 2003)** (**figure 2A**). Six sous-unités Cx

s'assemblent pour former dans la membrane plasmique un hemi-canal, nommé connexon, qui s'associe au connexon d'une cellule adjacente, formant ainsi une jonction communicante complète **(Sohl and Willecke, 2004)** (**figure 2B** et **2C**). Dans le système vasculaire, il existe quatre Cx différentes (Cx37, Cx40, Cx43 et Cx45). La Cx40 est la protéine majeure des jonctions communicantes du système vasculaire adulte alors que la Cx37 est quasiment exclusivement exprimée par les cellules endothéliales **(Figueroa et al., 2006; Saez et al., 2003)**. Chaque hémi-canal peut être formé d'une combinaison de ces quatre Cx, mais leurs niveaux d'expression varient en fonction de la localisation et de la taille du vaisseau **(Figueroa et al., 2006)**.

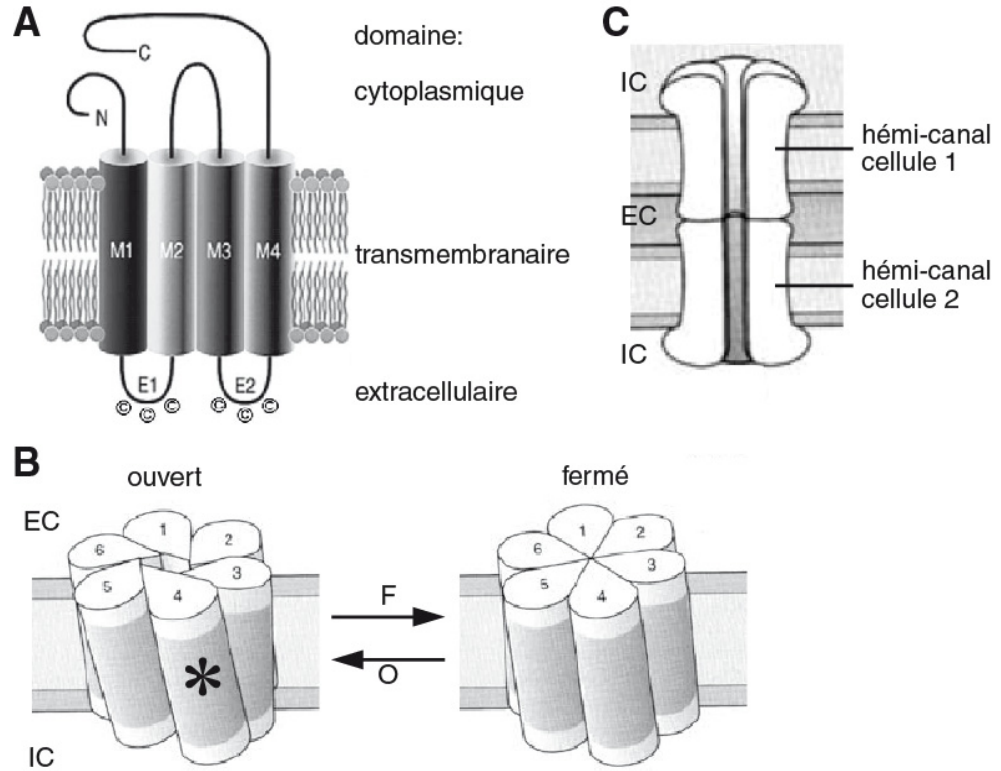


Figure 2 : Structure schématique d'une jonction communicante. D'après **(Saez et al., 2003; Sohl and Willecke, 2004)**
A : Modèle topologique d'une connexine, sous-unité protéique de base d'une jonction communicante. Les cylindres notés M1 à M4 représentent les domaines transmembranaires. E1 et E2 indiquent les boucles extracellulaires.
B : Représentation des deux états théoriques ouvert (O) ou fermé (F) d'un hémi-canal. Six Cx sont enchâssées dans la membrane plasmique pour former un hémi-canal. L'astérisque désigne une sous-unité Cx. (EC : extracellulaire ; IC : intracellulaire)
C : Schéma en coupe d'une jonction communicante complète. Deux cellules, 1 et 2, ont connecté leur hémi-canal par les interactions entre leurs boucles extracellulaires afin de former une jonction complète.

La formation des jonctions communicantes et celle des jonctions adhérentes semblent être dépendantes **(Saez et al., 2003; Wei et al., 2004)**. En effet, l'inhibition de la fonction des

cadhérines aux contacts intercellulaires détruit les jonctions communicantes et réciproquement, le blocage de la Cx43, chez le rat, perturbe la formation des jonctions adhérentes. De plus, la Cx43 est capable d'interagir avec la β-caténine, l'α-caténine et p120, des composants majeurs des jonctions adhérentes (voir chapitre 5). Les jonctions communicantes sont également en relation avec les jonctions serrées par leur interaction avec la protéine Zonula Occludens-1 (ZO-1, voir paragraphe 3.3). De la même façon, la formation des jonctions serrées est un prérequis à l'assemblage des jonctions communicantes. Enfin, les Cx contractent des interactions avec les microtubules et des protéines liant l'actine, comme l'α-actinine. De ce fait, il n'est pas étonnant que des souris dépourvues du gène codant la Cx45 meurent durant leur développement embryonnaire **(Saez et al., 2003)**. De même, le double mutant Cx37(-/-)/Cx40(-/-) meurent avant terme de graves malformations vasculaires **(Sohl and Willecke, 2004)**. L'ensemble de ces données suggère que les jonctions communicantes, grâce à leur triple interaction avec les jonctions serrées, les jonctions adhérentes et le cytosquelette, soient des carrefours de voies de signalisation qui régulent l'adhérence cellulaire et la morphologie vasculaire **(Wei et al., 2004)**.

3.3 Les jonctions serrées (zonula occludens)

Les jonctions serrées sont présentes aussi bien dans les épithélia que dans les endothélia. Elles constituent des structures jonctionnelles impliquées dans la régulation de la perméabilité. Elles délimitent le domaine apical du domaine basolatéral membranaire, bien que cette distinction soit mal aisée à établir dans l'endothélium vasculaire, étant donnée la proximité des protéines impliquées à la fois dans l'architecture des jonctions adhérentes et serrées. En effet, les structures jonctionnelles, notamment les jonctions serrées et adhérentes, sont mal définies dans l'endothélium. Leur localisation n'est pas aussi précise que dans l'épithélium, et plus le diamètre de l'arbre vasculaire diminue, moins leur organisation est conservée. De plus, il est manifeste que des protéines, historiquement associées à un type de jonctions, telles ZO-1 (voir ci-après) pour les jonctions serrées ou les caténines (voir paragraphe 5.2) pour les jonctions adhérentes, sont en réalité capables d'interagir avec d'autres structures jonctionnelles. Un aperçu de cet entrelacement de protéines est représenté dans la **figure 3**. La composition de chaque structure jonctionnelle sera détaillée ci-après.

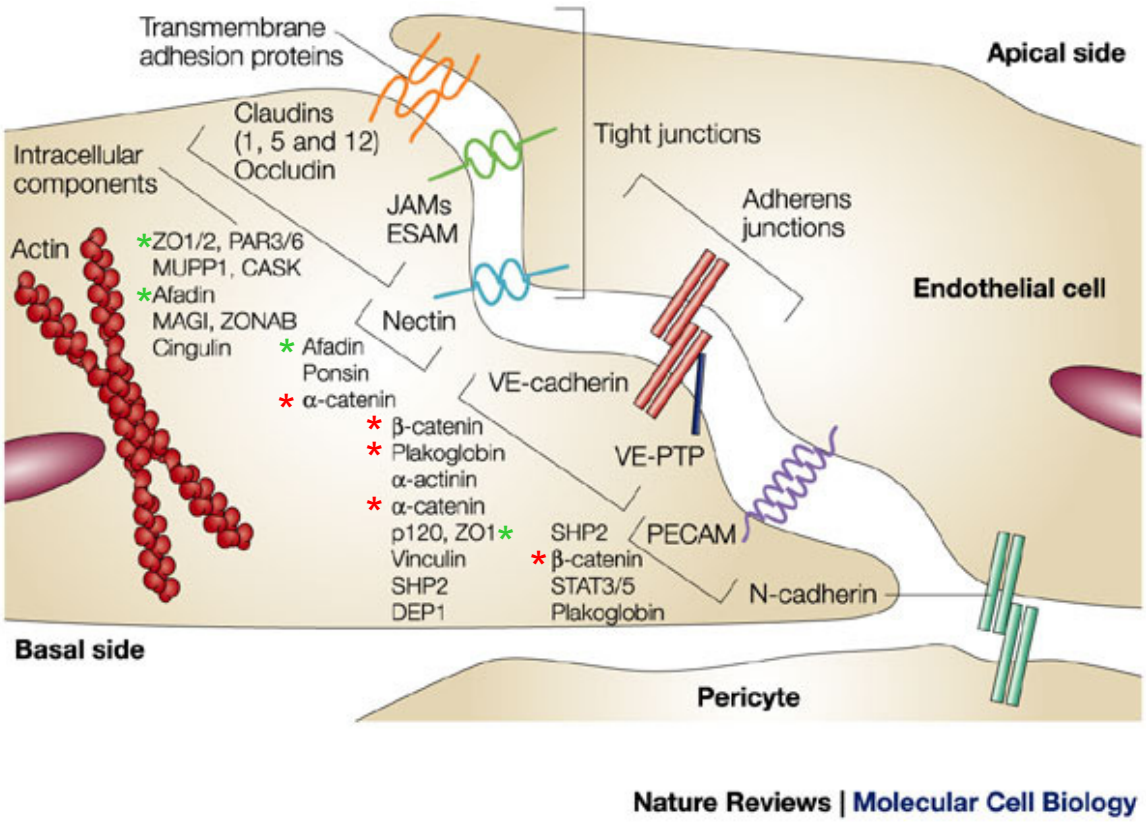


Figure 3 : Diagramme de l'organisation moléculaire des jonctions endothéliales et de leur entrelacement. D'après **(Dejana, 2004)**.
Ce schéma illustre la difficulté à situer spatialement les différentes structures adhésives (jonctions serrées, jonctions adhérentes, le couple nectine/afadine et PECAM) rencontrées dans l'endothélium vasculaire. Chacune comporte des protéines communes à une ou plusieurs autres jonctions. Les astérisques rouges marquent les protéines traditionnellement associées aux jonctions adhérentes et les astérisques vertes, celles associées aux jonctions serrées.

3.3.1 Les protéines majeures constitutives des jonctions serrées

Il existe trois types de protéines transmembranaires qui participent à ce type de jonctions : l'occludine, les claudines, et les molécules d'adhérence jonctionnelle (JAM, Junctional Adhesion Molecules).

L'occludine est une protéine membranaire dont la structure présente quatre domaines transmembranaires et deux boucles extracellulaires. Ses extrémités C- et N-terminales sont cytosoliques **(Bazzoni and Dejana, 2004)**. Cette protéine présente également une forme nommée occludine 1B résultant d'un épissage alternatif. Elle joue certainement un rôle dans l'adhérence cellulaire, uniquement si elle est associée à la protéine cytoplasmique ZO-1, le premier constituant des jonctions serrées historiquement identifié.

La famille des claudines comprend plus de vingt membres. La disposition dans la membrane plasmique des claudines est identique à celle de l'occludine, bien qu'il n'y ait aucune similarité de séquences entre ces deux familles protéiques. Seule la claudine 5 a une distribution exclusivement restreinte aux cellules endothéliales.

Les JAM constituent une superfamille de récepteurs membranaires apparentés aux immunoglobulines (Ig) **(Hermant, 2006)**. Leur structure présente deux domaines Ig extracellulaires, un domaine transmembranaire, et une courte queue cytoplasmique. L'expression de JAM B est limitée à quelques sous-populations endothéliales, comme les veinules endothéliales hautes ou les cellules lymphatiques. JAM A, quant à elle, est exprimée par les plaquettes, les cellules endothéliales et épithéliales. Les JAM peuvent contracter des interactions homophiliques, participant donc à l'adhérence des cellules endothéliales. Elles peuvent cependant établir des interactions hétérophiliques en s'associant avec des intégrines, telles LFA-1 pour JAM A ou Mac-1 pour JAM B. Ces interactions laissent à penser que non seulement les JAM participent aux jonctions serrées, mais sont également impliquées dans les contacts entre cellules endothéliales et leucocytes qui ont lieu lors de la transmigration leucocytaire.

Ces protéines transmembranaires sont associées à des protéines cytosoliques pour former les jonctions serrées. La principale protéine est ZO-1. Il s'agit d'une protéine de la famille des guanylate cyclases associées à la membrane (MAGUK, Membrane-Associated GUanylate Kinase) **(Bazzoni and Dejana, 2004; Dejana, 2004)**. Dans les épithélia et les endothélia présentant des jonctions serrées organisées et distinctes, cette protéine est clairement localisée dans ces structures (**figure 3**). Mais lorsque les jonctions ne sont pas clairement définies, comme c'est le cas dans les vaisseaux de faible diamètre, on retrouve ZO-1 aussi bien dans les jonctions serrées que dans les jonctions adhérentes. La famille des MAGUK comprend également deux autres membres, ZO-2 et ZO-3, qui présentent une homologie de séquence avec ZO-1. Comme elle, ZO-2 peut parfois être localisée aux jonctions adhérentes.

Bien que les différentes protéines membranaires n'interagissent pas directement entre elles, elles sont pourtant à l'origine de nombreuses interactions moléculaires. L'occludine et les claudines interagissent directement via leur domaine C-terminal avec les protéines ZO **(Bazzoni and Dejana, 2004; Dejana, 2004)**. JAM A se lie aux protéines ayant un domaine PDZ (Post-synaptic Disc-large Zonula) de type II, ce qui est le cas pour ZO-1 et les afadines (voir paragraphe 3.5.1). Ces deux protéines se lient directement ou indirectement au cytosquelette d'actine.

Les protéines de la famille MAGUK peuvent interagir entre elles et s'associer à l'actine corticale. ZO-1 en particulier se lie directement à l'actine, mais également à des protéines liant l'actine comme l'α-caténine, α-actinine-4, la cortactine, et la vinculine. Ces protéines auraient pour rôle d'associer les protéines membranaires des jonctions serrées à l'actine corticale.

Les mécanismes d'assemblage des jonctions serrées sont encore mal définis. Le modèle le plus communément admis suggère que le complexe formant la jonction serrée se constitue dans le cytoplasme, avant d'être exporté à la membrane **(Behrens et al., 1985)**. De plus, il existe une idée émergente selon laquelle les jonctions adhérentes intactes seraient un prérequis à la formation des jonctions serrées. Si les jonctions adhérentes de cellules épithéliales sont détruites, les jonctions serrées se désassemblent en conséquence. Les protéines de la famille des nectines (voir paragraphe 3.5.1) constitueraient le lien permettant la formation des jonctions serrées à partir des jonctions adhérentes. En outre, ZO-1 s'associe avec la β-caténine dans les premières étapes de la formation des jonctions serrées **(Rajasekaran et al., 1996)**.

3.3.2 Les fonctions des jonctions serrées

La notion de jonctions étanches pour qualifier les jonctions serrées est largement galvaudée. En effet, le passage au travers de l'endothélium vasculaire de solutés et de cellules nécessite une ouverture transitoire de la voie para-cellulaire et donc des jonctions serrées et adhérentes **(Bazzoni and Dejana, 2004)**. De plus, il semble difficile de distinguer clairement la localisation des jonctions adhérentes de celle des jonctions serrées au sein des contacts intercellulaires, ce qui complique l'attribution d'un rôle exact à l'une ou l'autre de ces structures dans la régulation des fonctions de l'endothélium.

Les jonctions serrées maintiennent par ailleurs une polarisation cellulaire, en délimitant le domaine apical du domaine basolatéral des cellules. Cette séparation limiterait la diffusion latérale de protéines membranaires particulières. Ainsi ces jonctions maintiennent la distribution des canaux sodiques dans le domaine apical et celle des pompes à sodium et potassium dépendantes de l'ATP dans le domaine basolatéral.

Enfin, les jonctions serrées pourraient jouer un rôle dans l'homéostasie cellulaire en inhibant la prolifération, *via* le facteur de transcription associé à ZO-1, ZONAB (ZO-1-associated nucleic acid binding protein). En effet, en s'associant aux complexes des jonctions serrées des cellules confluentes, ZONAB n'est plus actif **(Balda et al., 2003; Matter and**

Balda, 2003). En temps normal, il promeut la prolifération cellulaire en interagissant notamment avec la kinase dépendante de la cycline 4.

Lee et coll. ont émis l'hypothèse que la formation des jonctions serrées résulterait de la fusion des membranes de deux cellules adjacentes **(Lee et al., 2004)**. Ces auteurs rapportent que dans les cellules épithéliales rénales canines (MDCK, Madin-Darby Canine Kidney) à confluence, les protéines des jonctions serrées, ZO-1, occudine et claudine sont co-localisées au niveau des jonctions intercellulaires avec l'annexine 2, une protéine capable d'induire la fusion des membranes **(Lambert et al., 1997)**. C'est précisément cette propriété et sa présence au niveau des contacts intercellulaires qui a permis à cette équipe d'émettre l'hypothèse selon laquelle l'annexine 2 serait impliquée dans la formation des jonctions serrées en établissant un pont symétrique entre les deux feuillets externes de cellules adjacentes **(Lee et al., 2004)**.

3.4 Les jonctions adhérentes

Les jonctions adhérentes sont présentes dans tout le système vasculaire **(Dejana, 2004)**. La protéine majeure de ces jonctions est la VE-cadhérine (voir paragraphe 4.2.1). En association avec ses partenaires cytoplasmiques qui la relient aux différents types de cytosquelette, elle élabore des jonctions solides et cohésives. Leur ouverture finement régulée permet à l'endothélium d'assurer sa fonction de barrière semi-perméable. De plus, les jonctions adhérentes fonctionnent comme des senseurs moléculaires qui, en percevant les signaux extracellulaires et en les transmettant, permettent l'adaptation de la cellule à son micro-environnement **(Perez-Moreno and Fuchs, 2006)**.

Les jonctions adhérentes exercent un rôle majeur dans de nombreux phénomènes comme la morphogenèse embryonnaire du système vasculaire, le maintien de l'intégrité et la réparation tissulaires chez l'adulte **(Gumbiner, 2005)**. Ces jonctions font l'objet d'une présentation détaillée dans le chapitre 5.

3.5 Les autres systèmes d'adhérence

En plus des quatre types de jonctions citées précédemment, il existe d'autres complexes d'adhérence dans l'endothélium vasculaire. Elles sont elles aussi constituées de protéines transmembranaires, associées à des protéines cytosoliques, qui interagissent avec les composantes des autres structures. L'existence d'une interaction ainsi qu'une régulation réciproque entre toutes ces structures adhésives est envisageable.

3.5.1 Le système nectine/afadine

Le complexe jonctionnel nectine/afadine a été très peu étudié dans les endothélia. Ce qui est rapporté dans ce paragraphe a été essentiellement acquis par l'étude biochimique de systèmes chimériques, acellulaires ou épithéliaux.

La protéine nectine est une molécule d'adhérence cellulaire apparentée aux Ig (ICAM, Ig like-Cell Adhesion Molecule), dont la partie extracellulaire possède trois domaines Ig **(Takai and Nakanishi, 2003)**. Le reste de la molécule comprend un domaine transmembranaire et une partie cytoplasmique capable de lier l'afadine, son ligand intracellulaire. La famille compte quatre membres, nommés nectines et numérotés de 1 à 4. A l'exception de la nectine-4, chaque protéine possède deux ou trois variants issus d'épissages alternatifs. Chaque membre de la famille est capable de former des homodimères, mais pas d'hétérodimères, sur une même cellule, en *cis*. Les nectines 3 et 4 peuvent s'associer en hétérodimères *trans* avec les nectines portées par les cellules adjacentes **(Lopez et al., 1998)**.

Le couple nectine/afadine est assimilé à une composante des jonctions adhérentes, pourtant, cette vision restrictive semble erronée puisque le couple nectine/afadine serait également impliqué dans la formation des jonctions serrées **(Takai and Nakanishi, 2003)**. Dans les jonctions adhérentes épithéliales, les complexes nectine/afadine sont physiquement et fonctionnellement associés au complexe formé par la cadhérine épithéliale (E-cadhérine) et les caténines. La E-cadhérine est recrutée au niveau des contacts intercellulaires formés par les nectines, ce qui suggère une coopération entre les deux systèmes pour initier la formation de jonctions adhérentes. Les contacts intercellulaires induits par le système nectine/afadine pourraient donc être un prérequis à l'initiation de la formation des jonctions adhérentes et serrées plus élaborées. Aux tous premiers stades d'un contact entre deux cellules, les protrusions membranaires présentent à leur surface la E-cadhérine, l'occludine, la claudine, les JAM et la nectine. Les protéines en *trans* se rencontreraient et formeraient des homodimères. Les nectines ayant une cinétique de dimérisation plus rapide que les autres protéines, elles élaboreraient donc les contacts initiaux, permettrant ainsi le rapprochement des membranes et la formation des autres jonctions. La nectine-2 est à même de recruter l'α-caténine ainsi que ZO-1, indépendamment l'une de l'autre, permettant sans doute l'initiation des jonctions serrées et/ou adhérentes **(Yokoyama et al., 2001)**. En outre, le recrutement de JAM A au niveau des jonctions serrées pourrait requérir la présence des jonctions à base de nectine au préalable **(Fukuhara et al., 2002)**. Les nectines et les E-cadhérines formeraient des « micro-agrégats », qui s'associeraient le long de la membrane, pour étendre les jonctions à

toute la zone de contact intercellulaire (**figure 4**) **(Takai and Nakanishi, 2003)**. On ne peut cependant pas pour autant exclure que ces interactions initiales engendrent une signalisation intracellulaire permettant également la mise en place et la maturation des autres jonctions.

L'afadine, par l'intermédiaire de la ponsine, est capable d'interagir avec les filaments d'actine, contrairement à la s-afadin, sa forme additionnelle issue d'un épissage alternatif **(Dejana, 2004; Takai and Nakanishi, 2003)**. L'afadine ne peut cependant pas se lier aux extrémités des filaments d'actine, ce qui suggère qu'elle établirait spécifiquement une liaison avec le réseau cortical d'actine plutôt qu'avec les fibres de stress.

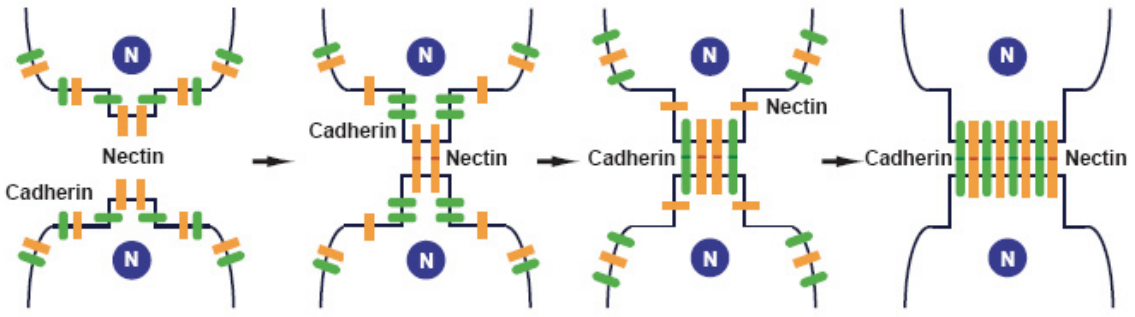


Figure 4 : Modèle de formation des jonctions adhérentes à partir de contacts initiés par le complexe nectine/afadine. D'après **(Takai and Nakanishi, 2003)**
Lorsque deux cellules se rencontrent, les cadhérines et les nectines portées par leurs protrusions se dimérisent en *trans* et forment de « micro-agrégats » au niveau des contacts intercellulaires. Dans un premier temps se forment majoritairement des agrégats à base de nectine, qui recrutent les cadhérines. Peu à peu, les contacts primitifs se développent le long de l'interface cellulaire pour conduire à la formation des jonctions adhérentes. (N : noyau).

3.5.2 Le système PECAM-1/β-caténine/SHP2

PECAM-1 est une protéine de 130 kDa qui appartient à la superfamille des Ig (**figure 5**). Elle s'exprime très précocement durant le développement embryonnaire, et se maintient jusqu'à l'âge adulte dans toutes les cellules endothéliales **(Ilan and Madri, 2003)**. Son expression est restreinte aux cellules du système vasculaire, ainsi qu'aux plaquettes, monocytes, neutrophiles, et à certains lymphocytes T. La phosphorylation du motif ITIM crée un site spécifique de liaison aux protéines tyrosine phosphatases contenant un domaine SH2 (Src-homolgy-2). Parmi celles-ci, on trouve SHP2 (SH-2-domain-containing protein tyrosine phosphatase 2) (**figure 5**).

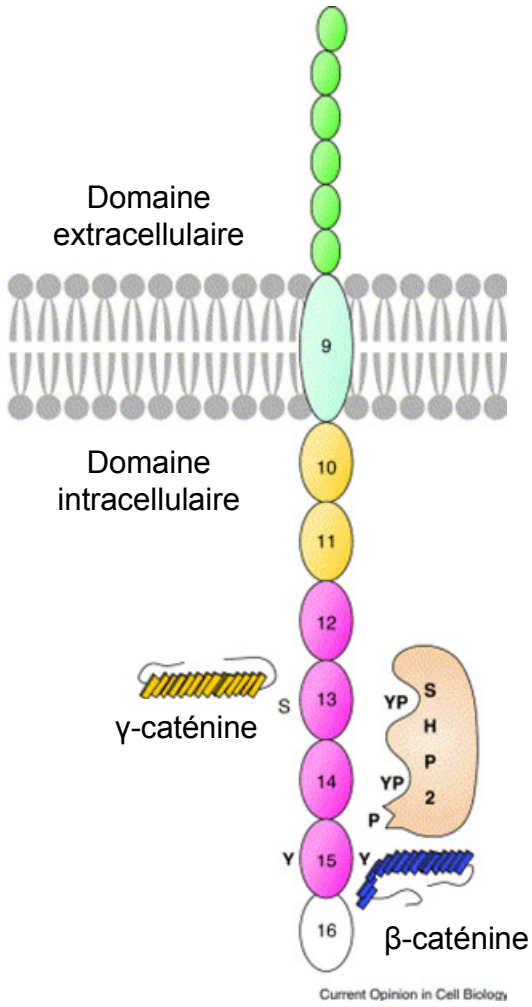


Figure 5 : Structure de la protéine PECAM-1. D'après **(Ilan and Madri, 2003; Newman, 1999)**
Le domaine extracellulaire de PECAM-1 (représenté en vert) est composé d'une répétition de six domaines Ig.
Le domaine cytoplasmique comprend généralement sept motifs (numérotés ici de 10 à 16) qui correspondent aux différents exons du gène. Les exons 13 et 14 codent le motif ITIM, qui, une fois phosphorylé sur ses résidus tyrosyles, interagit avec la phosphatase SHP2. L'exon 15 code le site de liaison à la β-caténine phosphorylée, et l'exon 13, celui responsable de la liaison à la γ-caténine régie par la phosphorylation du résidu séryle S674.

PECAM-1 se lie aux β- et γ-caténines associées à la VE-cadhérine dans les jonctions adhérentes (voir paragraphes 5.2.1 et 5.2.2 respectivement et **figure 5**). La β-caténine, phosphorylée sur tyrosine, se lie à PECAM-1, non phosphorylée **(Biswas et al., 2005)**. Ainsi, PECAM-1 constituerait un réservoir de β-caténine phosphorylée à la membrane plasmique, ce qui éviterait soit sa dégradation par le protéasome, soit son transport dans le noyau, où elle exercerait sa fonction de facteur de transcription (voir paragraphe 5.2.1) **(Reya and Clevers, 2005)**. Dans le même temps, SHP2, incluse dans le complexe ternaire PECAM-1/SHP2/β-caténine, induit la déphosphorylation de la caténine, la rendant ainsi de nouveau disponible pour l'établissement de jonctions adhérentes **(Ilan and Madri, 2003)**. Outre son rôle de séquestration de la β-caténine, PECAM-1 est également indirectement impliquée dans la régulation de la perméabilité et de l'intégrité de l'endothélium vasculaire par ses interactions avec cette caténine.

L'intérêt de la liaison de PECAM-1 à la γ-caténine est moins évident. Il semble que la γ-caténine soit un lien entre PECAM-1 et les filaments intermédiaires de vimentine, grâce à

son interaction avec la desmoplakine **(Biswas et al., 2005; Ilan et al., 2000)**. Dans ce cas également, PECAM-1, en se liant à la γ-caténine, éviterait son transfert dans le noyau, où cette protéine exerce le rôle de facteur de transcription **(Bazzoni and Dejana, 2004)**.

4 LES CADHERINES DE L'ENDOTHELIUM VASCULAIRE

4.1 Classification des cadhérines

Les cadhérines sont des molécules d'adhérence, conservées au cours de l'évolution et présentes chez les vertébrés comme chez les invertébrés **(Gumbiner, 2005; Halbleib and Nelson, 2006; Nollet et al., 2000)**. La superfamille des cadhérines peut être divisée en cinq sous-familles : les cadhérines classiques de types I ou II, les protocadhérines, les cadhérines desmosomales, les cadhérines atypiques, et les protéines de signalisation apparentées aux cadhérines. Cette classification repose sur une étude des séquences et de l'organisation des gènes des différentes cadhérines considérées. L'arbre phylogénétique ainsi établi est présenté dans la **figure 6**.

4.1.1 Les cadhérines classiques

Elles sont à l'origine d'interactions homophiliques dépendantes du calcium, et sont concentrées aux jonctions adhérentes dans la plupart des cas **(Gumbiner, 2005; Halbleib and Nelson, 2006)**.

Les représentants des cadhérines de type I les plus étudiés sont la E-cadhérine et la N-cadhérine (pour cette dernière, voir le paragraphe 4.2.2) **(Nollet et al., 2000)**. Il s'agit de glycoprotéines transmembranaires, dont le domaine extracellulaire, comprenant cinq modules extracellulaires (EC), est responsable de la fonction adhésive (**figure 7**). Les quatre premiers modules EC1 à EC4 sont homologues et possèdent des sites de fixation des ions calcium. L'association des ions calcium structure le domaine extracellulaire des cadhérines, les rendant résistantes à la protéolyse. Le module EC5, proche de la membrane, diffère des autres modules puisqu'il dispose de quatre résidus cystéyles à l'origine de la formation de deux ponts disulfures. Les cadhérines de type I comportent au sein de leur module EC1 un tripeptide conservé His-Ala-Val (HAV) qui est une séquence qui a longtemps été considérée comme une zone impliquée dans l'adhérence cellulaire. De plus, ce module EC1 possède un résidu tryptophane (W2) qui va pourvoir se placer dans une poche hydrophobe portée par le module EC1 de la molécule de cadhérine adjacente, créant une interaction homophilique

(Patel et al., 2006; Shapiro et al., 1995). Ces cadhérines n'ont qu'un seul domaine transmembranaire et un court domaine cytoplasmique qui permet l'interaction avec des partenaires cytosoliques, comme les caténines.

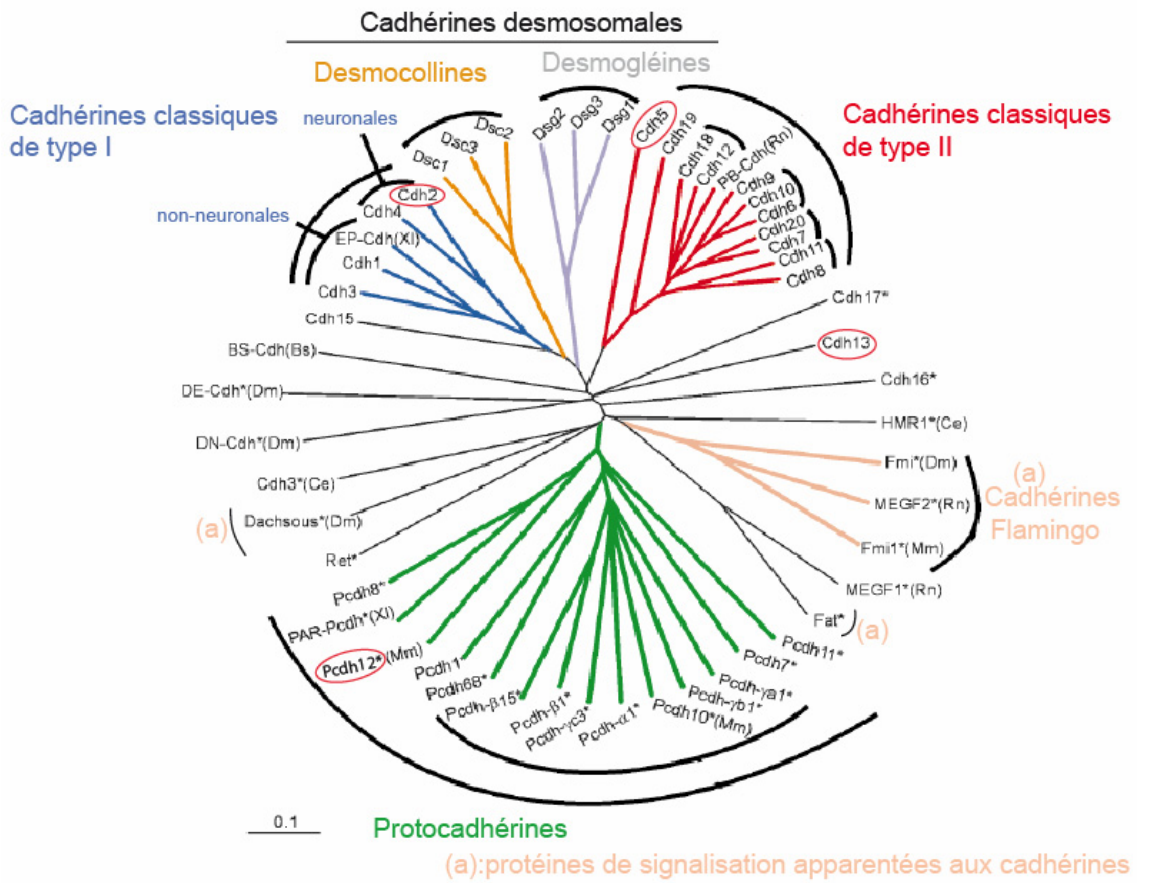


Figure 6 : Arbre phylogénétique de la superfamille des cadhérines basé sur l'étude des similitudes de séquence du module EC1. D'après **(Nollet et al., 2000)**.
Les membres de la superfamille des cadhérines exprimés par les cellules endothéliales (Cdh5 : VE-cadhérine ; Cdh 13 : T-cadhérine ; Pcdh12 : protocadhérine 12 ; Cdh2 : N-cadhérine) sont encerclés en rouge. Les cadhérines contenant plus de 5 modules EC sont marquées d'un astérisque. L'échelle représente le taux de substitution, à savoir un amino-acide tous les dix résidus. Toutes les séquences sont issues du génome humain, sauf indication contraire (Bs : *Botryllus schlosseri* ; Ce : *Caenorhabditis elegans* ; Dm, *Drosophila melanogaster* ; Mm : *Mus musculus* ; Rn : *Rattus novegicus* ; XI : *Xenopus laevis*).

L'absence du motif tripeptide HAV, ainsi qu'une faible similarité de séquence (de l'ordre de 40 à 50%) avec les cadhérines de type I définissent les cadhérines de type II **(Gumbiner, 2005; Halbleib and Nelson, 2006; Nollet et al., 2000)**. Les cadhérines de type II possèdent un résidu tryptophane supplémentaire (W4) en plus du résidu W2, ce qui engendre des interactions particulières **(Patel et al., 2006)**.Cependant, ces deux types de cadhérines présentent une organisation générale similaire. Bien qu'appartenant à ce sous-groupe, la VE-cadhérine (voir paragraphe 4.2.1) et la cadhérine 19 occupent une place isolée

au sein de l'arbre phylogénétique des cadhérines (**figure 6**) **(Halbleib and Nelson, 2006; Nollet et al., 2000)**.

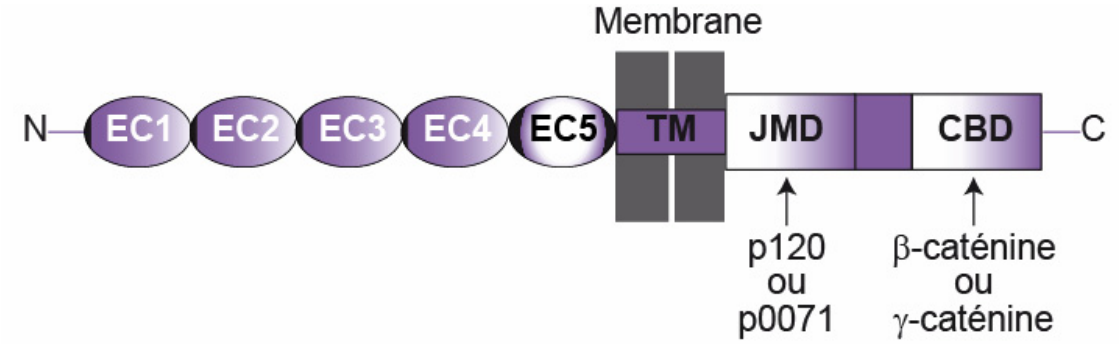


Figure 7 : Organisation modulaire des cadhérines classiques. D'après **(Nollet et al., 2000)**.
Les cadhérines classiques, telles la VE-cadhérine, comprennent un domaine extracellulaire composé de cinq modules répétés (nommés EC1 à EC5). Les domaines EC1 à EC4 ont une structure similaire, tandis que le domaine EC5, le plus proche de la membrane, légèrement différent, comprend quatre résidus cystéyles à l'origine de deux ponts disulfures. Les cadhérines classiques possèdent un domaine transmembranaire (TM), et leur partie cytoplasmique présente deux domaines d'interaction conservés. Le domaine qui jouxte la membrane (JMD, JuxtaMembrane Domain) régit l'interaction avec les caténines p120 et p0071, et le domaine de liaison aux caténines (CBD, Catenin-Binding Domain) l'interaction avec la β- ou la γ-caténine.

4.1.2 Les protocadhérines

Ces protéines constituent, au sein de la famille des cadhérines, le plus grand sous-groupe qui compte plus de soixante membres identifiés à ce jour **(Halbleib and Nelson, 2006; Nollet et al., 2000; Suzuki, 2000)**. Ce groupe est homogène en terme de séquences mais les protocadhérines ne présentent que peu de similitudes avec les séquences des cadhérines classiques. La structure de leur domaine extracellulaire est très variable, et peut contenir six modules EC. Cette sous-famille reste assez mal définie. Le type d'interaction qu'elles engendrent est méconnu et elles ne présentent que de faibles propriétés adhésives. Le cas de la protocadhérine 12 est discuté dans le paragraphe 4.2.3.

4.1.3 Les autres sous-familles

Les **desmocollins** et les **desmogléines** sont les cadhérines desmosomales **(Gumbiner, 2005; Nollet et al., 2000)**. Elles interagissent avec les desmoplakines, les plakophilines, la γ-caténine et les filaments intermédiaires au sein des jonctions desmosomales. Elles constituent deux sous-familles distinctes au regard de leur localisation sub-cellulaire et de l'organisation de leur domaine intracellulaire.

D'**autres cadhérines**, qui présentent également plus de cinq modules EC, ont une position isolée dans l'arbre phylogénétique puisqu'elles n'ont pu être classées dans aucun groupe de cette superfamille (**figure 6**). C'est le cas notamment de la cadhérine 13 (discuté dans le paragraphe 4.2.4) et de la cadhérine 15 (ou M-cadhérine). Cette dernière ne possède pas le tripeptide HAV, remplacé par une séquence Phe-Ala-Leu (FAL). De plus, ni la structure de son domaine extracellulaire ni sa protection contre la protéolyse ne semblent dépendantes de la présence d'ions calcium, comme pour les cadhérines classiques.

Les **protéines de signalisation apparentées aux cadhérines** constituent un groupe incluant les cadhérines Flamingo, FAT, et Daschous, majoritairement identifiées et étudiées chez *Drosophila melanogaster* et *Caenorhabditis elegans* **(Gumbiner, 2005; Halbleib and Nelson, 2006; Nollet et al., 2000)**. Ces cadhérines ont une structure bien différente des autres membres de la superfamille. Leur domaine extracellulaire inclut plus de cinq modules EC et leur domaine transmembranaire traverse sept fois la membrane. Des fonctions dans la suppression des tumeurs, le développement embryonnaire ou la polarité cellulaire leur ont été attribuées, mais leur capacité à contracter des interactions homophiliques reste encore à établir.

4.2 Les cadhérines endothéliales

4.2.1 La VE-cadhérine (Vascular Endothelial-cadherin, cadhérine 5 ou CD144)

4.2.1.1 Structure

La VE-cadhérine est une cadhérine classique de type II de 135 kDa, dont l'ADNc a été mis en évidence pour la première fois en 1991 **(Suzuki et al., 1991)**. Sa localisation aux contacts intercellulaires et son expression spécifiquement restreinte à l'endothélium ont été révélées en 1992 **(Lampugnani et al., 1992)**.

La VE-cadhérine est composée d'un domaine extracellulaire qui comprend cinq modules EC, d'un domaine transmembranaire, et d'une queue cytosolique qui permet l'interaction avec ses partenaires intracellulaires (**figure 7**) **(Nollet et al., 2000)**. On peut supposer que les domaines EC1 à EC4 de la VE-cadhérine sont formés d'une structure à sept feuillets β, semblable à celle de ses homologues, les E- et N-cadhérines. Le domaine EC5, le plus proche de la membrane, comprend quatre résidus cystéyles à l'origine de deux ponts disulfures. Le domaine extracellulaire complet abrite des sites de liaison au calcium au niveau

des régions inter-modulaires. La saturation de ces sites par les ions calcium serait à l'origine de la rigidité du domaine extracellulaire de la VE-cadhérine **(Nagar et al., 1996; Pertz et al., 1999; Shapiro et al., 1995)**. Comme pour les cadhérines de type II, le module EC1 est de fait dépourvu du motif tripeptidique HAV.

Tout comme les autres cadhérines, la VE-cadhérine dispose, dans son domaine intracellulaire, de deux régions très conservées régissant les interactions avec des caténines :

- un domaine, proche de la membrane, le JMD (JuxtaMembrane Domain), permet l'interaction avec p120 ou une protéine qui lui apparentée, p0071 ;
- et un domaine en position C-terminal, capable d'interagir avec les caténines, le CBD (Catenin-Binding Domain) **(Nollet et al., 2000; Wallez et al., 2006b)**.

La queue cytoplasmique contient neuf résidus tyrosyles susceptibles d'être phosphorylés. Le résidu Y685, notamment phosphorylé par Src **(Wallez et al., 2006a)**, permet l'association de la VE-cadhérine à la kinase Csk (C-terminal Src kinase, voir paragraphe 5.1.2 et 5.1.3) **(Baumeister et al., 2005)**. La phosphorylation des résidus Y658 et Y731 est suffisante pour maintenir les cellules endothéliales dans un état angiogénique, c'est-à-dire à même de migrer **(Wallez et al., 2006b)**.

4.2.1.2 Auto-association

La VE-cadhérine est garante de l'intégrité de l'endothélium, et l'interférence avec ses fonctions entraîne une perturbation de la perméabilité **(Corada et al., 1999; Gulino et al., 1998)**. Sans cette cadhérine, les cellules endothéliales sont incapables de s'organiser en structures vasculaires **(Vittet et al., 1997)**, ou même de survivre **(Carmeliet et al., 1999)**, et le développement embryonnaire avorte très précocement **(Gory-Faure et al., 1999)**. Toutes ces fonctions sont étroitement liées aux capacités adhésives de la VE-cadhérine, or le voile sur l'organisation quaternaire de cette protéine se lève à peine.

L'étude des interactions homophiliques régies par la VE-cadhérine suggère fortement que son domaine extracellulaire est capable de s'auto-assembler en une structure hexamérique **(Al-Kurdi et al., 2004; Bibert et al., 2002; Legrand et al., 2001)**. Les domaines de la molécule impliqués dans l'élaboration de l'hexamère sont situés dans la région inter-modulaire EC3 et EC4. Qui plus est, le module EC1 joue un rôle majeur dans les interactions homophiliques entre molécules de VE-cadhérine **(Bibert et al., 2002)**.

L'étude par microscopie électronique d'un fragment recombinant comprenant les modules EC1 à EC4 a révélé l'existence de cette structure hexamérique en solution **(Legrand et al., 2001)**. Elle apparaît comme un cigare creux de 23 nm de long et d'environ 8 nm de

diamètre (**figure 8A**). La reconstitution tridimensionnelle de cette structure, établie à partir de plusieurs centaines d'images de l'hexamère tirés des clichés de microscopie électronique et en se référant à la structure tridimensionnelle de la partie extracellulaire de la C-cadhérine **(Boggon et al., 2002)**, a montré que cet auto-assemblage serait en fait constitué de six molécules de VE-cadhérine agencées tête-bêche **(Hewat et al., 2007)** (**figure 8B**). L'hexamère apparaît comme un trimère de dimères (**Figure 8B2**) où chaque dimère résulte de l'association anti-parallèle de deux monomères *via* les modules EC1 (**figure 8B1**), ce qui suggère que la VE-cadhérine s'homodimérise selon le mécanisme mis en évidence auparavant pour les cadhérines classiques **(Boggon et al., 2002)**. La trimérisation se fait par l'intermédiaire des modules EC3-EC4, qui interagissent en *cis* (**figure 8B3**). Ces résultats confirment les observations faites par Ahrens et coll. sur l'auto-assemblage du domaine extracellulaire complet de la VE-cadhérine, produit en système eucaryote, en fusion avec le domaine N-terminal de la région « coil-coiled » de la protéine CMP (Cartilage Matrix Protein) **(Ahrens et al., 2003)**. Effectivement, ce fragment s'auto-associe en trimère *cis* tout en étant capable d'élaborer des interactions *trans* via son module EC1. De plus, les travaux de Al Kurdi et coll. ont également mis en évidence par cristallographie 2D l'existence d'une interaction anti-parallèle régie par le module EC1 **(Al-Kurdi et al., 2004)**. L'ensemble de ces résultats suggère que cette structure hexamérique anti-parallèle hélicoïdale constitue une « unité adhérente » de base à partir de laquelle les jonctions endothéliales peuvent s'élaborer.

L'équipe d'A. Brisson a apporté la preuve que cette structure hexamérique est capable, à elle seule, d'élaborer des jonctions adhérentes **(Lambert et al., 2005)**. Le greffage du fragment recombinant correspondant à la partie extracellulaire de la VE-cadhérine à la surface de liposomes induit la formation spontanée de pseudo-jonctions (**figure 8C1**). Ces jonctions artificielles présentent une épaisseur constante de 23 ± 1 nm et s'étendent latéralement sur plusieurs centaines de nm. La distance entre les membranes des liposomes est cohérente avec la taille des hexamères observés en solution **(Hewat et al., 2007; Legrand et al., 2001)**. De façon surprenante, ces jonctions ont une morphologie tout à fait comparable à celle des desmosomes observés sur des coupes de peau humaine par cryo-microscopie électronique **(Al-Amoudi et al., 2005)**. Une analyse plus détaillée montre que ces pseudo-jonctions adhérentes entre les liposomes sont composées d'objets en forme de cigares disposés côte à côte perpendiculairement à la surface des liposomes (**figure 8C2**). En vue latérale, ces pseudo-jonctions adhérentes apparaissent constituées de l'empilement d'anneaux (**figure 8C3**), dont le diamètre correspond à celui des hexamères observés auparavant en solution (Legrand et al., 2001) (**figure 8A2**).

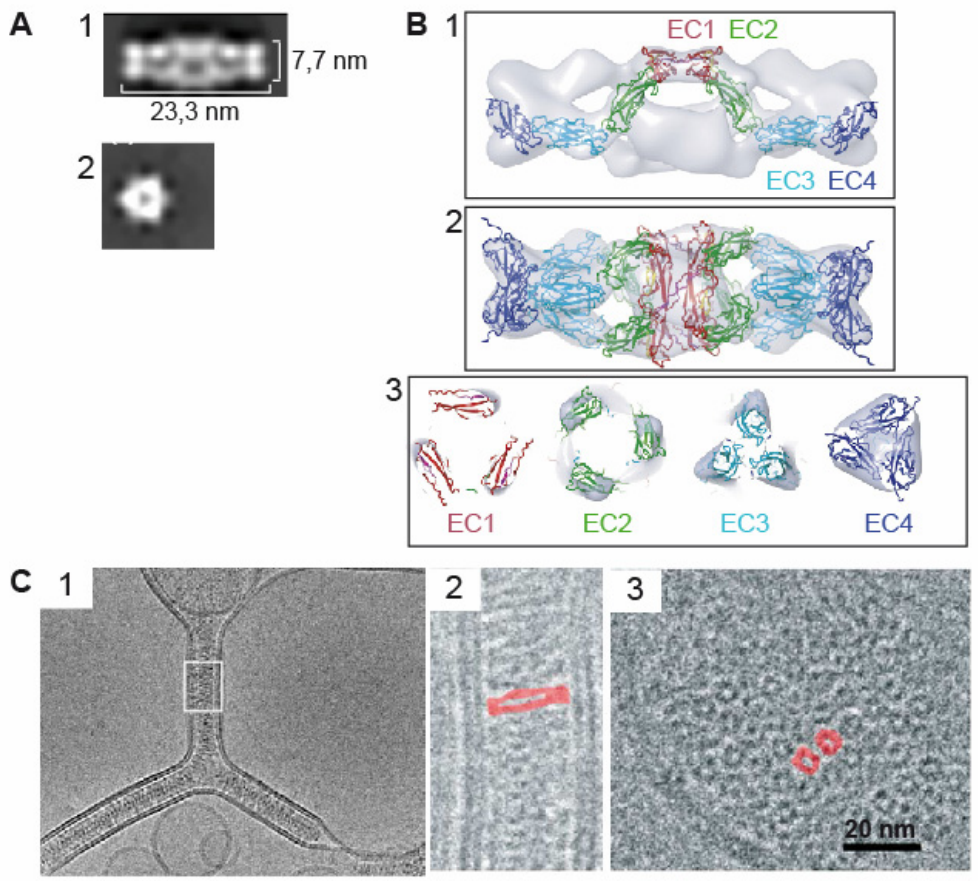


Figure 8 : Architecture de l'hexamère de VE-cadhérine. D'après **(Hewat et al., 2007; Lambert et al., 2005; Legrand et al., 2001)**.

A : Détail d'images de microscopie électronique du fragment VE-EC1-4 (fragment recombinant comprenant les modules EC1 à EC4 du domaine extracellulaire de la VE-cadhérine en présence de 5mM de Ca^{2+}), en coloration négative. La structure hexamérique a l'apparence d'un cigare creux, comme le montrent les vues longitudinale (**1**) et latérale (**2**).

B : Reconstitution en trois dimensions de la structure hexamérique observée en **A** (résolution 2,4nm). Cette modélisation a été réalisée à partir de la structure cristallographique des modules EC de la C-cadhérine **(Boggon et al., 2002; Jain, 2003)**. Agencement des modules EC1 à EC4 dans un dimère (**1**) et dans l'hexamère (**2**). Position des quatre modules EC en vue latérale (**3**). Les dimères anti-parallèles sont maintenus par les interactions en *trans* des modules EC1 (**1**) et les trimères parallèles par les interactions en *cis* des modules EC4 (**3**).

C : Jonctions artificielles entre liposomes reconstituées à partir du fragment VE-EC1-4 -His (fragment VE-EC1-4 auquel une étiquette histidine a été ajoutée), visualisées par cryo-microscopie électronique. Les images de ces jonctions se propageant le long des membranes des liposomes soulignent la propension de la VE-cadhérine à former des jonctions en réseau continu (**1**). **2 :** Détail de l'architecture des jonctions artificielles, agrandissement du carré blanc de **1**. Les fragments recombinants VE-EC1-4-His s'assemblent en structures organisées en forme de cigare, comme présenté en **A1**. Pour plus de clareté, un cigare a été marqué en rouge. **3 :** Vue latérale des pseudo-jonctions adhérentes. Cette image montre un empilement d'anneaux qui correspondent au diamètre des hexamères observés en **A2**. Deux anneaux ont été marqués en rouge pour plus de clarté.

De ces études, il ressort qu'en solution, les structures hexamériques restent isolées les unes des autres, tandis que lorsqu'elles sont ancrées dans la membrane, elles peuvent s'organiser côte à côte élaborant ainsi les jonctions endothéliales (**figure 9**). Ces structures hexamériques pourraient glisser les unes par rapport aux autres latéralement et s'étirer dans le sens de la longueur, conférant une certaine flexibilité aux jonctions adhérentes. Enfin, cette structure hexamérique crée des interactions homophiliques entre molécules de VE-cadhérine vraisemblablement plus résistantes que celles mises en jeu par les cadhérines C, E et N (**(Boggon et al., 2002; Panorchan et al., 2006)**et **figure 10**).

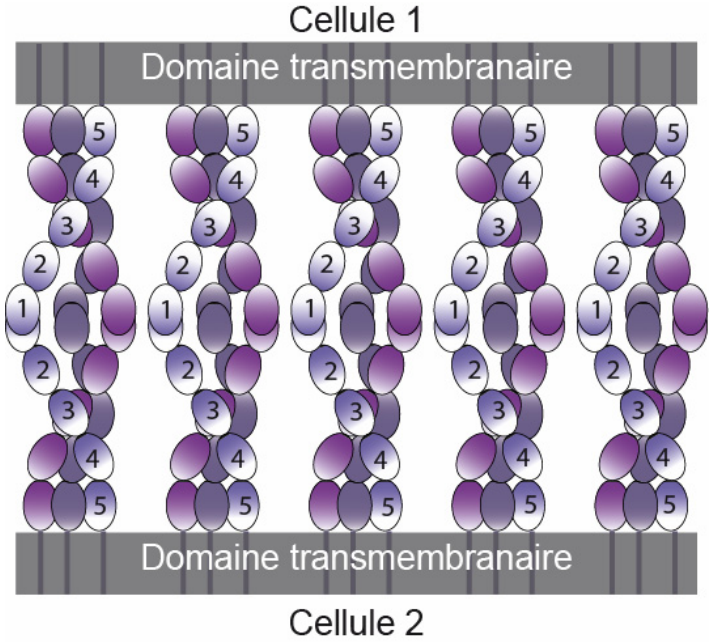


Figure 9 : Représentation schématique de l'agencement de molécules de VE-cadhérine au sein d'une jonction adhérente.
Les cellules 1 et 2 présentent à leur surface un trimère hélicoïdal de molécules de VE-cadhérine maintenues entre elles par les interactions de leur module EC4. Chaque molécule du trimère de la cellule 1 interagit en *tran*s par le module EC1 avec son homologue de la cellule 2 adjacente. La structure hexamérique ainsi formée pourrait expliquer la résistance des jonctions adhérentes endothéliales au flux sanguin.

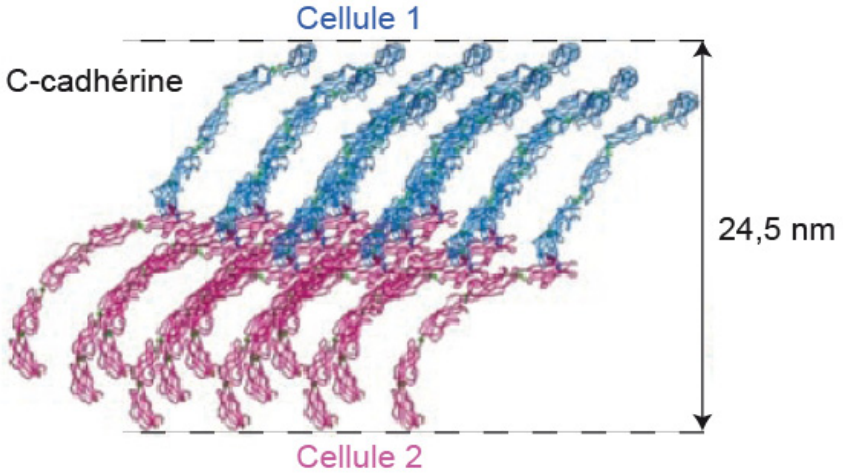


Figure 10 : Modèle d'association des cadhérines classiques. D'après **(Boggon et al., 2002)**.
Les domaines extracellulaires de molécules de C-cadhérine des cellules 1 et 2 (respectivement bleue et rose) se dimérisent en *trans* par leur module EC1 puis s'associent en *cis*.

4.2.2 N-cadhérine (Neural -cadherin ou cadhérine 2)

La N-cadhérine est l'autre cadhérine majeure exprimée par les cellules endothéliales, à des niveaux comparables à ceux de la VE-cadhérine **(Cavallaro et al., 2006; Navarro et al., 1998)**. Il s'agit d'une cadhérine classique de type I **(Cavallaro et al., 2006; Nollet et al., 2000)**. Elle est distribuée sur toute la surface cellulaire et il est généralement admis qu'elle ne se localise pas aux jonctions adhérentes. Il a été démontré qu'une courte séquence amino-acyle de la partie cytoplasmique de la VE-cadhérine est responsable de l'exclusion de la N-cadhérine des jonctions adhérentes **(Navarro et al., 1998)**. Cependant une étude récente rapporte une co-localisation avec la VE-cadhérine aux jonctions **(Luo and Radice, 2005)**. La N-cadhérine s'associe, comme la VE-cadhérine, aux β- et α-caténines, mais elle n'interagit que très peu avec p120 **(Navarro et al., 1998)**. Cette cadhérine régit les interactions des cellules endothéliales avec les péricytes ou les cellules musculaires lisses vasculaires de la paroi des vaisseaux **(Cavallaro et al., 2006)**. L'absence de N-cadhérine semble n'interférer ni avec la différenciation de cellules précurseurs en cellules endothéliales, ni avec l'angiogenèse, mais perturbe fortement le recrutement des péricytes à la périphérie vasculaire **(Tillet et al., 2005)**. Ceci suggère que la N-cadhérine est nécessaire à la formation des vaisseaux. En conséquence, interférer avec la fonction de la N-cadhérine n'est pas létale mais provoque *in vivo* aussi bien qu'*in vitro* des défauts dans de la paroi vasculaire **(Cavallaro et al., 2006)**. Un rôle plus prépondérant pour la N-cadhérine a été proposé dans la morphogenèse des vaisseaux

sanguins. En effet, sa délétion entraîne l'arrêt précoce du développement embryonnaire chez les souris mutantes, qui présentent des défauts importants de vascularisation **(Luo and Radice, 2005)**. Dans ces endothélia dépourvus de N-cadhérine, le niveau d'expression de la VE-cadhérine est faible, ce qui suggère que la N-cadhérine agirait sur la vascularisation en régulant l'expression de la VE-cadhérine. Ce phénotype n'est pas sans rappeler ceux observés par les équipes de E. Dejana et de P. Huber **(Carmeliet et al., 1999; Gory-Faure et al., 1999)** dans lesquels pourtant l'absence de VE-cadhérine n'est pas compensée par la présence de N-cadhérine.

En plus de son rôle dans la maturation des vaisseaux sanguins, la N-cadhérine est certainement impliquée dans la régulation de l'homéostasie endothéliale. Bien que Luo et coll **(Luo and Radice, 2005)** rapportent des données contraires, il semble que la N-cadhérine joue un rôle dans la protection contre l'apoptose **(Cavallaro et al., 2006)**. Cette cadhérine serait également impliquée dans le contrôle de la prolifération des cellules endothéliales, leur mobilité et leur survie, même si les voies de signalisation concernées sont encore mal connues.

L'entrée dans le système sanguin de certains pathogènes opportunistes pourrait se faire grâce à l'interaction des protéines exprimées par les cellules endothéliales avec celle exposées par le pathogène. C'est le cas de la levure *Candida albicans*, dont la protéine de surface Als3p en interagissant avec la N-cadhérine induit une réorganisation du cytosquelette d'actine endothélial, engendrant la formation de pseudopodes et l'endocytose du pathogène **(Filler and Sheppard, 2006)**.

Enfin, il est à noter que la N-cadhérine joue un rôle majeur dans la dissémination des cellules tumorales **(Qi et al., 2005)**. La transmigration de cellules de mélanomes au travers d'une monocouche de cellules endothéliales s'effectue grâce aux interactions homophiliques contractées par la N-cadhérine exprimée par les deux populations cellulaires en présence.

4.2.3 La protocadhérine 12 (PCDH12 ou VE-cadhérine-2)

La protocadhérine 12 ressemble à une cadhérine classique, bien qu'elle possède six ectodomaines EC **(Nollet et al., 2000; Suzuki, 2000)**. Elle a été identifiée pour la première fois dans des lignées endothéliales, aux jonctions intercellulaires. Comme la VE-cadhérine, elle est capable de générer des interactions homophiliques dépendantes du calcium, mais les interactions contractées sont moins résistantes que celles mises en jeu par les cadhérines classiques **(Frank and Kemler, 2002; Telo et al., 1998)**. Contrairement à la VE-cadhérine, elle ne s'associe pas avec les caténines et ne contracte que de très faibles interactions avec le

cytosquelette. Il n'a pas été possible de mettre en évidence à l'heure actuelle un quelconque rôle de la protocadhérine 12 dans la régulation de la perméabilité para-cellulaire, de la migration cellulaire ou de l'inhibition de contact. Il semble que cette protocadhérine ne soit pas impliquée dans la cohésion tissulaire. Il a été proposé que ces protocadhérines établissent des interactions hétérophiliques avec l'environnement des cellules endothéliales, ce qui leur confèrerait un rôle différent dans l'organisation tissulaire **(Suzuki, 2000)**. Par ailleurs, la protocadhérine 12 n'est pas essentielle au développement embryonnaire. Des souris déficientes pour le gène codant cette protocadhérine sont viables, fertiles et ne présentent pas de défauts morphologiques majeurs **(Rampon et al., 2005)**. Elle est exprimée de façon variable en fonction du processus de vascularisation, très fortement dans les trophoblastes riches en glycogène et dans les cellules mésangiales du glomérule. Il en ressort que cette parente de la VE-cadhérine n'est pas directement impliquée dans les jonctions adhérentes.

4.2.4 La T-cadhérine (H-cadhérine ou cadhérine 13)

La T-cadhérine est un membre tout à fait particulier de la famille des cadhérines. Elle occupe en conséquence une place isolée dans l'arbre phylogénique de cette famille (**figure 6**) **(Nollet et al., 2000)**. Elle présente un ectodomaine similaire à la E-cadhérine, avec un motif tripeptidique Glu-Thr-Thr (ETT) qui remplace le motif HAV classique. La particularité de la T-cadhérine réside dans le fait qu'elle ne possède ni domaine transmembranaire ni domaine cytoplasmique, et se lie à la membrane plasmique grâce à son interaction avec un phospholipide particulier, le phosphatidylglycosylinositol **(Cavallaro et al., 2006; Nollet et al., 2000)**. Etant donnée l'absence de queue cytoplasmique, la T-cadhérine n'a aucune interaction avec les partenaires classiques des cadhérines, et encore moins avec le cytosquelette. Elle n'est pas recrutée aux contacts intercellulaires. Pourtant, elle joue certainement un rôle dans l'angiogenèse puisque sa surexpression a été observée dans des pathologies telles que l'athérosclérose ou la néovascularisation tumorale. L'hypothèse la plus probable est que la T-cadhérine constituerait le médiateur de signaux de répulsion, comme dans le système nerveux central **(Fredette et al., 1996)**. En effet, l'engagement de la T-cadhérine dans une interaction avec d'autres protéines provoque la diminution de l'adhérence et l'induction de la migration cellulaire. Ainsi, il a été suggéré que la T-cadhérine serait impliquée dans le « guidage » des cellules endothéliales lors de l'angiogenèse, mais rien n'a encore pu étayer cette hypothèse à ce jour.

5 LA JONCTION ADHERENTE ENDOTHELIALE

5.1 Les fonctions de la VE-cadhérine

Outre ses attributs de molécule adhésive à l'origine de la constitution des jonctions adhérentes, la VE-cadhérine assure la régulation de certaines fonctions vitales de l'endothélium.

5.1.1 Contrôle de l'intégrité et de la perméabilité vasculaires

C'est en 1992 que la VE-cadhérine est observée aux contacts intercellulaires, où elle co-localise avec PECAM-1 **(Lampugnani et al., 1992)**. Ses propriétés adhésives sont mises en évidence en 1995 **(Breviario et al., 1995)**. A cette date, on découvre que l'expression de la VE-cadhérine sauvage dans des cellules CHO (Chinese Hamster Ovary) induit une agrégation cellulaire homophilique, dépendante du calcium. Par rapport aux cellules sauvages, les cellules transfectées voient leur vitesse de migration et leur perméabilité para-cellulaire diminuer lorsqu'elles s'organisent en monocouche. Ces données ont suggéré un rôle majeur de la VE-cadhérine dans l'organisation et la cohésion de l'endothélium vasculaire.

Dans le même temps, les interactions entre la VE-cadhérine et certaines caténines sont identifiées et les premiers complexes protéiques formant les jonctions adhérentes mis en évidence. La VE-cadhérine s'associe soit à la β-caténine, soit à la γ-caténine, de façon mutuellement exclusive, par son domaine CBD (voir paragraphe 4.2.1 et **figure 7**). Ces deux caténines entrent en interaction avec l'α-caténine **(Lampugnani et al., 1995)**. La connexion de la VE-cadhérine avec le cytosquelette d'actine grâce à cette caténine a été très tôt mise en évidence, et l'association à l'un de ses partenaires, la β-caténine ou la γ-caténine, s'est révélée indispensable à cette liaison (**figure 11**) **(Dejana, 2004; Navarro et al., 1995)**. Toutefois, l'interaction de la VE-cadhérine avec les caténines ou le cytosquelette n'est pas nécessaire à sa localisation aux contacts intercellulaires. Ainsi, la VE-cadhérine, bien que tronquée dans sa zone d'interaction avec les caténines, réussit à établir des jonctions, qui présentent des défauts notoires dans leur organisation, leur stabilité et surtout leur perméabilité.

L'utilisation d'anticorps dirigés contre la partie extracellulaire de la VE-cadhérine a permis de démontrer son importance dans les jonctions adhérentes endothéliales. Les anticorps, qui perturbent son association homophilique, induisent la délocalisation de la VE-cadhérine des jonctions adhérentes sans affecter les autres structures jonctionnelles **(Corada**

et al., 1999; Gulino et al., 1998). Un tel traitement détruit les fonctionnalités vitales de l'endothélium, son organisation et la régulation de sa perméabilité n'est plus assurée.

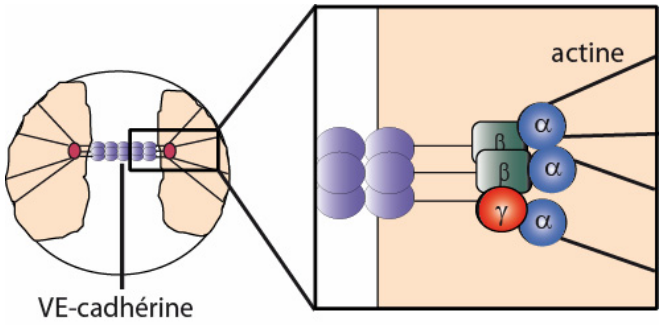


Figure 11 : Composition et organisation de la jonction adhérente inter-endothéliale traditionnellement décrite. D'après **(Lampugnani et al., 1995; Navarro et al., 1995)**. La VE-cadhérine contracte par son extrémité extracellulaire des interactions homophiliques. Dans sa partie cytoplasmique, elle interagit directement soit avec la β-caténine (β), soit avec la γ-caténine (γ). Ces deux caténines, à leur tour, recrutent l'α-caténine (α). Cette dernière, par son domaine de liaison à l'actine, relie indirectement la VE-cadhérine au cytosquelette d'actine.

La perméabilité vasculaire pourrait être également régulée par des modifications post-traductionnelles sur la partie cytoplasmique de la VE-cadhérine. En effet, la phosphorylation de ses résidus tyrosyles Y658 et Y731 empêche son interaction avec ses partenaires p120 et la β-caténine respectivement **(Potter et al., 2005)**. De plus, chaque phosphorylation ne perturbe pas l'adhérence intercellulaire, mais conduit individuellement à une augmentation de la perméabilité para-cellulaire et de la mobilité. La phosphorylation de la VE-cadhérine sur l'une ou l'autre de ces tyrosines particulières conduirait potentiellement à un phénotype mésenchymal des cellules endothéliales, rendant l'endothélium perméable et plus propice à l'extravasation de cellules tumorales, par exemple **(Wei et al., 2004)**. L'idée longtemps véhiculée selon laquelle seules les cellules endothéliales dont les jonctions intercellulaires sont déstabilisées sont capables de se mouvoir parait remise en question. Les travaux de Guo et coll. menés sur des cellules endothéliales confluentes, dérivées de cellules ES, mettent en lumière une mobilité certaine des cellules sans destruction des jonctions **(Guo et al., 2007)**. Au contraire, les mouvements cellulaires s'accompagnent d'un remodelage dynamique des jonctions adhérentes, dans lesquelles la VE-cadhérine reste associée à ses partenaires β- et γ-caténines. Ces études suggèrent pour la première fois que les cellules endothéliales seraient capables de mouvements dans un endothélium même quiescent, sans compromission de l'intégrité jonctionnelle ni de la régulation des fonctions endothéliales.

En conclusion, la VE-cadhérine, qui est responsable des contacts intercellulaires, permet le maintien de l'intégrité vasculaire et la régulation de la perméabilité, principalement par ses associations avec ses partenaires du complexe jonctionnel.

5.1.2 Régulation de la prolifération

Dans l'organisme adulte, les cellules endothéliales dans leur état physiologique sont quiescentes, ce qui a été assimilé à l'état de confluence pour les cellules en culture **(Dejana, 2004; Gottardi and Gumbiner, 2001; Matter and Balda, 2003; Venkiteswaran et al., 2002; Wallez et al., 2006a)**. Dans les deux cas, les cellules voient leur croissance inhibée par les contacts intercellulaires et sont protégées contre l'apoptose. La VE-cadhérine aurait un rôle intrinsèque dans tous ces phénomènes, tant *in vitro* qu'*in vivo*.

Le contrôle de la prolifération des cellules endothéliales pourrait tout d'abord faire intervenir une régulation génique. L'action de la VE-cadhérine sur le cycle cellulaire proviendrait probablement du fait qu'elle séquestre la β-caténine, l'empêchant ainsi de jouer son rôle de facteur de transcription régulant l'expression de gènes codant la cycline D1 et myc, qui induisent l'entrée dans le cycle cellulaire (voir paragraphe 5.2.1) **(Dejana, 2004; Reya and Clevers, 2005)**. Cependant, cette interaction ne suffit pas à expliquer le phénomène, puisque même dans des cellules endothéliales éparses ou sub-confluentes, la β-caténine est déjà associée à la VE-cadhérine, ce qui n'empêche pas pour autant les cellules de proliférer. D'autres mécanismes de contrôle sont donc certainement mis en jeu. La VE-cadhérine agit indirectement sur la prolifération cellulaire en s'associant avec des protéines de signalisation, telles que les kinases de la famille Src, les tyrosine phosphatases, dont SHP1, SHP2 et SHC (SH2-domain-containing protein) **(Dejana, 2004)**.

D'autre part, une forme phosphorylée de la VE-cadhérine sur son résidu tyrosyle Y685 est capable de lier les protéines Csk et Src de façon mutuellement exclusive **(Baumeister et al., 2005; Wallez et al., 2006a)**. L'absence de Csk dans les cellules endothéliales humaines issues de la veine de cordons ombilicaux (HUVEC, Human Umbilical Vein Endothelial Cell) induit la prolifération cellulaire alors que son association avec la VE-cadhérine augmente avec la densité cellulaire. On peut donc supposer que Csk, en s'associant à la VE-cadhérine, inhibe la prolifération endothéliale par un mécanisme pour l'heure encore inconnu.

5.1.3 Rôle dans la morphogenèse vasculaire

La VE-cadhérine apparait nécessaire à toute néovascularisation. Bien qu'elle ne soit indispensable ni à l'adhérence endothéliale ni à la différenciation hématopoïétique, elle est

essentielle à la vasculogenèse, puisque des cellules ES dépourvues de VE-cadhérine sont incapables d'élaborer des structures vasculaires dans des corps embryoïdes **(Vittet et al., 1997)**. Ces résultats ont été confirmés *in vivo*, dans un modèle de souris dont le gène de la VE-cadhérine a été invalidé. En effet, les embryons VE-cadhérine -/- présentent de sévères malformations vasculaires durant leur développement embryonnaire et meurent à mi-gestation (E9,5) **(Carmeliet et al., 1999; Gory-Faure et al., 1999)**. La différenciation des angioblastes en cellules endothéliales a bien lieu, ce qui est confirmé par l'expression de différents marqueurs endothéliaux comme VEGFR1, VEGFR2 et PECAM-1. Même en l'absence de VE-cadhérine, des jonctions se forment. En revanche, la vascularisation de ces embryons mutants est retardée et leurs vaisseaux présentent des défauts majeurs d'organisation et de maturation par rapport à leurs homologues sauvages. La VE-cadhérine joue donc un rôle majeur dans la morphogenèse vasculaire. Par ses interactions homophiliques et/ou par les signaux intracellulaires qu'elle transmet, cette cadhérine serait responsable d'un tri cellulaire pendant le développement permettant le regroupement de cellules de même type et la formation des vaisseaux **(Gumbiner, 2005)**.

L'injection dans des embryons sauvages d'anticorps anti-VE-cadhérine par voie intra-cardiaque à E8,5 reproduit le phénotype du mutant de la VE-cadhérine et induit un remodelage anormal du réseau vasculaire primitif déjà en place **(Carmeliet et al., 1999)**. La VE-cadhérine s'avère donc nécessaire au maintien de l'intégrité vasculaire et au remodelage du réseau, après l'établissement du réseau primitif, qui, lui, ne nécessite pas la présence de VE-cadhérine.

Plus marquant, des anticorps dirigés contre la VE-cadhérine bloquent l'angiogenèse tumorale **(Wallez et al., 2006b)**. Durant les phases angiogéniques, cette cadhérine disparaît des jonctions adhérentes, ce qui est en accord avec l'augmentation de la perméabilité vasculaire très souvent observée durant ce processus.

5.1.4 La transmission du signal

La VE-cadhérine est capable de réguler de nombreuses voies de signalisation intracellulaires et peut également transmettre des signaux aux cellules voisines en fonction des partenaires cytosoliques avec lesquels elle interagit. Comme toutes les cadhérines, elle est capable d'établir des interactions avec les Rho-GTPases (présentées dans le paragraphe 5.3.3.3.1.1) **(Wheelock and Johnson, 2003)**. Ces protéines assurent une transmission de signaux extracellulaires puisqu'elles régulent les propriétés adhésives des cadhérines, et donc l'adhérence intercellulaire. En transfectant le gène codant la VE-cadhérine dans des cellules

qui en sont dépourvues, il a été possible de mettre en évidence que les interactions entre molécules de VE-cadhérine activent Rac1 et non RhoA **(Lampugnani et al., 2002)**. La VE-cadhérine engendre une signalisation intracellulaire lorsqu'elle contracte des interactions homophiliques. A titre d'exemple, les premiers contacts cellule-cellule dus à la E-cadhérine, mais certainement également à la VE-cadhérine, transmettent des signaux par l'intermédiaire de Rac1, qui aboutissent à un remodelage du cytosquelette d'actine (**(Braga et al., 1997; Kovacs et al., 2002)**et voir paragraphe 5.3.3.3). Cette signalisation engendrée par Rac1 est nécessaire au maintien des jonctions adhérentes.

La VE-cadhérine libre, non impliquée dans une jonction, peut également être à l'origine d'une signalisation. En utilisant des cellules endothéliales non confluentes exprimant une cadhérine tronquée dans son domaine extracellulaire et donc incapable de contracter des interactions homophiliques, Koukis et coll. ont remarqué une activation de Cdc42 et une génération de protrusions membranaires **(Kouklis et al., 2003)**. La formation de ces protrusions est dépendante de l'actine qui se polymérise et s'arrime certainement au complexe jonctionnel. Ce mécanisme favorise la formation des jonctions adhérentes, et donc permet la reconstitution d'un tapis cellulaire. Ceci sous-tend l'idée d'un mécanisme d'induction de la réparation tissulaire grâce à la VE-cadhérine non impliquée dans une jonction. Elle serait capable d'engendrer une signalisation aboutissant à la formation de protrusions, au remaniement des jonctions, et donc, à la reformation de l'endothélium lésé.

On peut toutefois se demander par quel mécanisme la signalisation qui se met en place suite à l'engagement d'une cadhérine dans une interaction est transmise dans la cellule. Cette transmission de signaux pourrait être expliquée par des modifications conformationnelles des cadhérines. Bien que ce processus n'ait pas été formellement mis en évidence pour la VE-cadhérine, il a été suggéré pour la C-cadhérine. En effet, le traitement d'embryons de xenopes par l'activine, un facteur de croissance apparenté au facteur de croissance tumorale (TGFβ pour Tumor Growth Factor β), conduit à une perte d'adhérence de la C-cadhérine consécutive à une modification conformationnelle de la molécule, bien qu'elle reste à la surface cellulaire et associée aux caténines intracellulaires **(Zhong et al., 1999)**. Les modifications conformationnelles sur la partie intracellulaire pourraient masquer ou rendre accessibles des sites d'interaction avec des protéines-clés de la signalisation ou de modifications post-traductionnelles.

5.1.5 Signalisation induite par le VEGF

Le VEGF est un facteur soluble, puissant inducteur de la perméabilité vasculaire considérée comme un prérequis au processus de néoangiogenèse **(Byrne et al., 2005; Olsson et al., 2006)**. Il est nécessaire à la croissance, à la différenciation, à la prolifération et à la migration des cellules endothéliales **(Yamaoka-Tojo et al., 2004)**. La famille du VEGF comprend plusieurs membres qui participent aux processus d'angiogenèse et de lymphangiogenèse **(Byrne et al., 2005; Olsson et al., 2006)**. Seul le VEGF-A, principalement impliqué dans l'angiogenèse, sera considéré ici. Ses récepteurs sont des glycoprotéines transmembranaires à activité tyrosine kinase. Les seuls récepteurs du VEGF exprimés par l'endothélium vasculaire sont le VEGFR1 et le VEGFR2. L'affinité du VEGFR1 pour le VEGF est dix fois supérieure à celle du VEGFR-2, mais son activité tyrosine kinase est dix fois plus faible que celle du VEGFR2. Des données récentes démontrent toutefois que le VEGFR2 est le médiateur majeur de la signalisation VEGF.

Le VEGF promeut *in vitro* la prolifération des cellules HUVEC et induit une augmentation de la perméabilité para-cellulaire **(Esser et al., 1998)**. Ces phénomènes qui s'accompagnent d'une auto-phosphorylation sur tyrosine du VEGFR2 permettent la phosphorylation des principaux composants de la jonction adhérente, à savoir la VE-cadhérine, p120 et la β-caténine, à l'exception toutefois de l'α-caténine. Esser et coll. ont émis l'hypothèse que cette phosphorylation sur tyrosine des protéines de la jonction adhérente serait le moyen de déstabiliser les contacts intercellulaires en dissociant les partenaires du complexe jonctionnel **(Carmeliet et al., 1999; Esser et al., 1998)**. Ce faisant, les jonctions plus perméables permettraient aux cellules plus détachées les unes des autres de migrer, processus observé durant l'angiogenèse.

Les travaux de Wallez et coll., menés au laboratoire, ont clairement démontré qu'une stimulation de cellules HUVEC par le VEGF conduit à la phosphorylation de la VE-cadhérine sur son résidu tyrosyle Y685 **(Wallez et al., 2006a)**. Cette phosphorylation résulte de l'activation de la kinase Src, constitutivement associée à la VE-cadhérine *in vitro*. L'existence d'une forme de cette cadhérine phosphorylée sur tyrosine *in vivo*, chez la souris, a été effectivement mise en évidence dans l'utérus et dans l'ovaire, deux tissus sujets à une angiogenèse hormono-dépendante. Ces résultats donnent corps à la théorie d'une régulation de la perméabilité vasculaire par phosphorylation **(Lambeng et al., 2005)**.

L'action du VEGF sur la prolifération cellulaire est limitée par la présence même de la VE-cadhérine, liée à la β-caténine, ce qui, entre autre, expliquerait le faible pourvoir d'induction de la prolifération des cellules endothéliales confluentes par le VEGF **(Grazia**

Lampugnani et al., 2003). En effet, en l'absence de VE-cadhérine ou de β-caténine, les cellules endothéliales perdent toute inhibition de contact et répondent à la stimulation par le VEGF. Dans les cellules HUVEC confluentes, la fixation du VEGF sur son récepteur induit son association avec le complexe jonctionnel à base de VE-cadhérine. Là, une phosphatase jonctionnelle, peut-être DEP1 (Density Enhanced Phosphatase), déphosphoryle le VEGFR2, empêche son association avec la VE-cadhérine, et contrecarre ainsi son effet inducteur de la prolifération. Dans ce cas, l'inhibition de la prolifération ne nécessiterait pas l'activité de régulation de transcription de la β-caténine, mais uniquement sa présence et son association avec la VE-cadhérine.

La stimulation de cellules endothéliales par le VEGF induit la liaison de la phosphatase SHC à la partie cytoplasmique de la VE-cadhérine **(Dejana, 2004)**. Ce faisant, SHC ne peut plus participer à l'activation de la voie Ras, ERK/MAPK (extracellular signal regulated kinase/mitogen-activated protein kinase), connue comme une voie d'induction de la prolifération cellulaire **(Zanetti et al., 2002)**.

Un autre mécanisme de régulation de la prolifération endothéliale, interférant avec la signalisation provoquée par le VEGFR2 a été proposé. Il s'avère que le VEGF, lorsqu'il s'associe à son récepteur, induit son internalisation. Le VEGFR2, bien que dans des vésicules à clathrine, garderait sa capacité à transmettre le signal d'induction de la prolifération en gardant sa capacité à interagir avec les autres protéines cellulaires **(Lampugnani et al., 2006)**. Son association avec la VE-cadhérine retardant l'internalisation du VEGFR2, il ne pourrait plus transmettre son signal à partir des vésicules à clathrine, ce qui par conséquent limiterait la prolifération cellulaire.

Un autre mécanisme impliquant l'internalisation de la VE-cadhérine pourrait également expliquer la perméabilité vasculaire induite par le VEGF **(Gavard and Gutkind, 2006)**. La stimulation du VEGFR2 par la fixation de son ligand met en place une signalisation intracellulaire faisant intervenir la Rho-GTPase Rac (voir paragraphe 5.3.3.3.1.1) qui conduit à la phosphorylation sur le résidu séryle S665 de la VE-cadhérine et au recrutement de la β-arrestine-2. S'en suit une endocytose de cette cadhérine dans des vésicules à clathrine, ce qui de fait détruit physiquement et localement les jonctions endothéliales et promeut la perméabilité para-cellulaire.

Le VEGF n'induit pas seulement la prolifération cellulaire, il apparait impliqué dans la transmission de signaux anti-apoptotiques par la voie Phosphatidylinositol-3-kinase (PI3 kinase)/Akt. Après stimulation des cellules par le VEGF, le VEGFR2 s'associe à la VE-cadhérine par le biais de la β-caténine **(Carmeliet et al., 1999; Grazia Lampugnani et al.,**

2003; Lambeng et al., 2005). Ceci active en aval la voie de signalisation dépendante de la PI3 kinase, qui induirait la surexpression du gène *gas1*, dont l'expression est requise pour inhiber l'apoptose et maintenir l'intégrité de l'endothélium quiescent **(Spagnuolo et al., 2004)**. Des cellules endothéliales immortalisées dérivées de cellules souches embryonnaires murines dépourvues de VE-cadhérine fonctionnelle sont incapables de transmettre le signal de survie induit par le VEGF, bien qu'elles expriment normalement ses récepteurs, et présentent donc un taux d'apoptose bien supérieur à celui des cellules sauvages **(Carmeliet et al., 1999)**. Ceci suggère que la VE-cadhérine, sous l'influence du VEGF, engendre un signal anti-apoptotique par son association au VEGFR2.

5.1.6 Implication dans l'inflammation et la transmigration leucocytaire

Lors du processus inflammatoire, des cytokines comme le facteur activateur des plaquettes (PAF, Platelet-Activating Factor) ou le facteur de nécrose tumorale α (TNFα, Tumor Necrosis Factor α) sont sécrétées et exercent une action chimio-attractante sur les leucocytes **(Engelhardt and Wolburg, 2004)**. Elles constituent également de puissants médiateurs de l'inflammation et induisent la perméabilité vasculaire **(Hudry-Clergeon et al., 2005; Prescott et al., 2002; Taylor, 2005)**. La stimulation de cellules endothéliales murines par le PAF provoque l'association entre la VE-cadhérine et la PI3 kinase, ce qui se traduit par la phosphorylation sur tyrosine de cette cadhérine et une nette déstabilisation des jonctions adhérentes. Ceci pourrait expliquer comment le PAF contrôle la perméabilité vasculaire. De plus, au vue des données actuelles, il est fort probable que le traitement au TNFα sur des cellules endothéliales en culture provoque l'activation de la protéine tyrosine kinase fyn qui phosphoryle la VE-cadhérine, et induit l'augmentation de la perméabilité para-cellulaire **(Angelini et al., 2006)**.

Les cytokines pro-inflammatoires activent également l'endothélium vasculaire, en favorisant l'expression de molécules d'adhérence, qui entrent en interaction avec les récepteurs portés par les leucocytes circulants **(Engelhardt and Wolburg, 2004; Hermant, 2006)**. Ces associations ont pour effet de faire rouler les leucocytes à la surface endothéliale (« rolling ») afin de les freiner puis de les stopper totalement. Ces deux processus, bien documentés, précèdent l'étape d'extravasation des leucocytes au travers de la barrière endothéliale. C'est au cours de cette étape, qui est encore sujette à caution, que la VE-cadhérine entre en action (**figure 12**). Dans des expériences de transmigration leucocytaire *in vitro* au travers d'une monocouche de cellules HUVEC préalablement stimulées par le TNFα, il apparait que le passage des leucocytes déstabilise les jonctions adhérentes, et induit une

dissociation du complexe jonctionnel **(Del Maschio et al., 1996; Hermant et al., 2003)**. Pourtant, aucune rétraction cellulaire n'est visible, ce qui est certainement dû au fait que les autres structures jonctionnelles restent intactes. La VE-cadhérine, bien que délocalisée de la jonction, demeure associée à l'α-caténine. Le suivi en temps réel de la transmigration des neutrophiles à travers des monocouche d'HUVEC a mis en évidence la voie para-cellulaire empruntée par les cellules immunitaires **(Shaw et al., 2001)**. Ces dernières passent la monocouche au travers de trous pré-existants ou se formant à leur approche. Dans ce dernier cas, la VE-cadhérine est chassée de la zone de diapédèse, ménageant un orifice par lequel vont pouvoir se faufiler les leucocytes **(Su et al., 2002)**. Enfin, les lacunes sont comblées dans les cinq minutes suivant le passage du leucocyte **(Shaw et al., 2001)**. L'altération de la jonction adhérente *in vivo* favorise manifestement l'extravasation, puisque la destruction de l'intégrité vasculaire à l'aide d'injection d'anticorps dirigés contre la partie extracellulaire de la VE-cadhérine dans le péritoine de souris s'accompagne d'une nette augmentation de la transmigration de neutrophiles vers la zone inflammatoire **(Gotsch et al., 1997)**.

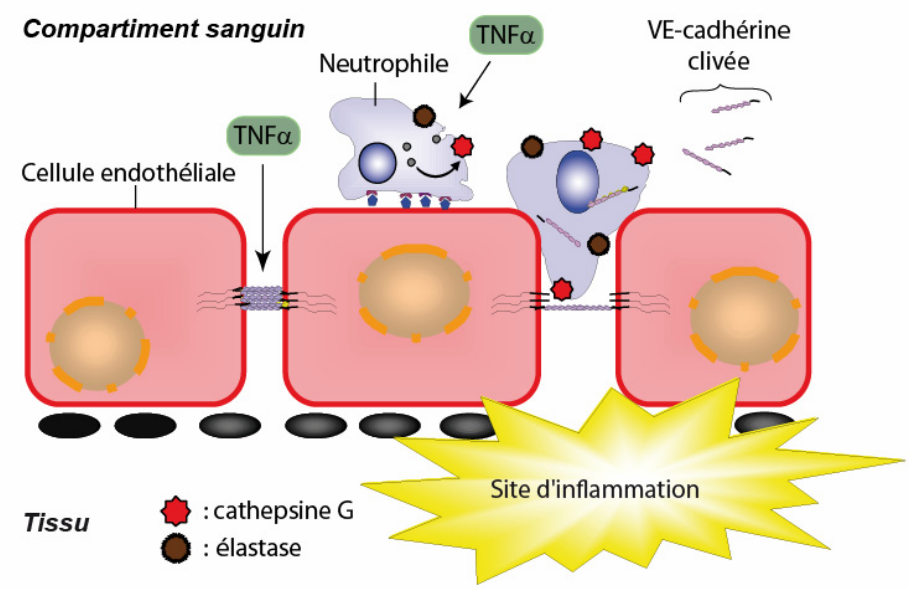


Figure 12 : Hypothèse de mécanisme de diapédèse des neutrophiles. D'après **(Engelhardt and Wolburg, 2004; Hermant et al., 2003; Hermant, 2006)**.
En cas d'inflammation, il se met en place une sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, parmi lesquelles se trouve le TNFα. S'en suit deux processus concomitants : l'induction de la perméabilité vasculaire et le recrutement de leucocytes au site de l'inflammation par chimiotactisme. Les neutrophiles, après leur stimulation par des cytokines, exposent à leur surface deux protéases, la cathepsine G et l'élastase. Grâce à ces enzymes, les neutrophiles clivent la VE-cadhérine, détruisant transitoirement les jonctions adhérentes intercellulaires, ce qui leur permet de traverser la barrière endothéliale.

Le passage de neutrophiles au travers d'une monocouche de cellules HUVEC s'accompagne d'une protéolyse de la partie extracellulaire de la VE-cadhérine, induisant une

ouverture transitoire des jonctions endothéliales **(Carden et al., 1998; Hermant et al., 2003)**. Cette protéolyse résulte de l'action de l'élastase et de la cathepsine G, deux protéases intracellulaires transportées à la surface des neutrophiles consécutivement à leur stimulation par des cytokines pro-inflammatoires **(Carden et al., 1998; Cepinskas et al., 1999; Owen et al., 1995)**. Le clivage de la VE-cadhérine est indispensable à l'extravasation des neutrophiles puisque les inhibiteurs des protéases élastase et cathepsine G, bloquent la protéolyse et inhibent la transmigration des neutrophiles **(Hermant et al., 2003; Weinrauch et al., 2002)**. Une telle déstabilisation des jonctions adhérentes doit certainement engendrer une signalisation intracellulaire, ne serait-ce que pour permettre la reformation les jonctions après le passage des cellules immunitaires.

5.2 Les caténines

La majorité des caténines appartiennent à la famille des protéines Armadillo **(Peifer et al., 1994; Peifer et al., 1992)**. Elles contiennent des motifs répétés Armadillo de quarante-deux résidus amino-acyles, à l'origine identifiés comme produit du gène de segmentation Armadillo chez la drosophile. Certaines caténines interagissent directement avec la VE-cadhérine en s'associant au domaine CBD de son extrémité C-terminale (**figure 7**). Rapidement après leur découverte, leur rôle dans la régulation de l'adhérence cellulaire régie par les cadhérines est apparu comme majeur **(Bazzoni and Dejana, 2004; Vincent et al., 2004)**. Le cœur du complexe formant la jonction adhérente est constitué par la VE-cadhérine associée soit à la β-caténine soit à la γ-caténine, qui à leur tour recrutent l'α-caténine (**figure 11**). Sans caténine, l'adhérence cellulaire est fortement perturbée, voire perdue. Au sein des jonctions adhérentes matures, lorsque les cellules sont confluentes, les protéines des jonctions ne présentent en général pas de phosphorylations sur leurs résidus tyrosyles **(Lampugnani and Dejana, 1997)**.

5.2.1 La β-caténine

La β-caténine, qui est une protéine très conservée au cours de l'évolution, possède douze motifs répétés Armadillo **(Lilien and Balsamo, 2005; Peifer et al., 1992)**. L'agencement de ces domaines Armadillo forme une superhélice d'hélices. Ainsi, la β-caténine offre une grande surface de contact qui lui permet d'entrer en interaction avec plusieurs partenaires à la fois dont la VE-cadhérine **(Bazzoni and Dejana, 2004; Vincent et al., 2004)** (**figure 13**). L'association entre la VE-cadhérine et la β-caténine se fait dès le

passage dans le réticulum endoplasmique, ce qui protège la cadhérine de la dégradation **(Lampugnani et al., 1995; Lilien and Balsamo, 2005)**. Par ailleurs, l'association avec la β-caténine est requise pour structurer le domaine intracellulaire de la E-cadhérine et pour empêcher sa dégradation en masquant une séquence signal particulière **(Huber et al., 2001)**. Un mécanisme similaire pour la VE-cadhérine pourrait être envisagé.

L'interaction entre les cadhérines et la β-caténine est finement régulée par des modifications post-traductionnelles. Leur interaction est stabilisée par la phosphorylation des résidus séryles de la VE-cadhérine et de trois résidus tyrosyles de la β-caténine **(Lilien and Balsamo, 2005)**. En revanche, si la β-caténine est phosphorylée sur le résidu Y654 par Src, son affinité pour la VE-cadhérine s'en trouve diminuée. Les interactions entre l'extrémité N-terminale de la β-caténine et l'α-caténine sont régulées par phosphorylation (**figure 13**) **(Bazzoni and Dejana, 2004; Vincent et al., 2004)**. La phosphorylation de la β-caténine sur son résidu tyrosyle Y142 induit la dissociation du complexe α-/β-caténine **(Lilien and Balsamo, 2005)**.

D'autres mécanismes cellulaires faisant intervenir l'association entre la β-caténine et la phosphatase SHP2 permettraient le maintien des complexes des jonctions adhérentes dans les cellules endothéliales quiescentes en conservant dans un état déphosphorylé les caténines α, β et p120, partenaires de la VE-cadhérine **(Ukropec et al., 2000)**.

La β-caténine constitue une protéine structurale essentielle du complexe de la jonction adhérente en associant la VE-cadhérine à ses partenaires cytosoliques et au cytosquelette d'actine. *In vivo*, l'absence de β-caténine a des répercussions sur l'intégrité de l'endothélium vasculaire, qui présente alors des défauts de régularité ou des lacunes **(Cattelino et al., 2003)**. De la même façon, des cellules endothéliales dépourvues de β-caténine, en culture, établissent des jonctions plus perméables et moins résistantes que des cellules normales. En outre, une réorganisation notoire du cytosquelette d'actine s'opère en parallèle avec une disparition de l'α-caténine des jonctions au profit de la desmoplakine.

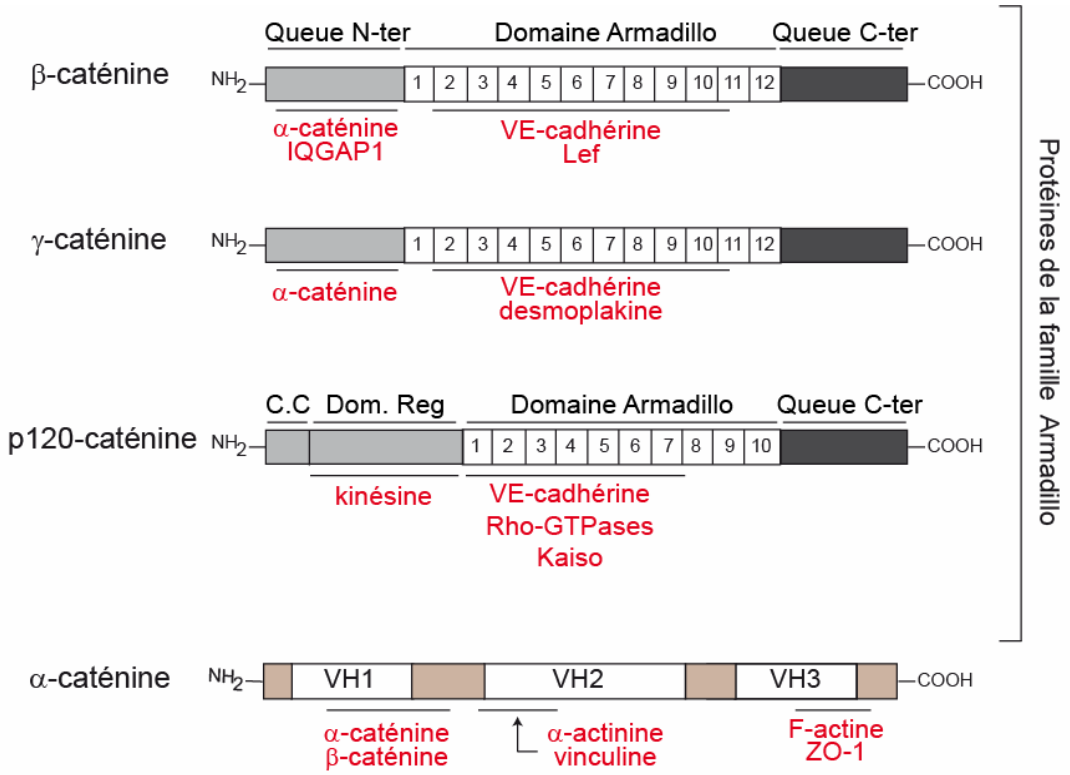


Figure 13 : Structure modulaire des principales caténines associées à la VE-cadhérine au sein des jonctions adhérentes. D'après **(Castano et al., 2007; Miravet et al., 2003; Reynolds and Roczniak-Ferguson, 2004; Yang et al., 2001; Zhurinsky et al., 2000)**
Les caténines β, γ et p120 sont toutes membres de la famille des protéines Armadillo. Toutes trois présentent un nombre variable de domaines répétés Armadillo. Dans sa partie N-terminale, p120 possède une région « coil-coiled » (C.C) et un domaine de régulation (Dom. Reg) contenant de nombreux sites potentiels de phosphorylation. L'α-caténine, quant à elle, est une protéine capable de lier l'actine. Elle présente plusieurs domaines d'homologies à la vinculine (VH). Les domaines d'interaction de chaque caténine avec leurs principaux partenaires (mentionnés en rouge) sont indiqués sous chaque diagramme.

Lorsque la β-caténine n'est pas intégrée au sein du complexe jonctionnel, elle constitue un acteur majeur de la voie de signalisation Wnt et agit comme régulateur transcriptionnel (**figure 14**) **(Bazzoni and Dejana, 2004)**. En l'absence de signal Wnt, la β-caténine, libérée dans le cytosol, est rapidement phosphorylée par la caséine kinase I ou la Glycognène Synthase Kinase-3-β (GSK3β), complexées à l'axine et à la protéine APC (Adenomatous Polyposis Coli) **(Bienz, 2005; Reya and Clevers, 2005; Willert and Jones, 2006)**. Cette phosphorylation provoque l'ubiquitination et l'adressage de la β-caténine au protéasome où elle sera dégradée (**figure 14A**). Lorsque le ligand Wnt se fixe à son récepteur Frizzled associé à un récepteur des lipoprotéines LDL (Light Density Lipoproteins), la signalisation Wnt est engagée. La protéine Dishevelled (Dsh) est alors phosphorylée et l'axine, mobilisée sur son récepteur, empêche la formation du complexe ainsi que la phosphorylation de la β-caténine. Elle s'accumule alors dans le cytoplasme puis est

transportée dans le noyau. Là, elle exerce sa fonction d'activateur de transcription, en association avec le complexe Tcf/Lef (T cell factor/leucocyte enhancing factor) sur un nombre important de gènes, dont des régulateurs du cycle cellulaire (tel *c-myc*) ou des activateurs de la prolifération cellulaire (tel le gène de la cycline-D1) (**figure 14B**).

Ainsi, la séquestration de la β-caténine par la VE-cadhérine constituerait un moyen de réguler son activité transcriptionnelle et expliquerait en partie l'inhibition de contact observée quand les cadhérines sont engagées dans des jonctions.

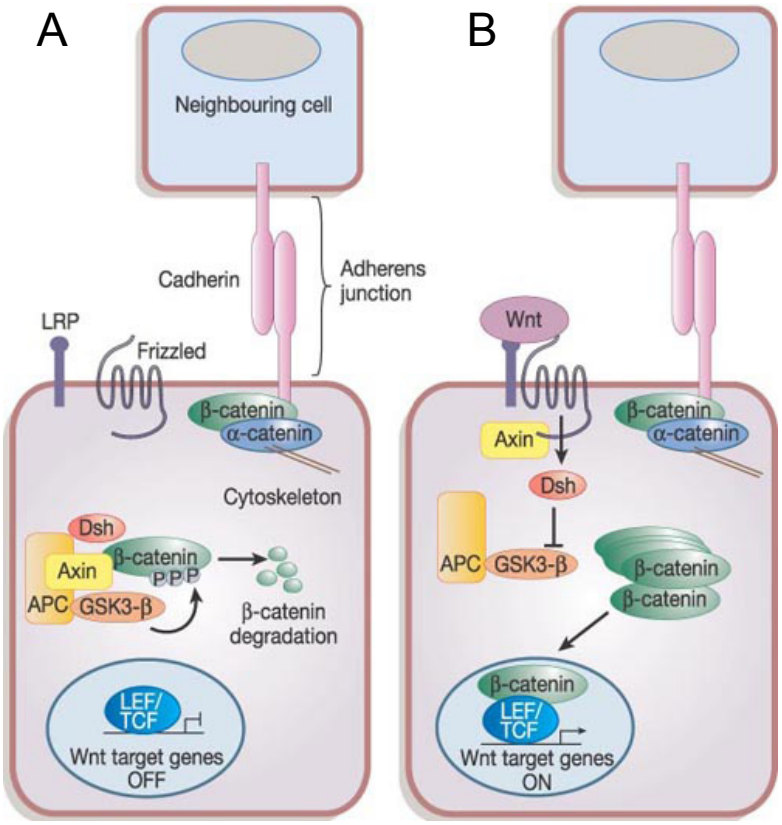


Figure 14 : Voie de signalisation Wnt. D'après **(Reya and Clevers, 2005)**.
A : En l'absence de ligand, les protéines APC (Adenomatous Polyposis Coli), Dishevelled (Dsh), axine et glycogène synthase 3 β (GSK3β) forment un complexe permettant à cette dernière kinase de phosphoryler la β-caténine, ce qui conduit à son ubiquitination et son adressage au protéasome où elle sera dégradée.
B : La présence du ligand Wnt active le récepteur Frizzled, qui recrute l'axine. Celle-ci phosphoryle Dishevelled (Dsh), et cette modification post-traductionnelle inhibe son interaction avec la protéine GSK3β. Le complexe APC/axine/GSK3β ne peut plus se former et la β-caténine non phosphorylée s'accumule dans le cytoplasme. Elle est transportée dans le noyau où, associée au complexe Lef/Tcf (Leucocyte enhancing factor/T cell factor), elle active la transcription de gènes cibles dont certains sont impliqués dans la régulation du cycle cellulaire.

5.2.2 La γ-caténine (ou plakoglobine)

La γ-caténine est un homologue de la β-caténine (**figure 13**). Comme cette dernière, elle appartient à la famille des protéines Armadillo et présente une organisation tertiaire comparable **(Bazzoni and Dejana, 2004; Peifer et al., 1994; Zhurinsky et al., 2000)**. La γ-caténine interagit avec le domaine CBD de la VE-cadhérine, de façon mutuellement exclusive avec la β-caténine **(Bazzoni and Dejana, 2004; Zhurinsky et al., 2000)**. De plus, la γ-caténine, par son extrémité N-terminale, s'associe avec l'α-caténine à la VE-cadhérine, mais ce complexe ternaire ne se forme que tardivement, dans des cellules confluentes **(Lampugnani et al., 1995)**. Il apparait que la γ-caténine serait un intermédiaire de la voie Wnt, car elle s'associe avec le facteur Lef **(Zhurinsky et al., 2000)**. Son rôle de facteur de transcription pourrait alors être activateur aussi bien qu'inhibiteur **(Bazzoni and Dejana, 2004)**.

Dans les cellules endothéliales, il semble aujourd'hui bien établi que la connexion aux filaments intermédiaires composés de vimentine soit assurée par la γ-caténine qui fait le lien entre la VE-cadhérine et la desmoplakine (**figure 15**) **(Kowalczyk et al., 1998; Shasby et al., 2002; Valiron et al., 1996)**. Ceci est détaillé dans le paragraphe 5.3.3.1.

Comme la β-caténine, la γ-caténine fait l'objet d'une régulation par phosphorylation sur tyrosine **(Miravet et al., 2003)**. Pourtant, bien que ces deux protéines soient les cibles des mêmes kinases, la phosphorylation n'engendre pas les mêmes effets. A titre d'exemple, la phosphorylation par les kinases Fer et Fyn induit une augmentation de l'affinité de la γ-caténine pour l'α-caténine au détriment de la desmoplakine, tandis qu'elle induit l'effet inverse pour la β-caténine.

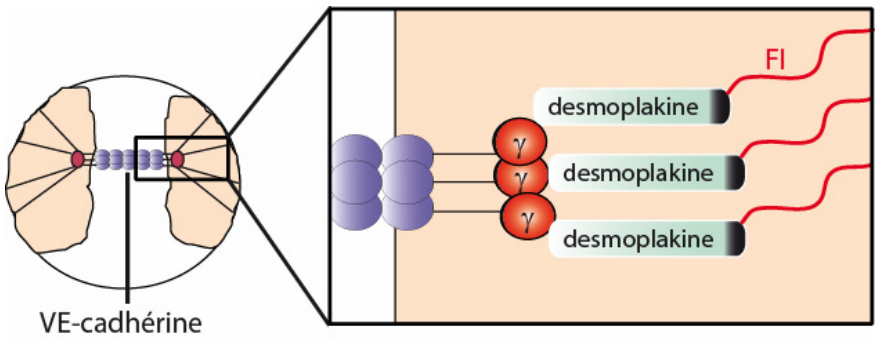


Figure 15 : Connexion de la VE-cadhérine aux filaments intermédiaires. D'après **(Kowalczyk et al., 1998; Valiron et al., 1996)**
Les filaments intermédiaires (FI), composés de vimentine sont liés indirectement à la VE-cadhérine par l'intermédiaire de la γ-caténine (γ) et de la desmoplakine.

5.2.3 La sous-famille p120

5.2.3.1 p120 (p120-caténine ou p120^{ctn})

p120 est la protéine prototype d'une sous-famille des protéines Armadillo impliquées dans l'adhérence intercellulaire (**figure 13**) **(Vincent et al., 2004)**. Elle ne présente que 22 % d'identité avec la β-caténine **(Reynolds, 2007)**. Tout d'abord décrite comme un substrat de la tyrosine kinase Src, en 1989, c'est en 1994 que l'interaction de p120 avec les cadhérines est découverte. Elle interagit par ses domaines Armadillo avec le domaine JMD de la VE-cadhérine (**figure 7** et **13**) **(Vincent et al., 2004)**. Dans les cellules endothéliales, la protéine p120 et la protéine apparentée p100, s'associent toutes deux aux complexes des jonctions adhérentes. Cependant, elles appartiennent à des complexes distincts, ne comprenant que l'une ou l'autre protéine. **(Staddon et al., 1995)**. Le rôle majeur attribué à p120 ces dernières années consiste à réguler de façon générale la stabilité et la localisation membranaire du complexe cadhérine/caténines **(Xiao et al., 2007)**.

Les niveaux d'expression cellulaire de p120 et de la VE-cadhérine sont corrélés **(Davis et al., 2003)**. p120 contrôle l'internalisation et la dégradation de la VE-cadhérine. En effet, en l'absence de p120, la VE-cadhérine est endocytée dans des vésicules à clathrine puis dégradée dans des lysosomes (**figure 16A**) **(Xiao et al., 2003; Xiao et al., 2005)**. Ce phénomène conduit à une perte considérable de l'adhérence intercellulaire et à une augmentation de la perméabilité para-cellulaire **(Iyer et al., 2004)**. Cette internalisation de la VE-cadhérine est inhibée lorsque les deux protéines sont en interaction, ce qui laisse supposer que son domaine cytoplasmique comprend une séquence d'induction de l'endocytose qui serait masquée par l'association avec p120 **(Xiao et al., 2005)**. Cette séquence impliquerait le résidu tyrosyle Y685 de la VE-cadhérine (communication de A. Kowalczyk, Gordon conferences, Il Ciocco, Italie, mai 2007). Comme il a été démontré que ce résidu faisait l'objet d'une phosphorylation dans des cellules endothéliales angiogéniques, il est envisageable que la phosphorylation sur ce résidu et le décrochage de p120 soient deux phénomènes liés **(Wallez et al., 2006a)**.

En outre, Chen et coll. suggèrent un rôle de p120 dans le transport du complexe cadhérine/caténines **(Chen et al., 2003)**. En effet, p120, associée par son extrémité N-terminale à la kinésine, une protéine « moteur » des microtubules, permet le transport du complexe cadhérine/caténines le long du réseau microtubulaire. Ceci permettrait une redistribution rapide du complexe jonctionnel à la membrane plasmique, et peut-être son recyclage après son internalisation.

Par ailleurs, p120 régule l'activité des Rho-GTPases Rho A, Rac 1 et Cdc42 (voir paragraphe 5.3.3.3.1.1) **(Bazzoni and Dejana, 2004; Xiao et al., 2007)**. Contrairement à la β-caténine qui est très rapidement dégradée lorsqu'elle est libérée dans le cytosol, p120 est stable dans la cellule. Cette caténine, libre dans le cytoplasme, agirait vraisemblablement d'une part, comme une Rho-GDI (GDP Dissociation Inhibitor) sur Rho A, en la séquestrant et en la maintenant dans sa forme inactive **(Anastasiadis, 2007)**. Rho A, en favorisant la stabilisation des fibres d'actine corticales, induirait le rassemblement des cadhérines aux jonctions **(Anastasiadis, 2007; Bishop and Hall, 2000)**. D'autre part, p120 activerait Rac1 et Cdc42 en interagissant avec Vav2, une Rho-GEF (Rho-GTPase Exchange Factor) **(Anastasiadis, 2007; Xiao et al., 2007)**. L'activation de Rac1 et Cdc42 favorise l'adhérence cellulaire, au moins en partie, en induisant la réorganisation du cytosquelette d'actine pour former des lamellipodes et des filopodes respectivement aux contacts intercellulaires **(Anastasiadis, 2007; Bishop and Hall, 2000)**. Pour l'heure, les mécanismes précis selon lesquels p120 régule l'activité des Rho-GTPases et les conséquences qui en résultent restent à déterminer. Pourtant, les interactions de p120 avec ces petites GTPases sous-tendent l'idée que cette caténine régule le destin de la VE-cadhérine non seulement par son association physique avec elle, mais également en régulant les voies de signalisation intracellulaire et la polymérisation du cytosquelette d'actine (**figure 16B**).

Les sites de phosphorylation de p120 dans son domaine de régulation (Dom. Reg, **figure 13**) sont parfaitement connus et cartographiés. Pourtant, à ce jour, le rôle individuel de chaque phosphorylation, tant sur les résidus tyrosyles que sur les résidus séryles ou thréonyles reste inconnu **(Reynolds and Roczniak-Ferguson, 2004)**. Il est vraisemblable que ces phosphorylations contribuent à la régulation fonctionnelle de la caténine **(Reynolds, 2007)**.

En résumé, p120 est aujourd'hui considérée comme un régulateur majeur de la stabilité des cadhérines à la membrane et un modulateur de la fonction des Rho-GTPases **(Reynolds, 2007)**. De fait, la régulation des molécules d'adhérence de surface, telles les cadhérines, émerge comme un mécanisme fondamental de contrôle de l'organisation tissulaire **(Xiao et al., 2007)**. Chez les vertébrés, p120 est une protéine essentielle à l'expression des cadhérines à des niveaux compatibles avec le bon fonctionnement et une organisation normale des tissus. Par conséquent, p120 est absolument nécessaire au développement embryonnaire, puisque les modèles murins transgéniques dépourvus de cette caténine meurent durant la gestation **(Reynolds and Roczniak-Ferguson, 2004; Xiao et al., 2007)**.

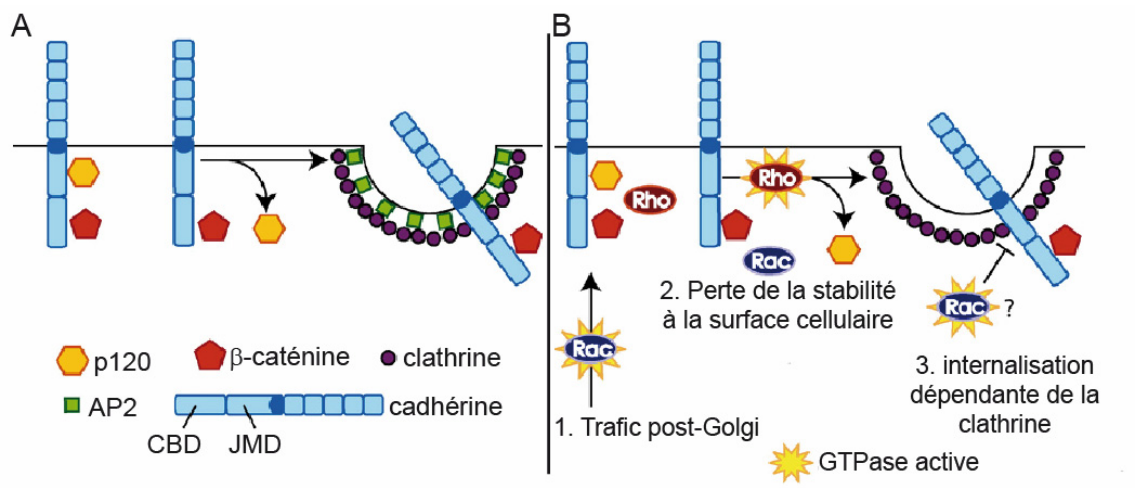


Figure 16 : Modèles de régulation de la stabilité des cadhérines à la surface cellulaire par p120. D'après **(Anastasiadis, 2007; Xiao et al., 2007)**.
A : p120 pourrait agir comme un « cache » en se liant au domaine cytoplasmique de la cadhérine. Cette interaction empêcherait la connexion de la partie intracellulaire de la cadhérine avec les protéines associées aux vésicules à clathrine (ici l'adaptine AP2). La séparation de p120 de la cadhérine pourrait démasquer un site d'interaction avec AP2, ce qui conduirait à l'endocytose de la cadhérine.
B : L'interaction avec les Rho-GTPases régulerait également la stabilité de la cadhérine à la membrane plasmique. **1** : Rac, comme Cdc42 (non figuré ici), régulent le trafic post-Golgi et sont requises pour l'adressage des cadhérines aux membranes. **2** : L'activation de Rho A induirait la séparation de p120 de la cadhérine, et provoquerait son endocytose. **3** : Rac activée aurait la capacité d'inhiber les processus d'endocytose, maintenant ainsi la cadhérine à la membrane.

L'idée que p120 soit également impliquée dans la régulation de l'expression génique a émergé quand l'interaction directe entre p120 et le facteur de transcription Kaiso a été démontrée. Kaiso est un membre d'une sous-famille de protéines à doigts de zinc, les protéines BTB/POZ (Broad, complex, Tramtrak, Bric à brac/Pox virus and Zinc finger) **(Daniel and Reynolds, 1999; Perez-Moreno and Fuchs, 2006)**. Un contingent de p120 nucléaire, essentiellement lié au facteur de transcription Kaiso, a été mis difficilement en évidence du fait que cette localisation n'est que transitoire **(Daniel, 2007)**. Les signaux responsables du transport de p120 vers et hors du noyau restent aujourd'hui inconnus. p120 comporte des séquences d'adressage (NLS, Nuclear Locating Signal) et d'export (NES, Nuclear Export Signal) nucléaires, potentiellement responsables du trafic de cette caténine entre le cytoplasme et le noyau. Kaiso aurait pour rôle d'inhiber l'activation de certains gènes-cibles induite par le couple de facteurs β-caténine/Tcf, résultant de l'activation de la voie de signalisation Wnt **(Daniel, 2007; Reya and Clevers, 2005)**. Après sa phosphorylation par Src, p120 s'associe par une partie de son domaine Armadillo au facteur de transcritpion Kaiso (**figure 13**). L'interaction de la caténine avec Kaiso masque en partie son domaine de liaison à

l'ADN et inhibe sa fonction de facteur de transcription. A l'heure actuelle, les inter-relations entre les deux voies de signalisation mises en œuvre, Wnt et p120/Kaiso, et le détail des différents acteurs de la seconde voie reste à élucider.

In vivo, la perte, la dérégulation ou la mauvaise localisation cellulaire de la protéine p120 sont constatées dans de nombreuses tumeurs d'origine humaine **(van Hengel and van Roy, 2007; Xiao et al., 2007)**. Pourtant, il reste à établir s'il existe un lien de causalité entre les perturbations de la caténine p120 observées et l'établissement d'un pronostic vital.

5.2.3.2 Les autres membres de la sous-famille p120

En plus de p120, la famille des protéines à domaine Armadillo comprend p0071 (ou plakophiline 4), ARVCF (Armadillo-Related gene deleted in Velo-Cardio-Facial syndrome), la δ-caténine, et les plakophilines **(Hatzfeld, 2007; Keil et al., 2007; Vincent et al., 2004)**. Ces dernières, dont la structure présente moins de similarités avec p120 que les autres membres de la sous-famille, sont des protéines des desmosomes, ayant pour fonction de connecter les jonctions desmosomales aux filaments intermédiaires **(Hatzfeld, 2007)**. Ces structures étant absentes de l'endothélium vasculaire, les plakophilines ne seront pas plus développées.

p0071 est exprimée dans les cellules endothéliales et se lie à la VE-cadhérine, sur le même site que p120 de façon compétitive (**figure 7**) **(Vincent et al., 2004)**. p0071 s'associe également à la desmoplakine, ce qui permet le recrutement des filaments intermédiaires à la jonction. Le rôle de cette protéine apparentée à p120 dans la fonction de barrière endothéliale ou dans l'angiogenèse reste encore obscur.

ARVCF est une caténine peu abondante par rapport à p120 dans de nombreuses cellules, telles que les cellules MDCK, ou des cellules issues de carcinomes de sein, de foie, ou de colon **(Mariner et al., 2000; Perez-Moreno and Fuchs, 2006)**. Elle s'associe au domaine JMD des cadhérines, par l'intermédiaire de son domaine Armadillo **(Kaufmann et al., 2000; Mariner et al., 2000)**. Se faisant, ARVCF exclue p120 des complexes jonctionnels cadhérine/β-caténine/γ-caténine. Son expression étant jusqu'à dix fois inférieure à celle de p120, ARVCF se présente comme un compétiteur de p120 dans la liaison aux cadhérines, mais est incapable de remplacer complètement p120. Il n'en demeure pas moins que des expériences menées sur des embryons de xénopes ont révélées l'importance tant de p120 que de ARVCF dans l'embryogenèse **(Fang et al., 2004)**. La perte de l'une ou l'autre de ces deux caténines conduit à de graves malformations de l'embryon, notamment imputables à la perte des voies de signalisation dépendantes des Rho-GTPases. Dans les cellules épithéliales

MDCK, un complexe ARVCF/ZO-1/E-cadhérine a été mis en évidence aux zones de contacts entre cellules éparses **(Kausalya et al., 2004)**. La dissociation de ces jonctions précoces conduit à la relocalisation de ARVCF dans le noyau. Un rôle putatif pourrait donc être attribué à ARVCF dans l'initiation de la formation des jonctions adhérentes.

La δ-caténine est également capable de lier le facteur de transcription Kaiso, et peut vraisemblablement remplacer p120 dans la fonction de régulateur négatif de ce facteur **(Daniel, 2007)**. Aucune interaction entre Kaiso et p0071 ou ARVCF n'a pu à ce jour être mise en évidence. Enfin, il a été démontré que certaines des protéines apparentées à p120, à savoir ARVCF, p0071, et la δ-caténine, sont capables de suppléer p120 dans son rôle de stabilisation des cadhérines à la surface cellulaire **(Davis et al., 2003; Reynolds, 2007; Xiao et al., 2005)**. En conclusion, p120 et les protéines qui lui sont apparentées apparaissent comme cruciales dans le maintien des cadhérines à la membrane plasmique, et par conséquent dans la régulation de l'adhérence cellulaire.

5.3 Les partenaires indirects de la VE-cadhérine

5.3.1 L'α-caténine

L'α-caténine diffère considérablement en terme de structure des autres caténines **(Kobielak and Fuchs, 2004; Perez-Moreno and Fuchs, 2006)**. Elle est formée de trois domaines d'homologie avec la vinculine VH (Vinculin Homology domain) et présente une forte similarité de séquence avec cette protéine (**figure 13**) **(Yang et al., 2001)**. L'α-caténine appartient à une famille de protéines se liant à l'actine, comprenant l'αE-caténine (ou l'α1-caténine), l'αN-caténine (ou l'α2-caténine, qui s'associe à la N-cadhérine), l'αT-caténine (ou l'α3-caténine, présente dans le cœur et les testicules), l'α-catuline (ou catenin α-like-1) et la vinculine **(Kobielak and Fuchs, 2004; Perez-Moreno and Fuchs, 2006)**.

Des essais d'interactions de protéines recombinantes *in vitro* ont montré rapidement que l'α-caténine n'interagit indirectement avec la E-cadhérine qu'en s'associant avec les domaines armadillo de la β-caténine (**figure 11**) **(Aberle et al., 1994)**. La stoechiométrie des caténines a été alors déterminée à une pour une. Depuis, il a été démontré que l'α-caténine est capable de former des homodimères comme des hétérodimères, notamment avec la β-caténine **(Perez-Moreno and Fuchs, 2006; Pokutta and Weis, 2002)**. Au sein du complexe jonctionnel, il est généralement admis que l'α-caténine interagit avec β-caténine ou la γ-caténine, mais également avec d'autres protéines liant l'actine, comme l'α-actinine, **(Nieset et**

al., 1997) et la vinculine **(Weiss et al., 1998)**. *In vivo*, l'α-caténine s'associe très tôt au complexe VE-cadhérine/β-caténine à la membrane plasmique, même dans les cellules encore éparses **(Kobielak and Fuchs, 2004; Lampugnani et al., 1995)**.

La présence de l'α-caténine est nécessaire au bon établissement des jonctions intercellulaires et donc à la morphogenèse vasculaire en général. Cette caténine a la propriété de se lier directement à l'actine filamenteuse **(Rimm et al., 1995)**. Elle interagit avec l'afadine aux zones de contacts intercellulaires amorcées par la nectine **(Perez-Moreno and Fuchs, 2006)**. Comme expliqué précédemment (voir paragraphe 3.5.1), la formation de contacts intercellulaires induit le recrutement du complexe cadhérine/caténines aux sites des jonctions naissantes. Une fois recrutée, l'α-caténine serait à l'origine d'un remodelage du cytosquelette d'actine en fibres radiales, ce qui favoriserait la stabilisation des jonctions et ce notamment grâce à ses interactions avec les Rho-GTPases (voir ci-après).

Jusqu'à récemment, toutes ces données laissaient à penser que l'α-caténine, associée au complexe VE-cadhérine/β-caténine, constituait le lien direct avec le cytosquelette d'actine dans les jonctions adhérentes. Drees et coll. ont démontré que l'α-caténine ne se fixe sur l'actine que sous sa forme homodimérique, excluant ainsi toute possibilité d'association simultanée de l'α-caténine avec l'actine et la β-caténine **(Drees et al., 2005)**. Dans le même temps, il a été démontré, certes dans un modèle biochimique acellulaire, que ni l'α-actinine **(Weiss et al., 1998)**, ni la vinculine **(Knudsen et al., 1995)**, ne peuvent associer les filaments d'actine au complexe jonctionnel en lieu et place de l'α-caténine **(Yamada et al., 2005b)**. Cependant, ces données nouvelles sont à replacer dans leur contexte. En effet, il semble que l'α-caténine seule ne puisse lier l'actine au complexe VE-cadhérine/β-caténine dans les jonctions matures, mais rien n'exclut sa participation à leur élaboration. L'α-caténine constituerait un régulateur-clé de la dynamique du cytosquelette d'actine en induisant la compaction de l'actine en filaments, ce qui contribuerait à la réorganisation du cytosquelette et à la maturation des jonctions adhérentes **(Drees et al., 2005; Perez-Moreno and Fuchs, 2006)**.

5.3.2 IQGAP1

IQGAP1 est une protéine cytosolique qui possède certainement un rôle régulateur de l'adhérence intercellulaire tant par ses interactions avec le cytosquelette d'actine et les composants majeurs des jonctions adhérentes que par sa régulation des Rho-GTPases.

La fonction première attribuée à cette protéine est la régulation de la dynamique du cytosquelette d'actine **(Briggs and Sacks, 2003a; Briggs and Sacks, 2003b)**. Tout d'abord,

IQGAP1, qui possède un domaine d'interaction direct avec l'actine filamenteuse, est capable d'induire sa réticulation *in vitro* (**figure 17A**). La concentration intracellulaire de calcium permettrait la régulation de la dynamique du cytosquelette d'actine **(Briggs and Sacks, 2003a)**. De plus, grâce à ses interactions physiques et régulatrices avec les Rho-GTPases Rac1 et Cdc42, IQGAP1 influence également la dynamique de l'actine (**figure 17B**). D'une part, IQGAP1 régule directement l'activité de Cdc42 et Rac1, puisque cette protéine inhibe leur activité GTPase intrinsèque, ce qui les stabilise dans leur forme liée au GTP **(Briggs and Sacks, 2003b; Brown and Sacks, 2006)**. D'autre part, comme IQGAP1 a la capacité de se lier à plusieurs protéines simultanément, elle permet l'élaboration de complexes multi-protéiques, comme le complexe ternaire Cdc42/IQGAP1/actine. IQGAP1 apparait comme un élément important des jonctions intercellulaires étant donné le rôle majeur du réseau d'actine dans l'établissement des jonctions adhérentes (décrit dans le paragraphe 5.3.3).

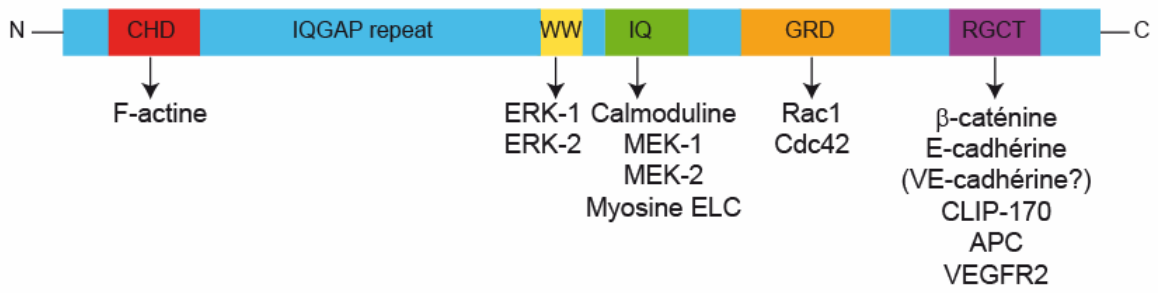


Figure 17A : Représentation schématique de la structure multi-modulaire de IQGAP1. D'après **(Brown and Sacks, 2006; Noritake et al., 2005; Yamaoka-Tojo et al., 2006)**.
IQGAP1 est une protéine d'échafaudage, au carrefour de plusieurs processus cellulaires. Elle est composée de plusieurs domaines structuraux distincts : **CHD**, Calponin Homology Domain ; **IQGAP repeat**, motif répété spécifique des protéines IQGAP ; **WW**, domaine contenant deux résidus tryptophanes conservés ; **IQ**, domaine de liaison à la calmoduline ; **GRD** (Ras-GAP related domain), domaine apparenté au domaine GAP des protéines de la superfamille Ras ; **RGCT** (Ras-GAP-C terminus), domaine C-terminal apparenté au domaine GAP des protéines Ras. Ce sont les domaines IQ et GAP (un domaine homologue aux GTPases Ras mais non fonctionnel) qui donnent son nom à la protéine.
Son rôle central dans plusieurs processus cellulaires est le fait de ses interactions multiples avec ses différents partenaires (indiqués par des flèches). ERK : extracellular signal-related kinase ; myosine ELC : chaîne légère essentielle de la myosine ; APC : Adenomatous Polypolis Coli.

IQGAP1 constitue également un élément de l'adhérence intercellulaire par ces interactions avec certaines composantes des jonctions adhérentes, épithéliales comme endothéliales. L'interaction entre IQGAP1 et le complexe E-cadhérine/β-caténine a été détectée par immunofluorescence aux sites de contacts intercellulaires des cellules L

exprimant stablement cette cadhérine (cellules EL) **(Briggs and Sacks, 2003b; Kuroda et al., 1998)**. La β-caténine se lie à IQGAP1 par le même domaine d'interaction que celui de l'α-caténine (**figures 13 et 17A**) **(Aberle et al., 1994; Kuroda et al., 1998)**. De ce fait, IQGAP1 peut induire la dissociation entre l'α-caténine et le complexe E-cadhérine/β-caténine **(Kuroda et al., 1998)**. La surexpression de IQGAP1 dans les cellules EL entraîne la disparition de la E-cadhérine des jonctions. Les auteurs ont donc envisagé un rôle régulateur de IQGAP1 dans l'adhérence intercellulaire. Les Rho-GTPases Rac1 et Cdc42, quant à elles, régulent positivement la formation des jonctions adhérentes à base de E-cadhérine **(Fukata et al., 1999)**. En effet, leur activation mobilise IQGAP1 empêchant ainsi sa liaison à la β-caténine. De ce fait, cette dernière reste associée à l'α-caténine et favorise la formation de jonctions adhérentes stables **(Briggs and Sacks, 2003a)**. En outre, le calcium, second messager important dans les interactions intercellulaires, favorise l'interaction de Cdc42 et Rac1 avec IQGAP1 qui stabilise les jonctions (**figure 17B**) **(Kuroda et al., 1998)**. *A contrario*, si la concentration en calcium baisse, l'association de la calmoduline avec IQGAP1 est favorisée et son affinité pour la E-cadhérine diminue **(Li et al., 1999)**. Des données récentes confèrent un autre rôle à IQGAP1 dans la régulation de l'adhérence cellulaire par son implication dans l'internalisation de la E-cadhérine. En effet, les travaux de Izumi et coll. réalisés dans un modèle acellulaire, laissent penser que les molécules de E-cadhérine engagées dans une interaction homophilique sont protégées de l'endocytose dans des vésicules à clathrine **(Izumi et al., 2004)**. Cette endocytose serait inhibée grâce à l'activation de Rac1 et Cdc42, qui en interagissant avec IQGAP1, induirait une réorganisation du cytosquelette d'actine.

IQGAP1 apparait comme un intégrateur de la signalisation intracellulaire induite par le VEGF dans les cellules endothéliales **(Brown and Sacks, 2006)**. La liaison du VEGF à son récepteur stimule son activité tyrosine kinase, qui phosphoryle IQGAP1, et promeut l'interaction entre le VEGFR-2, Rac1 et IQGAP1 dans les cellules HUVEC **(Yamaoka-Tojo et al., 2004)**. En outre, une expression réduite d'IQGAP1 conduit à une altération de la prolifération et de la migration des cellules HUVEC. Plus récemment, une association entre IQGAP1 et la VE-cadhérine dans les cellules HUVEC quiescentes a été démontrée **(Yamaoka-Tojo et al., 2006)**. La stimulation de ces cellules par le VEGF induit une délocalisation du complexe VE-cadhérine/IQGAP1 des zones de contacts intercellulaires sans affecter l'association entre ces deux protéines. La présence de IQGAP1 semble nécessaire à la localisation de la VE-cadhérine aux jonctions, comme en atteste l'effet de l'extinction de l'expression de IQGAP1 par siRNA. De plus, l'absence de IQGAP1 perturbe de nombreux phénomènes cellulaires induits par la stimulation par le VEGF, comme l'association du

VEGFR2 avec la VE-cadhérine, sa phosphorylation sur tyrosine, et la capacité des cellules HUVEC à former des structures pseudo-capillaires en matrigel. En conclusion, IQGAP1 aurait non seulement un rôle dans l'établissement des jonctions adhérentes, dans leur stabilité, mais également dans l'effet angiogénique induit par le VEGF.

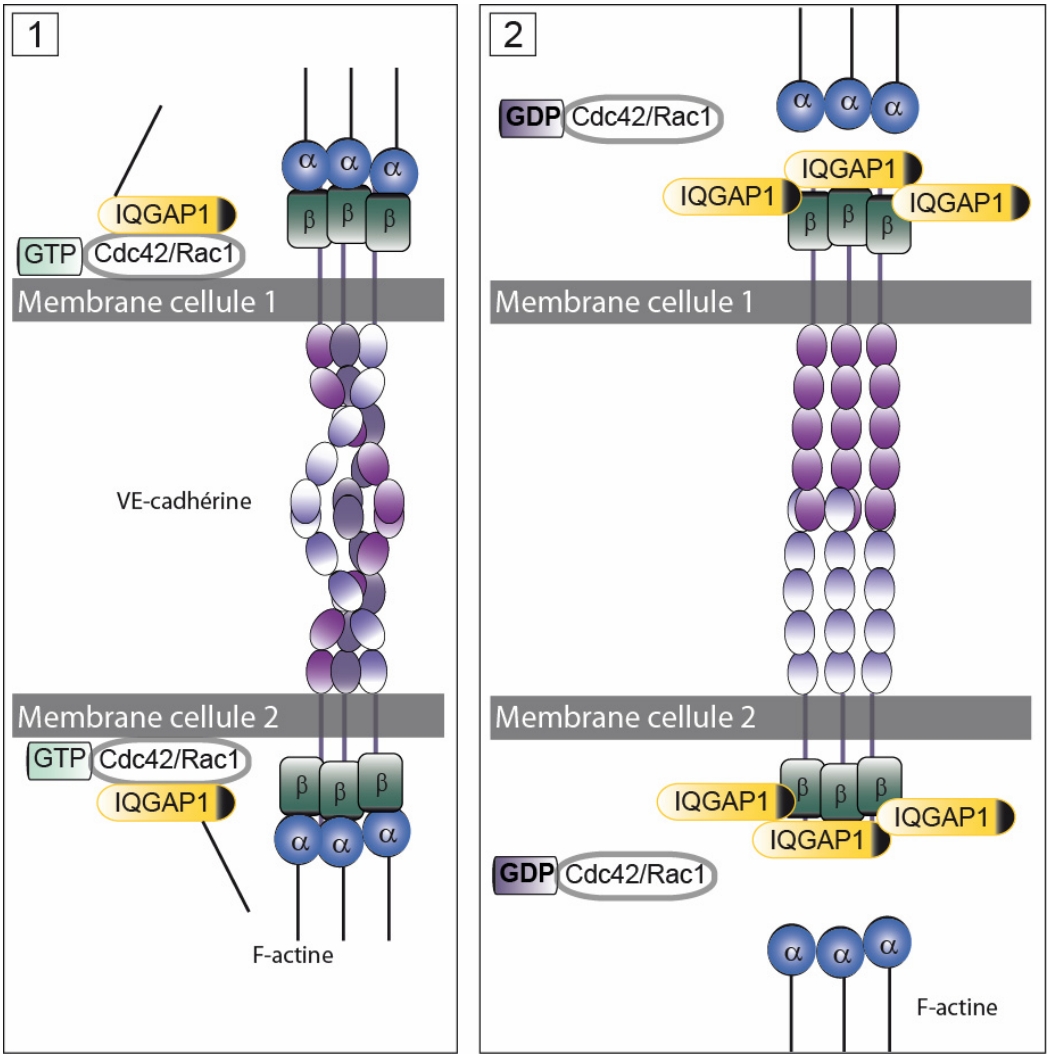


Figure 17B : Implication de IQGAP1 dans la régulation des jonctions adhérentes. D'après **(Briggs and Sacks, 2003b; Fukata et al., 1999; Noritake et al., 2005)**.
1 : IQGAP1 interagit avec les Rho-GTPases Rac1 et Cdc42 lorsqu'elles sont activées, c'est-à-dire liées au GTP. Dans ce cas, IQGAP1 est indépendant du complexe de la jonction adhérente et agit sur le cytosquelette d'actine. Celui-ci est remodelé et renforce la jonction établie.
2 : L'inactivation des Rho-GTPases par l'hydrolyse du GTP en GDP les dissocient de IQGAP1. Cette protéine devient alors libre d'interagir avec la β-caténine, ce qui entraîne la dissociation de l'α-caténine du reste du complexe jonctionnel. L'adhérence intercellulaire est alors perturbée et les jonctions adhérentes déstabilisées.

5.3.3 La connexion au cytosquelette

Le cytosquelette, en plus d'être responsable du maintien de la forme des cellules, joue également un rôle dans l'adhérence des cellules à leur support et entre elles.

5.3.3.1 Les filaments intermédiaires

En 1996, Valiron et coll. mettent en évidence la présence de desmoplakine, une protéine des jonctions desmosomales, dans les cellules HUVEC bien que celles-ci ne forment pas de desmosomes **(Valiron et al., 1996)**. La co-localisation de la desmoplakine avec la VE-cadhérine et la γ-caténine laissait entrevoir pour la première fois une interaction entre ces trois protéines. En effet, et notamment par la technique de double hybride, il sera démontré par la suite que la γ-caténine interagit avec la desmoplakine **(Kowalczyk et al., 1998)**. Il s'avère que les jonctions adhérentes formées par les HUVEC en culture présentent une forte association aux filaments intermédiaires composés de vimentine **(Shasby et al., 2002)**. Ainsi, les filaments intermédiaires seraient couplés à la VE-cadhérine par l'intermédiaire de la γ-caténine et de la desmoplakine (**Figure 15**). L'importance de la connexion du complexe jonctionnel à base de VE-cadhérine aux filaments intermédiaires a été soulignée par l'étude de souris mutantes, déficientes en desmoplakine **(Gallicano et al., 2001)**. Ces animaux meurent durant leur développement embryonnaire et présentent des défauts dans leurs micro-vaisseaux comparables à ceux observés chez les souris déficientes en VE-cadhérine **(Carmeliet et al., 1999; Gallicano et al., 2001; Gory-Faure et al., 1999)**.

Une autre connexion aux filaments intermédiaires serait assurée par p0071 qui entrerait en interaction avec la desmoplakine, en lieu et place de la γ-caténine **(Calkins et al., 2003)**. Dans un modèle de cellules L exprimant la N-cadhérine, Kim et coll. attribuent à p120 un rôle dans l'interaction des filaments intermédiaires avec le complexe jonctionnel adhérent **(Kim et al., 2005)**. Sans cette interaction, les cellules établiraient des jonctions moins robustes et moins stables.

En réalité, l'importance de la connexion aux filaments intermédiaires dans les cellules endothéliales est peu connue car semble-t-il peu étudiée. Il n'en reste pas moins que cette composante du cytosquelette, qui est indéniablement associé aux jonctions adhérentes, doit jouer un rôle dans la régulation des fonctions de l'endothélium vasculaire.

5.3.3.2 Les microtubules

Le réseau microtubulaire est de première importance dans l'architecture cellulaire. Son rôle dans la structuration des contacts intercellulaires est une thématique émergente. Il existe

une interaction entre les extrémités « plus » des microtubules et la jonction adhérente, qui régule la dynamique des microtubules, par un mécanisme encore inconnu **(Chausovsky et al., 2000; Waterman-Storer et al., 2000)**. De plus, il s'avère qu'un réseau microtubulaire intact est nécessaire au maintien des jonctions adhérentes, puisqu'un traitement de cellules épithéliales au nocodazole, qui induit la dépolymérisation des microtubules, entraîne la perte des contacts intercellulaires **(Waterman-Storer et al., 2000)**. Dans ce cas, une perte aux jonctions de l'actine, des β- et α-caténines est constatée. De plus, les composants majeurs de la jonction adhérente que sont la β-caténine et p120 entrent en interaction respectivement avec la dynéine et la kinésine, deux protéines associées aux microtubules **(Chen et al., 2003; Ligon et al., 2001)**.

Un réseau dynamique de microtubules, associé à CLIP170 et perpendiculaire aux contacts intercellulaires dépendants de la E-cadhérine, est nécessaire à la formation des jonctions adhérentes épithéliales **(Stehbens et al., 2006)**. Le blocage de ce réseau ne perturbe ni l'arrivée de la E-cadhérine à la membrane, ni sa quantité, mais affecte considérablement sa capacité à s'accumuler aux contacts intercellulaires. Etant donné que IQGAP1 interagit avec les microtubules par l'intermédiaire de CLIP-170, il n'est pas exclu que IQGAP1 puisse également jouer un rôle dans la régulation de l'adhérence cellulaire par ce biais (**figure 17**) **(Noritake et al., 2005; Perez et al., 1999)**. Pour l'heure, aucune donnée objective ne corrobore cette hypothèse.

Enfin, une inter-relation entre les protéines « moteurs » associées aux microtubules et le réseau d'actine associé aux cadhérines est manifeste même si, à l'heure actuelle, ce champ d'investigation est encore peu exploré.

5.3.3.3 Le cytosquelette d'actine

5.3.3.3.1 Les régulateurs du cytosquelette d'actine

L'adhérence intercellulaire, en plus d'être le fait des interactions homophiliques entre les cadhérines, est également largement assurée et régulée par le cytosquelette d'actine. Sa dynamique, qui fait l'objet de plus en plus d'études, est essentielle à l'établissement des jonctions adhérentes. En effet, sans cytosquelette fonctionnel, soit dépolymérisé par la latrunculine B (données acquises au laboratoire, voir annexe 2 et **(Waschke et al., 2005)**), soit figé par la jasplakinolide (données acquises au laboratoire), les cellules ne peuvent ni maintenir ni établir des jonctions et, par conséquent, meurent. D'un cytosquelette dynamique

dépend l'établissement des jonctions adhérentes, leur maintien et la régulation de la perméabilité vasculaire **(Mege et al., 2006; Perez-Moreno and Fuchs, 2006)**.

5.3.3.3.1.1 Les GTPases Rho

Les GTPases Rho sont des petites protéines de 20 à 30 kDa, membres de la superfamille des protéines Ras monomériques liant le GTP **(Bishop and Hall, 2000)**. En agissant comme des commutateurs moléculaires, elles participent à la régulation de nombreuses fonctions cellulaires. Leur activité régulatrice est liée à leur capacité à passer d'une forme inactive fixée au GDP à une forme active associée au GTP, ce qui va enclencher, *via* des protéines effectrices, le signal intracellulaire. Cette conversion est régulée par la famille des protéines GEF (Guanine nucleotide Exchange Factors) qui accroît les vitesses d'échange GDP/GTP ainsi que par la famille de protéines GAP (GTPase-Activating Proteins) qui stimule l'activité GTPasique des protéines GTPases Rho. Dans les cellules au repos, les GTPases Rho inactives, donc liées au GDP, sont localisées dans le cytoplasme où elles interagissent avec des protéines régulatrices de la famille des Rho-GDI (Guanine nucleotide Dissociation Inhibitors). L'activation cellulaire conduit à la dissociation des protéines GDI des GTPases Rho permettant ainsi l'interaction avec les protéines GEF, qui substituent le GTP au GDP (**figure 18**).

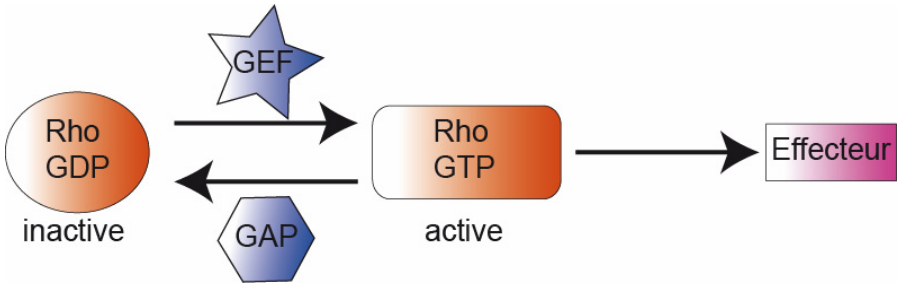


Figure 18 : régulation des GTPases Rho. D'après **(Ridley, 2006)**
Les GTPases Rho liées au GDP sont inactives. Par l'action de protéines GEF (Guanine nucleotide Exchange Factor), le GDP est échangé contre un GTP, ce qui active les Rho-GTPases, qui peuvent alors agir sur leurs effecteurs. Les protéines GAP (GTP-ase Activating Protein) stimulent l'activité GTPasique intrinsèque des GTPases Rho, ce qui provoque l'hydrolyse du GTP en GDP, et inactive les GTPases Rho.

La famille des GTPases Rho contient dix-huit membres, dont les sous-classes Rho, Rac et Cdc42 sont les plus étudiées. Ces protéines ont un rôle essentiel dans différents phénomènes de motilité. En effet, elles sont impliquées dans la régulation de la dynamique du cytosquelette d'actine en activant différents nucléateurs de l'actine (notamment WASP/WAVE et la famille des formines, présentés ci-après). Grâce aux modifications post-

traductionnelles (géranylation/farnésylation) qu'elles subissent, les GTPases Rho interagissent avec la membrane plasmique de façon très localisée, et donc, permettent une polymérisation ciblée du cytosquelette d'actine. Il est maintenant couramment admis que la protéine Rho est capable de promouvoir la formation de fibres de stress et l'assemblage des contacts focaux **(Ridley et al., 1992)** tandis que les protéines Rac1 et Cdc42 induisent respectivement la formation de lamellipodes (en activant de façon indirecte le complexe multi-protéique WAVE) et de filopodes (en stimulant indirectement le complexe Arp2/3) **(Ehrlich et al., 2002; Ridley et al., 1992)** aussi bien dans les fibroblastes que dans les cellules endothéliales (**figure 19**).

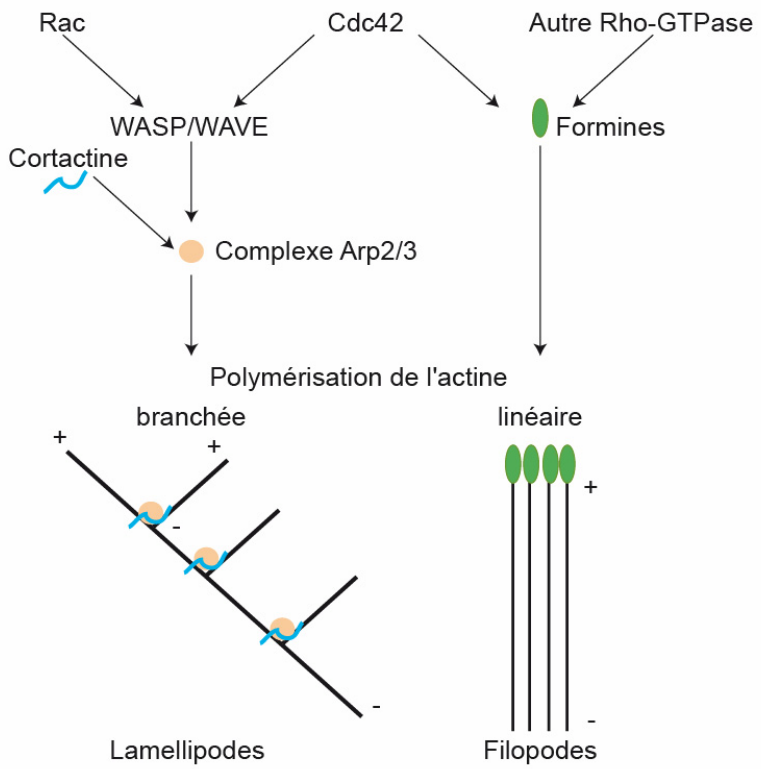


Figure 19 : Régulation de la dynamique du cytosquelette d'actine dans les protrusions membranaires par les GTPases Rho. D'après **(Faix and Grosse, 2006; Lua and Low, 2005; Ridley, 2006)**.
Les protéines Rac et Cdc42 activent les protéines de la famille WASP (Wiscott-Aldrich Protein Syndrome) et WAVE (WASP-family verprolin-homologous protein), activant à leur tour le complexe Arp2/3. L'association de ce complexe avec la cortactine augmente sa capacité à nucléer l'actine à partir de filaments pré-existants. Ainsi un réseau de filaments d'actine ramifiés, souvent associé à la formation des lamellipodes, est produit. D'autre part, Cdc42 et d'autres GTPases Rho activent les protéines de la famille des formines. Ces facteurs nucléateurs de l'actine assurent une polymérisation en longs filaments non branchés, associés à la formation des filopodes.

La formation de fibres de stress dans les cellules endothéliales est régie par un accroissement de l'activité actomyosine en réponse à différents stimuli, dont le mieux caractérisé implique la phosphorylation de la chaîne légère de la myosine 2 (MLC, Myosin Light Chain) **(Broman et al., 2007)**. Cette phosphorylation induit une modification conformationnelle de la myosine 2, ce qui la rend apte à interagir avec l'actine et à glisser le long des filaments d'actine, phénomène à la base de la contractilité cellulaire. MLC est phosphorylée par les kinases MLCK (Myosin Light Chain Kinases) et les serine/thréonine kinases ROCK (Rho kinases), qui sont des effecteurs des protéines Rho **(Amano et al., 1996; Ridley, 2006) (Broman et al., 2007)**. ROCK assure la phosphorylation de MLC par deux mécanismes. D'un part, ROCK phosphoryle directement MLC. D'autre part, ROCK phosphoryle MLCP (Myosin Light Chain Phosphatase) ce qui l'inactive, l'empêchant ainsi d'inhiber MLC **(Amano et al., 1996)** (**figure 20**).

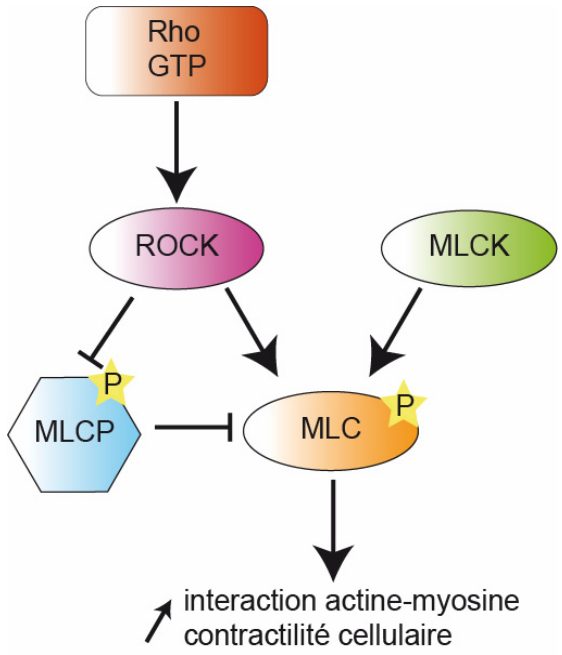


Figure 20 : Régulation de la contractilité actomyosine par Rho. D'après **(Olson, 2004)**.
Rho active la serine/thréonine kinase ROCK. ROCK, comme les MLCK, activent MLC en la phosphorylant. De plus, ROCK inhibe, en la phosphorylant, l'action de la phosphatase MLPC sur MLC. Ces événements conduisent à l'activation par phosphorylation de MLC, ce qui augmente les interactions actine-myosine et génère des forces contractiles dans la cellule.

ROCK: Rho kinases; MLC : Myosin Light Chain ; MLCK : Myosin Light Chain Kinases; MLCP : Myosin Light Chain Phosphatase.

Dans l'endothélium, les GTPases Rho régulent entre autre la réponse aux forces de cisaillement occasionnées par l'écoulement du sang dans les vaisseaux. En effet, ces forces se traduisent par une polarisation, une migration et une élongation des cellules endothéliales le long de l'axe du flux sanguin résultant d'un remodelage drastique du cytosquelette d'actine **(Tzima, 2006; Wojciak-Stothard and Ridley, 2003)**. Ces forces induisent une activation rapide des trois sous-classes Rho, Rac et Cdc42, chacune d'entre elles étant importantes à des stades différents du processus, puisqu'elles vont agir sur le cytosquelette d'actine et donc sur la forme des cellules. Ainsi, RhoA, qui est activée dans les cinq minutes qui suivent l'établissement du flux, conduit à un arrondissement des cellules. Alors que RhoA retourne à

son niveau de base, Rac1 et Cdc42 sont à leur tour activées. Lorsque ces protéines atteignent leur activation maximale, les cellules s'étalent à nouveau et s'allongent dans le sens du flux.

Les GTPases Rho participent également à la modulation de la perméabilité vasculaire. Les agonistes inflammatoires tels que l'histamine ou la thrombine provoquent une ouverture des jonctions endothéliales qui implique la phosphorylation de MLC **(Garcia et al., 1995)**. Le fait que des inhibiteurs de MLCK puissent prévenir la phosphorylation de MLC et atténuer l'accroissement de la perméabilité *in vivo* indique que Rho participe à l'ouverture des jonctions endothéliales **(Vouret-Craviari et al., 2002; Yuan, 2002)**.

La stimulation de cellules endothéliales par la thrombine induit une déstabilisation des jonctions adhérentes, une activation de Rho, une modification du cytosquelette d'actine en fibres de stress et une augmentation de la perméabilité para-cellulaire **(Kouklis et al., 2004; Wojciak-Stothard et al., 2001)**. La reformation des jonctions s'accompagne d'une activation de Cdc42, qui est transportée du cytoplasme vers la membrane plasmique dans l'heure qui suit la stimulation **(Kouklis et al., 2004)**. Ce phénomène participe à la reformation des jonctions puisque l'inhibition de Cdc42 retarde considérablement la restauration de l'intégrité de la monocouche endothéliale. De plus, il a été montré dans un modèle murin transgénique que l'absence de Cdc42 induit un délai dans la restauration de la barrière endothéliale pulmonaire. Ceci suggère que Cdc42 est elle aussi impliquée dans la restauration de l'intégrité de l'endothélium **(Broman et al., 2007)**.

Rac1 apparaît comme un régulateur important dans le maintien de l'intégrité des jonctions intercellulaires **(Wojciak-Stothard and Ridley, 2003)**. Cette idée est sous-tendue par le fait qu'un dominant négatif de Rac accroît la perméabilité endothéliale et affecte les jonctions adhérentes et serrées en l'absence de toute stimulation **(Wojciak-Stothard et al., 2001)**.

La stabilité des jonctions endothéliales requiert une balance très fine entre les activités des deux GTPases Rho et Rac, qui agissent de manière antagoniste. Bien qu'il ait été observé que l'inhibition de Rho accroisse la capacité de l'endothélium à former une barrière étanche **(Carbajal and Schaeffer, 1999)**, l'activité basale de Rho est nécessaire pour maintenir efficace cette barrière, puisqu'une inactivation à long terme de Rho conduit à une déstabilisation des jonctions et à un accroissement de la perméabilité vasculaire **(Hordijk et al., 1999)**. De même, l'activité de Rac est requise pour l'assemblage des jonctions interendothéliales **(Lampugnani et al., 2002)** mais l'expression d'une forme constitutivement active de RhoA conduit à la formation de fibres de stress dans les cellules endothéliales **(Wojciak-Stothard et al., 1998)** et à une rupture des jonctions intercellulaires **(Wojciak-**

Stothard et al., 2001). Cet effet antagoniste de Rho et Rac est aussi observé dans des tissus exprimant d'autres cadhérines tels les myoblastes qui expriment la N-cadhérine **(Comunale et al., 2007)**.

Chacune des GTPases Rho pourrait avoir des effets antagonistes sur les jonctions adhérentes en activant différentes voies de signalisation **(Sahai and Marshall, 2002)** (**figure 21**). En effet, il a été montré dans des cellules épithéliales (MDCK et HCT116) que Rho est capable d'activer la polymérisation de l'actine *via* la formine Dia, ce qui permet d'amener le complexe E-cadhérine/β-caténine à la périphérie des cellules et conduit à la stabilisation des jonctions intercellulaires. En parallèle, Rho est capable d'activer la contractilité cellulaire *via* ROCK, conduisant à l'ouverture des jonctions adhérentes. De plus, Rho est impliquée dans le regroupement des molécules de E-cadhérine à la membrane, phénomène nécessaire à la maturation de jonctions dans un processus dépendant de la dynamique de l'actine **(Bishop and Hall, 2000; Braga, 1999; Braga et al., 1999)**.

Comme indiqué précédemment dans le paragraphe 5.1.4, la VE-cadhérine est capable, lorsqu'elle n'est pas engagée dans une interaction homophilique, d'activer Rac1 et Cdc42 **(Kouklis et al., 2003)**. De plus, Cdc42 contrôle l'association de l'α-caténine et donc indirectement la stabilité des jonctions adhérentes **(Broman et al., 2006)**. En considérant d'une part que la VE-cadhérine est liée aux filaments d'actine et que d'autre part, elle interagit avec les GTPases Rho qui régulent le cytosquelette d'actine, il est envisageable que l'engagement de la VE-cadhérine dans une interaction homophilique puisse réguler la dynamique du cytosquelette d'actine **(Fukuhra et al., 2006)**.

Les interactions homophiliques contractées entre molécules de E-cadhérine à la surface de cellules induisent le recrutement et l'activation de la myosine 2 au niveau des contacts intercellulaires **(Shewan et al., 2005)**. Réciproquement, l'inhibition de l'activité de la myosine 2 par la blebbistatine ou par ML-7 empêche les cellules de concentrer la E-cadhérine au niveau des jonctions intercellulaires ce qui décroît leur capacité adhésive. L'inhibition de la voie Rho/ROCK produit le même effet que celui de l'inhibition de la myosine 2. Cette protéine peut donc être considérée comme un effecteur-clé de la signalisation de Rho/ROCK qui régule l'adhérence entre les cellules en régissant la capacité des cellules à concentrer les cadhérines aux zones de contacts en réponse aux interactions homophiliques. La myosine VI a, comme la myosine 2, un rôle dans l'établissement de jonctions adhérentes cohésives **(Maddugoda et al., 2007)**. La myosine VI est recrutée aux zones de contacts intercellulaires établies par la E-cadhérine. En l'absence de myosine VI, les jonctions adhérentes sont perturbées et la E-cadhérine adopte une distribution discontinue aux contacts intercellulaires.

La E-cadhérine et la myosine VI sont en interaction par l'intermédiaire de la vinculine. En l'absence de vinculine, le phénotype observé rappelle celui obtenu en l'absence de myosine VI. La question qui se pose désormais est de savoir si dans les cellules endothéliales, la myosine 2 ou une autre myosine joue un rôle similaire dans la concentration de la VE-cadhérine aux zones de contacts intercellulaires.

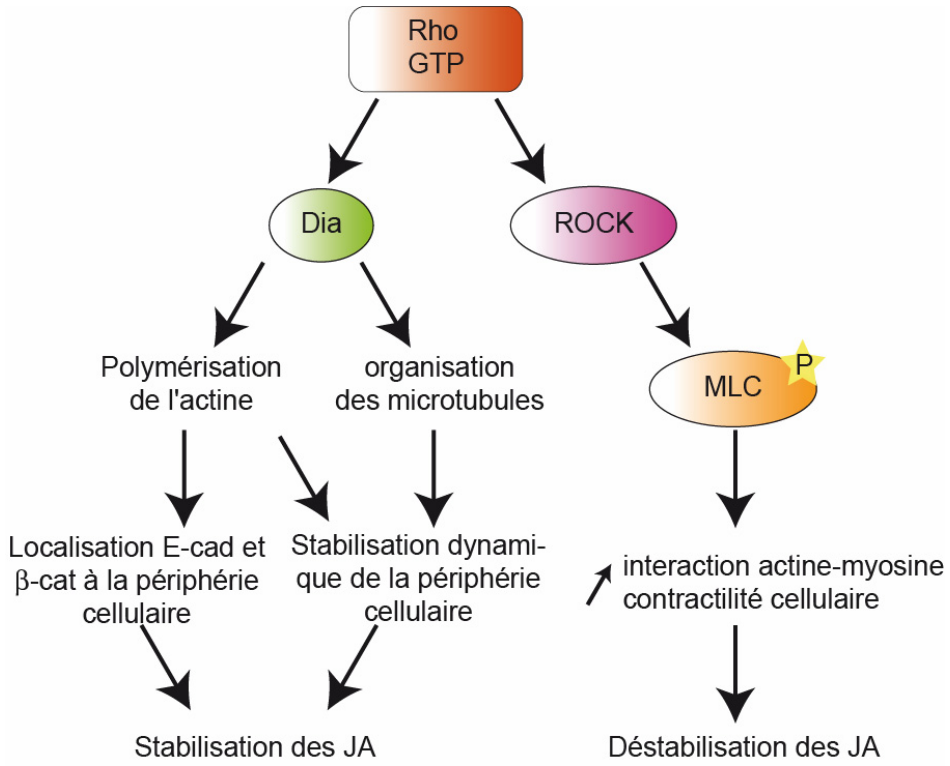


Figure 21 : Voies de signalisation antagonistes engendrées par Rho D'après **(Ridley, 2006; Sahai and Marshall, 2002)**.
Rho peut déstabiliser les jonctions adhérentes (JA) par son action activatrice de MLC par l'intermédiaire de ROCK. Par opposition, Rho, en agissant sur la formine Dia et le cytosquelette, peut stabiliser la JA.

Un autre membre de la famille des GTPases, Rap1, est activé lorsque la VE-cadhérine est engagée dans des interactions homophiliques **(Sakurai et al., 2006)**. Le signal intracellulaire induisant l'activation de Rap1 nécessite la protéine MAGI-1 qui s'associe au niveau des jonctions intercellulaires avec la β-caténine et avec la protéine PDZ-GEF1, une protéine GEF régulatrice de Rap-1. Une fois activée, Rap1 est impliquée dans la maturation des jonctions régies par la VE-cadhérine en permettant la localisation de la vinculine au niveau des jonctions adhérentes. Epac, une autre protéine GEF, est aussi impliquée dans l'activation de Rap1 en remplacement de MAGI-1 **(Cullere et al., 2005)**.

5.3.3.3.1.2 Les nucléateurs de l'actine

La protéine WASP (Wiscott-Aldrich Syndrome Protein) et les autres membres de la famille sont des protéines qui sont impliquées dans l'induction de la polymérisation de l'actine **(Ridley, 2006; Takenawa and Suetsugu, 2007)**. La famille de WASP et WAVE (WASP-family verprolin-homologous protein) comprend cinq membres : WASP, N-WASP (Neural-WASP), WAVE-1, WAVE-2, WAVE-3 **(Takenawa and Suetsugu, 2007)**. Bien qu'initialement découverte dans le cerveau, il s'avère que N-WASP s'exprime dans de nombreux autres tissus. Les membres de la famille WASP sont la cible de Rho-GTPases. Le facteur inducteur de la nucléation N-WASP se lie directement à Cdc42 **(Lua and Low, 2005; Ridley, 2006; Takenawa and Suetsugu, 2007)**. Le complexe N-WASP/Cdc42 entre en interaction directe avec le complexe Arp (Actin-Related Proteins) 2/3, présenté ci-après, ce qui aboutit à l'activation de ce dernier. Le complexe Arp2/3 peut également être activé par WAVE-2, quand cette protéine interagit indirectement avec Rac. Des données récentes ont montré que la réorganisation du cytosquelette d'actine, régit par le couple Rac/WAVE-2, n'a pas seulement un effet sur la formation des lamellipodes **(Yamazaki et al., 2007)**. En réalité, WAVE-2 interviendrait également dans la stabilisation des jonctions naissantes en y recrutant des filaments d'actine et enfin, participerait à l'organisation des jonctions matures.

Le complexe Arp2/3 est constitué de l'association des deux protéines Arp 2 et Arp3, et de cinq protéines ARPC (Actin-Related Protein Complex) plus petites **(Goley and Welch, 2006)**. Il s'agit d'un complexe nucléateur de l'actine qui ne dispose que d'une faible activité intrinsèque. Il doit donc être activé par deux facteurs inducteurs de la nucléation : la cortactine, sans doute en synergie avec WASP. Un complexe ternaire se forme entre la cortactine, liée à l'actine et à Arp3, et WASP, lié à Arp2 et ARPC1. Cette association augmente le pouvoir nucléateur du complexe Arp2/3 **(Daly, 2004; Lua and Low, 2005; Uruno et al., 2001)**. Le rôle de la cortactine s'avère fondamental. Recrutée aux zones de contacts intercellulaires avec Arp2/3, en réponse à l'interaction homophilique entre molécules de E-cadhérine, elle permet aux contacts initiaux intercellulaires de s'étendre latéralement et de former des jonctions proprement dites **(Helwani et al., 2004)**. Le complexe Arp2/3/WASP/cortactine ne peut induire la polymérisation de l'actine qu'à partir d'un filament d'actine préexistant. La formation d'un nouveau filament à partir du précédent produit des ramifications en « Y », conduisant à un réseau ramifié **(Goley and Welch, 2006; Kobielak and Fuchs, 2004)**. Ce processus est surtout associé à la formation des lamellipodes stimulée par Rac1. La Rho-GTPase, activée et recrutée aux sites de contacts intercellulaires,

promeut le recrutement du complexe Arp2/3 aux sites des jonctions naissantes, favorisant la formation d'un réseau d'actine branché **(Perez-Moreno and Fuchs, 2006)**.

La famille des formines constitue le troisième type de nucléateurs de l'actine. Il s'agit de protéines multi-modulaires qui régulent la dynamique du cytosquelette **(Faix and Grosse, 2006; Wallar and Alberts, 2003)**. Elles contiennent jusqu'à trois domaines d'homologie des formines, FH (Formin Homology), notés FH1 à FH3. Le domaine FH2 est le plus conservé et sa présence définit l'appartenance à cette famille des protéines homologues à la formine. Elles présentent des sites de liaison aux Rho-GTPases, et un site comparable au motif WH2 (Wiscott-Aldrich syndrome protein-homology) des protéines WASP. Les formines, par leurs domaines FH1-FH2, ont la propriété de nucléer *de novo* l'actine en filaments non ramifiés, en augmentant significativement la vitesse de polymérisation. Le processus de nucléation, indépendant de Arp2/3, est modulé par la profiline. Cette protéine a la propriété de se lier aux monomères d'actine G et de promouvoir l'ajout de monomères à l'extrémité barbée de filaments d'actine en croissance **(Pollard and Borisy, 2003)**. C'est donc la liaison de la profiline au domaine FH1 de la formine qui régule le taux de polymérisation de l'actine en fonction de la formine considérée **(Faix and Grosse, 2006; Kovar and Pollard, 2004; Wallar and Alberts, 2003)**. Les formines, dans leur grande majorité, se lient à l'extrémité barbée des filaments d'actine, mais ne constituent pas des coiffes étanches qui inhiberaient leur croissance **(Faix and Grosse, 2006; Zigmond, 2004)**. En fait, ces nucléateurs de l'actine restent stablement fixés aux filaments en croissance tandis que les monomères d'actine s'ajoutent à l'extrémité. Ainsi, par ce mécanisme et en empêchant la fixation de protéines « coiffantes » sur les filaments, les formines sont capables d'induire la formation de longs filaments d'actine. Chaque membre de la famille des formines fait l'objet d'une régulation particulière par une Rho-GTPase donnée **(Wallar and Alberts, 2003; Zigmond, 2004)**. Dans les cellules épithéliales, la formine-1, en interaction avec l'α-caténine, est recrutée aux jonctions adhérentes naissantes, où elle active la polymérisation de filaments d'actine **(Kobielak et al., 2004)**.

5.3.3.3.1.3 La dynamique du cytosquelette dans l'établissement des jonctions adhérentes

In vitro, au fur et à mesure que s'établit la confluence des cellules endothéliales, le cytosquelette d'actine subit un fort remodelage, qui le fait passer de fibres de stress parallèles entre elles, à un anneau sous cortical dense (**figure 19** et **(Lampugnani et al., 1995)**). *In vivo*,

la dynamique de l'actine qui accompagne la réorganisation des structures jonctionnelles est fondamentale pour le développement embryonnaire, la morphogenèse et la réparation tissulaire **(Perez-Moreno and Fuchs, 2006)**. Pour étoffer nos connaissances concernant la formation et la régulation des jonctions adhérentes, il devient impératif de comprendre le rôle que joue l'actine et de déterminer quelles protéines au sein du complexe jonctionnel assurent le lien entre les cadhérines et le cytosquelette d'actine.

Les cadhérines non engagées dans des interactions homophiliques sont à même de diffuser latéralement à la surface cellulaire. Dès l'initiation des contacts, la diffusion des cadhérines est alors limitée et elles commencent à s'agréger **(Mege et al., 2006)**. A ce stade, les cadhérines sont déjà liées aux fibres de stress d'actine (résultats acquis au laboratoire, voir annexe 2 et **(Lambert et al., 2002)**). Dans les prémices des contacts en cours de formation, un réseau de fins filaments d'actine déjà présent dans la cellule est mis en jeu **(Zhang et al., 2005)**. A la formation de ces nouveaux contacts, une signalisation intracellulaire par les Rho-GTPases se met en place. Dans les cellules épithéliales, RhoA et Rac1 jouent un rôle important dans la transition entre un état fibroblastique caractéristique d'une cellule isolée et un état de type épithélial polarisé statique **(Jou and Nelson, 1998).** Cette transition coïncide avec les changements qui s'opèrent dans l'organisation des filaments d'actine. RhoA régule au niveau de la membrane basale les fibres de stress dont la formation est une caractéristique des cellules mobiles isolées **(Perez-Moreno and Fuchs, 2006)**. L'initiation des contacts cellule-cellule conduit à la formation de nouvelles structures d'actine et à une spécialisation des membranes latérale et apicale. Bien que RhoA puisse jouer un rôle supplémentaire dans cette réorganisation, Rac1 semble jouer un rôle majeur dans l'assemblage circonférentiel des structures d'actine le long des membranes latérale et apicale. Ce dernier phénomène s'accompagne d'une néosynthèse de filaments, localisés spécifiquement aux zones de jonctions **(Perez-Moreno and Fuchs, 2006; Zhang et al., 2005)**. Ainsi peut être défini le réseau d'actine jonctionnel lié à la jonction primitive.

Il s'agit maintenant pour les cellules d'étendre leurs zones d'interaction. Lors de contacts intercellulaires naissants, il se forme des protrusions membranaires qui permettent aux cellules de contracter des interactions *via* leurs molécules de cadhérine et former de nouvelles jonctions **(Perez-Moreno and Fuchs, 2006)**. Ces phénomènes s'accompagnent d'une régulation très fine de l'organisation du cytosquelette d'actine par les GTPases Rho qui régissent les transitions entre les différents états. En effet, dans les MDCK, la formation d'un premier contact entre cellules est un évènement opportuniste qui intervient quand deux cellules se touchent. Cependant, après avoir été mises en contact, les cellules répondent

rapidement et des lamellipodes apparaissent au niveau du contact intercellulaire en développement. Ce changement coïncide généralement avec un accroissement de l'accumulation de Rac1 au niveau de ce contact (**Ehrlich et coll, Developmental Cell, 2002**). En fait, la localisation de Rac1 et l'activité lamellipodiale sont restreintes aux sites de contact les plus récents et disparaissent des sites les plus anciens. Ceci suggère qu'un des rôles de Rac1 est d'initier les prémices de contact entre les cellules plutôt que de maintenir des jonctions intercellulaires stables (**Ehrlich et coll, Developmental Cell, 2002**).

La force des contacts engendrés par l'interaction entre molécules de E-cadhérine à l'interface cellulaire augmente au cours du temps et dépend de la ré-organisation du cytosquelette d'actine sous le contrôle des GTPases Rac et Cdc42 **(Chu et al., 2004)**. On voit se former des lamellipodes répondant aux signaux induits entre autres par l'activation de Rac1, qui est alors recrutée aux sites de contacts entre les cellules, d'une manière dépendante de la PI3 Kinase **(Gavard et al., 2004)**. Ceci promeut le recrutement du complexe Arp2/3 aux zones de contacts, et celui de la cortactine, qui colocalise avec l'α-caténine, aux contacts intercellulaires **(Gavard et al., 2004; Helwani et al., 2004)**. Ces associations favorisent la formation d'un réseau d'actine branché. De plus, l'engagement de la E-cadhérine dans une interaction homophilique induit le recrutement du complexes Arp2/3 aux sites de jonctions **(Scott et al., 2006)**. Le branchement de l'actine induit par ce complexe produit une force de poussée qui rapproche les deux cellules en contact **(Kovacs et al., 2002; Verma et al., 2004)**. Ceci permet l'extension du contact par l'assemblage local d'actine et la formation de lamellipodes. Cet effet est réduit au fur et à mesure de la maturation de la jonction.

A la formation de lamellipodes s'ajoute celle des filopodes, dont l'existence impliquerait les formines. En effet, il a été démontré que la formine-1 est recrutée aux jonctions naissantes par l'α-caténine, avec laquelle une interaction a été mise en évidence grâce à la méthode du double hybride **(Kobielak et al., 2004)**. Là, la formine initie la nucléation de l'actine en filaments radiaux et contribue en cela à la stabilisation des jonctions. Ce faisant, les contacts initiaux entre cadhérines seraient étendus le long des membranes en contact.

En résumé, l'activation du complexe Arp2/3 par la cortactine et les Rho-GTPases conduit à la ramification de l'actine et à la formation de lamellipodes **(Mege et al., 2006)**. Les formines, quant à elles, induisent la formation de filaments linéaires d'actine et contribuent à la formation de filopodes. Par ces deux mécanismes, le cytosquelette d'actine permet l'extension de la zone de contact intercellulaire et par la même, la zone de jonction, en faisant se rencontrer de nouvelles molécules de cadhérines. Peu à peu, au cours de la maturation des

jonctions, le réseau de fins filaments d'actine disparait au profit des filaments jonctionnels (**figure 19** et **(Zhang et al., 2005)**).

Les contacts initiaux intercellulaires ainsi établis et étendus doivent se stabiliser afin de former des jonctions adhérentes solides. Le remodelage du cytosquelette d'actine se poursuit et a pour effet de renforcer les jonctions naissantes. Ce processus nécessite la formation d'agrégats de cadhérines qui sont fortement liées aux câbles d'actine **(Gavard et al., 2004; Mege et al., 2006)**. Cette agrégation latérale des cadhérines est nécessaire à la formation d'une jonction fonctionnelle **(Brieher et al., 1996; Tomschy et al., 1996)**. Le mécanisme par lequel est induit le remodelage de l'actine est inconnu mais il semble que, sous l'action de RhoA, les fibres de stress se réorganisent afin de former un réseau sous-cortical (**figure 18** et **(Mege et al., 2006; Perez-Moreno and Fuchs, 2006)**). A l'heure actuelle, ce phénomène pourrait être attribué également à l'α-caténine, puisqu'il a été suggéré que les dimères d'α-caténine pourraient réguler la transition entre les filaments branchés et les câbles d'actine **(Drees et al., 2005)**. Au cours de la maturation des contacts intercellulaires, la densité locale des protéines des jonctions adhérentes augmente, et l'α-caténine s'y accumule, sans être apparemment attachée au complexe cadhérine/β-caténine. Là, l'α-caténine, probablement associée en homodimères, entrerait en compétition avec le complexe Arp 2/3 et compacterait les filaments d'actine, contribuant ainsi à la réorganisation du cytosquelette et à la maturation de jonctions. Ce rôle pourrait être également assuré par deux autres protéines capables de lier l'actine. La vinculine, qui dans certaines conditions peut se dimériser, pourrait jouer le même rôle que l'α-caténine **(Bakolitsa et al., 2004; Mege et al., 2006)**. C'est également le cas pour l'α-actinine, qui, en formant un homodimère tête-bêche, aurait la capacité de réticuler les filaments nouvellement synthétisés. A l'heure actuelle, la nature des protéines établissant le lien entre les cadhérines et le cytosquelette d'actine dans les jonctions adhérentes matures, n'est pas encore connue. MM. Weis et Nelson envisagent par exemple la nectine ou la moésine dans cette fonction, mais rien n'a formellement été établi **(Weis and Nelson, 2006)**. Autre possibilité liée aux radeaux lipidiques. En effet, en particulier dans les cellules C2C12 qui expriment la N-cadhérine, il a été montré que les radeaux lipidiques jouent un rôle dans la stabilisation des jonctions intercellulaires **(Causeret et coll., 2005).** Leur déstabilisation entraîne une désorganisation des contacts intercellulaires dépendant de la N-cadhérine sans qu'il y ait modification de l'association entre la N-cadhérine et les caténines et disparition des complexes cadhérine-caténines de la membrane.

Toutefois, dès lors que la jonction mature est établie, le cytosquelette d'actine reste dynamique. Kametani et coll., en utilisant des méthodes de vidéo-microscopie, ont démontré

que le complexe jonctionnel VE-cadhérine/p120/β-caténine est capable de se mouvoir le long de l'interface cellulaire d'une façon dépendante du cytosquelette d'actine **(Kametani and Takeichi, 2007)**. Ainsi la jonction adhérente n'est pas une structure figée comme cela était imaginé jusqu'à récemment, mais il s'agit bel et bien d'une structure dynamique fortement dépendante du cytosquelette d'actine.

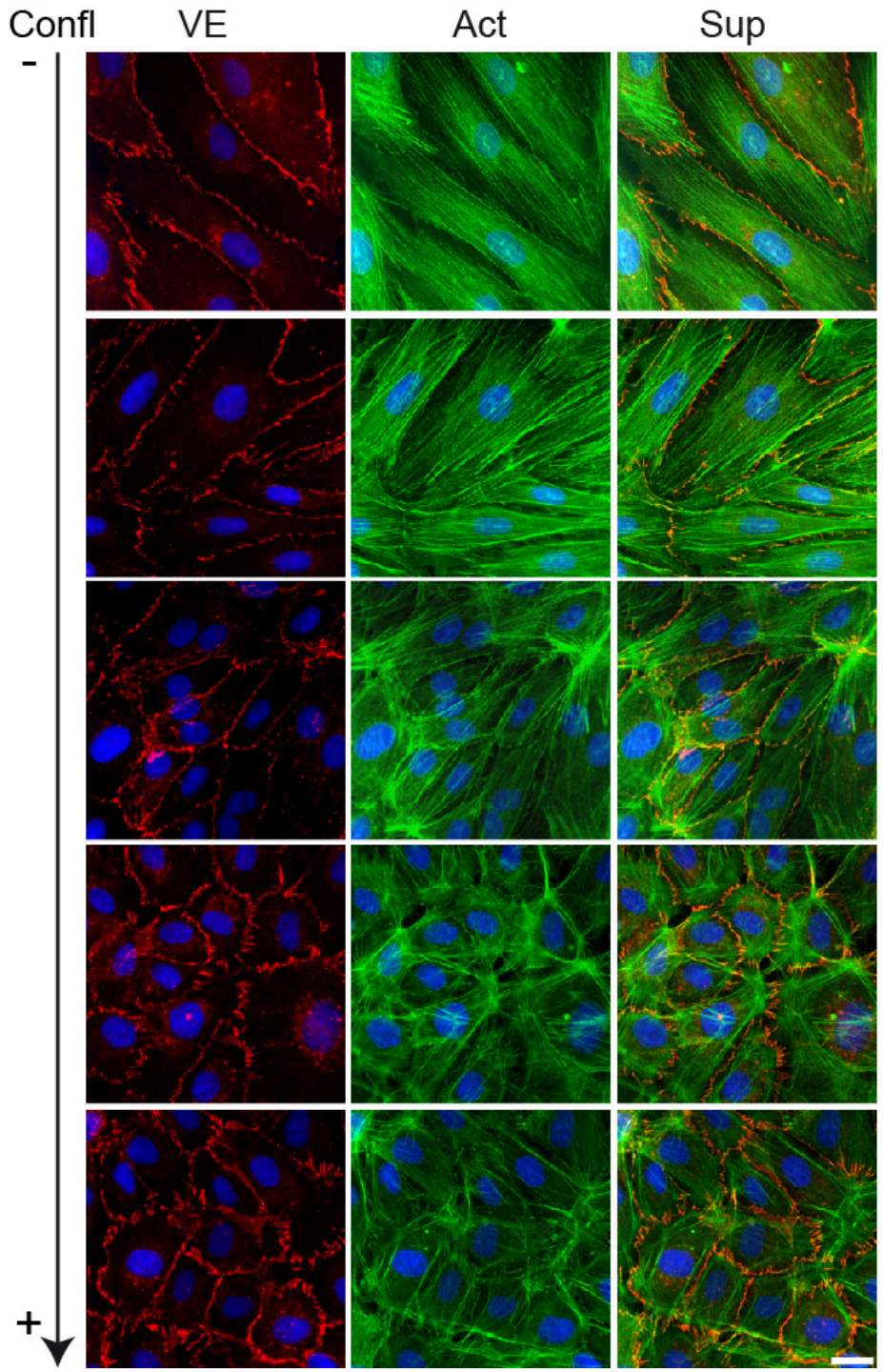


Figure 22 : Remodelage du cytosquelette d'actine au cours de l'augmentation de la densité des cellules HUVEC.
Un double immunomarquage (VE-cadhérine (VE) : rouge ; actine (Act) : vert ; superposition : Sup) a été réalisé sur des cellules HUVEC à différents états de confluence (Confl). Les cellules sub-confluentes présentent un cytosquelette d'actine constitué de fibres de stress linéaires et parallèles entre elles. Plus la confluence augmente, plus le réseau d'actine se modifie, et se ramifie. Les cellules très confluentes présentent alors un cytosquelette d'actine sous-membranaire, le réseau sous-cortical. La VE-cadhérine est présente à la surface des cellules peu confluentes. Plus la confluence augmente, plus la VE-cadhérine perd sa disposition en zigzag à la membrane au profit d'un agencement continu et épais le long des jonctions intercellulaires. Echelle : 20 µm

OBJECTIFS DE L'ETUDE

OBJECTIFS DE L'ETUDE

Les travaux réalisés au cours de cette thèse visent à identifier les composants protéiques de la jonction adhérente inter-endothéliale et à comprendre son fonctionnement. Comme nous l'avons vu précédemment, cette structure jonctionnelle est au centre de la régulation des jonctions de l'endothélium vasculaire. En effet, elle est impliquée dans le contrôle de la perméabilité et de l'intégrité vasculaire, dans l'angiogenèse, dans l'extravasation des leucocytes et vraisemblablement dans celle des cellules tumorales **(Byrne et al., 2005; Hermant, 2006; Wallez et al., 2006b)**. Pourtant la nature des partenaires protéiques de la VE-cadhérine qui composent le complexe jonctionnel est encore sujette à controverse. Jusqu'à présent, il était admis que les jonctions adhérentes sont des complexes protéiques simples dans lesquels la VE-cadhérine est associée directement à la β- ou la γ-caténine et à p120, la connexion au cytosquelette d'actine se faisant par l'intermédiaire de l'α-caténine, elle-même fixée sur la β- ou la γ-caténine **(Dejana, 2004; Gumbiner, 2005; Lampugnani et al., 1995)**. Dans l'endothélium vasculaire adulte, ou dans un tapis de cellules endothéliales confluentes, les jonctions adhérentes matures sont considérées comme quiescentes, et c'est donc une vue conventionnelle et figée de la jonction qui a prévalue jusqu'à récemment **(Gates and Peifer, 2005)**.

Cependant, l'idée de l'importance du cytosquelette d'actine a pris de l'ampleur ces dernières années et il est désormais admis que la dynamique du cytosquelette d'actine contribue largement à la maturation des jonctions adhérentes ainsi qu'au maintien des fonctionnalités de l'endothélium vasculaire (**figure 19** et **(Waschke et al., 2005)**). Le lien entre les cadhérines et l'actine a été attribué à l'α-caténine en raison de sa capacité à interagir avec les filaments d'actine **(Pokutta and Weis, 2000; Rimm et al., 1995)**. Plusieurs protéines se liant à l'actine et capables d'interagir avec l'α-caténine pourraient régir la connexion entre les complexes cadhérines/caténines et les filaments d'actine **(Jamora and Fuchs, 2002)**. Parmi ces protéines, on trouve l'α-actinine, la vinculine ou les formines qui interagissent à la fois avec les filaments d'actine et avec l'α-caténine. Les travaux des équipes de MM Nelson et Weis ont remis en question le fait que l'α-caténine assure la connexion entre le complexe cadhérine/caténine et l'actine **(Drees et al., 2005; Yamada et al., 2005b)**. D'après ces auteurs, l'α-caténine ne ferait pas partie du complexe des jonctions matures, et serait incapable de lier les filaments d'actine à la E-cadhérine. Se pose alors aujourd'hui la question de la connexion de ce cytosquelette à la jonction, et quelles sont les protéines qui en sont responsables.

Afin de pourvoir comprendre l'architecture et la régulation de la jonction adhérente endothéliale, nous nous sommes attachés à étudier ce type de jonctions matures. Pour ce faire, nous avons effectué une étude protéomique par spectrométrie de masse qui nous a permis d'identifier un grand nombre de protéines constituant les jonctions adhérentes inter-endothéliales. Certaines protéines n'avaient jamais été considérées comme pouvant interagir directement avec le complexe jonctionnel, à l'exemple de l'annexine 2 et de la moésine. Bien que ces deux dernières protéines aient été impliquées dans la régulation de la formation de la jonction adhérente, aucune interaction physique avec la VE-cadhérine ou ses partenaires cytosoliques n'avaient été mise en évidence **(Koss et al., 2006; Yamada et al., 2005a)**. En conséquence, nous avons choisi d'étudier ces deux protéines et tenter de déterminer leurs rôles dans la mise en place, le maintien et la régulation des jonctions adhérentes. A terme, ces connaissances fondamentales pourront nous aider à comprendre l'architecture et la régulation de la jonction adhérente endothéliale dans des conditions physiologiques normales mais aussi dans des cas pathologiques comme la formation de métastases ou les phénomènes d'inflammation chronique. Le but à long terme vise à développer des thérapies curatives de pathologies vasculaires en régulant l'état des jonctions adhérentes. Nous avons déjà tenté d'appliquer cette idée. En nous référant aux résultats acquis par l'équipe dans les années précédentes, nous avons entrepris de développer une technique permettant de rechercher de nouvelles molécules à potentiel thérapeutique pour lutter contre l'infiltration leucocytaire observée dans les maladies à inflammation chronique.

RESULTATS

RESULTATS

1 COMPOSITION PROTEIQUE DE LA JONCTION ADHERENTE ENDOTHELIALE QUIESCENTE

1.1 Contexte expérimental

Dans l'optique d'appréhender globalement la composition du complexe jonctionnel à base de VE-cadhérine, nous avons développé une technique d'immunoprécipitation en conditions de lyse douces couplée à une analyse par spectrométrie de masse en tandem (nanoLC-ESI-MS/MS). Pour cette étude, nous avons collaboré avec le Dr Michel Jaquinod du laboratoire EDyP (dirigé par Dr J Garin, iRTSV, CEA Grenoble), mettant à profit leurs compétences dans l'analyse à haut débit du protéome.

La technique d'immunoprécipitation, utilisant un anticorps dirigé contre la VE-cadhérine, fixé à des billes de protéine A-sépharose (PAS), permet d'isoler notre protéine d'intérêt et les protéines qui lui sont associées dans les jonctions matures quiescentes, à partir de lysats de cellules HUVEC confluentes. Le défi à relever pour cette étude était de s'affranchir de la quantité d'anticorps nécessaire à l'immunoprécipitation. En effet, les anticorps sont en quantité telle, qu'une fois élués avec les protéines immunoprécipitées, ils rendent impossible la détection par spectrométrie de masse des autres protéines. La solution a consisté à lier de façon covalente les anticorps aux billes PAS à l'aide d'un réticulant chimique homobifonctionnel non clivable, l'éthylène glycolbis[succinimidylsuccinate] (EGS). Cette méthode permet de retenir l'anticorps anti-VE-cadhérine sur les billes PAS lors de l'élution des complexes immunoprécipités. Le sous-protéome ainsi obtenu est suffisamment pur pour être compatible avec l'analyse spectrométrique.

De plus, il a fallu trouver des conditions de lyse suffisamment drastiques pour dissocier les membranes plasmiques, mais suffisamment douces par ailleurs pour conserver les interactions protéiques au sein du complexe jonctionnel. La mise au point de ces techniques nous a permis de mener à bien l'identification des protéines du complexe à base de VE-cadhérine, qui est présentée dans l'article ci-après.

1.2 Article n°1 : étude du complexe protéique de la jonction adhérente

Proteomic analysis of VE-cadherin-based adherens junctions

Journal:	*PROTEOMICS*
Manuscript ID:	proteo-2006-00475
Wiley - Manuscript type:	Research Article
Date Submitted by the Author:	03-Jul-2006
Complete List of Authors:	Gulino-Debrac, Danielle; Institut de Biologie Structurale
Key Words:	refractionation, one dimensional gel electrophoresis, Cytoskeleton

powered by ScholarOne
Manuscript Central™

Proteomic analysis of VE-cadherin-based adherens junctions

[1] S. Heyraud, [2] M. Jaquinod, [1] C. Durmort, [1] E. Concord, [3] J.P. Schaal, [2] J. Garin, [1] D. Gulino-Debrac

[1] Institut de Biologie Structurale Jean-Pierre Ebel (UMR 5075 CNRS/ CEA/ Université Joseph Fourier), Laboratoire d'Ingénierie des Macromolécules, 41 rue Jules Horowitz, 38027 Grenoble Cedex 1, France

[2] Laboratoire de Chimie des Protéines (ERM 0201 INSERM/ CEA/ Université Joseph Fourier) Département Réponse et Dynamique cellulaires (DRDC), CEA-Grenoble, 17 avenue des Martyrs, 38054 Grenoble cedex 9, France

[3] Département de Gynécologie Obstétrique, Centre Hospitalier Universitaire Michallon, BP 217, 38043 Grenoble Cedex 09, France

For Peer Review

Running title: Protein composition of endothelial adherens junctions

Corresponding author: Danielle Gulino-Debrac, fax: 33 4 38 78 54 94, email: gulino@ibs.fr

Keywords: adherens junction, mass spectrometry, VE-cadherin,

Abbreviations: ARP2/3: complex containing Actin-Related Proteins Arp2 and Arp3**;** BHK cell: Baby Hamster Kidney cell; BIP: immunoglobulin heavy chain binding protein; E-, N-, VE-cadherins: Epithelial, Neuronal, Vascular Endothelial cadherins; EGS: Ethylene Glycol bis[Succinimidylsuccinate]; Hsp: Heat Shock Proteins; HUVEC: Human Umbilical Vein Endothelial Cells; PIPES: PIPerazine-1,4-bis(2-EthaneSulfonic acid; WASP: Wiskott-Aldrich Syndrome Protein.

Abstract

In vascular endothelium, the tissue composed of a monolayer of endothelial cells lining the vascular tree, adherens junctions are mainly composed of the VE-cadherin-based complex. It consists of a complex supramolecular assembly between cadherins and the actin cytoskeleton. In the present manuscript, we attempted to identify the proteins participating to the VE-cadherin-based complex by combining anti-VE-cadherin immunoprecipitations and proteomic analyses. This method allowed us to identify 47 different proteins including α–, β– and γ–catenins, the well known cadherin partners, as well as various proteins not previously identified at adherens junctions. Among them, several actin binding proteins such as annexins, moesin and transgelins were detected. Recently, the prevailing dogma according to which α-catenin links the cadherin-catenin complex directly to the actin cytoskeleton was contested thus reopening a seemingly settled question (**Yamada et al., Cell, 123, 889-901, 2005**). Additional α-catenin binding components are probably required to build the bridge between the cadherin-catenin complex and the actin filaments. The actin-binding proteins we identified herein are probably involved in this connection. It will be of interest to establish the individual role of these new VE-cadherin-based complex partners in the dynamic actin-mediated regulation of interendothelial adherens junctions.

For Peer Review

Introduction

VE-cadherin is a glycoprotein specifically expressed in all endothelial cells of all types of vessels **[1] [2] [3]** . It represents the major component of adherens cell-cell junctions that hold together endothelial cells thus controlling vascular homeostasis **[3]** . It is now well established that VE-cadherin plays a crucial role in the maintenance and restoration of endothelial integrity and in the regulation of vessel permeability **[4] [5] [2]** . For instance, it was shown that disturbing the adhesive function of VE-cadherin of an endothelial cell monolayer with a polyclonal anti-VE-cadherin antibody leads to junction dismantling and permeability increase **[6]** . Moreover, injection of anti-VE-cadherin antibodies in mice induced a marked increase in vascular permeability in a few hours **[7]** .

Similarly to classical cadherins, VE-cadherin's extracellular domains mediate homophilic interactions. To maintain junction integrity, these interactions must be strengthened by establishing connections with the actin cytoskeleton of contacting cells. This anchorage of cadherins to the actin cytoskeleton involves catenins. Thus, the C-terminus of the cytoplasmic domain of cadherins binds, in a mutually exclusive fashion, β-catenin or γ-catenin whereas the cytoplasmic juxtamembrane domain binds another catenin protein, p120 **[8]** . Until recently, the anchorage of cadherins to actin cytoskeleton was supposed to be mediated by α-catenin which interacts, on the one hand, with cadherin-bound β- or γ-catenins and, on the other hand, with the actin cytoskeleton **[9] [3] [10]** . This "hypothesis" was based on biochemical observations establishing that α-catenin forms, via its VH1 (Vinculin Homology 1) domain, a stoichiometric complex with E-cadherin and β-catenin and binds to actin, via its VH3 domain **[11]** . Although the cadherin-catenin complex bound to actin filaments has never been isolated, these data seem to support the view that the catenins constitute the direct link between cadherins and actin cytoskeleton. However, using *in vitro* experiments, **Drees et al.** offered convincing data proving that α-catenin cannot

For Peer Review

simultaneously bind to cadherin-β/ γ catenin complex and actin **[12] ,** suggesting that specific additional intracellular partners are required for the connection of cadherin-catenin complex to the actin cytoskeleton. These additional partners might be some actin-binding proteins that are also able to bind to α-catenin **[13]** .

To identify the proteins contributing to the link between the VE-cadherin-catenin complex and the cytoskeletons, we developed a specific anti-VE-cadherin immunoprecipitation protocol to isolate the VE-cadherin-based complex from confluent endothelial cell monolayers. A proteomic approach was then used to identify the protein components present in the immunoprecipitates that were separated by SDS-PAGE prior to be in gel-digested by trypsin. Then, following separation by liquid chromatography and analysis by tandem mass spectrometry of the resulting trypic peptides, 47 proteins were thus identified. Some of them were already known to interact with VE-cadherin while the remaining ones are reported here for the first time as part of the VE-cadherin-based adherens junctions. Similar analyses, performed on sub-confluent endothelial cell junctions, indicated that the branching actin factor, cortactin, probably associated to the Arp 2/3-N-WASP complex, is connected to the junctional VE-cadherin based complex solely via actin filaments and may be involved in the maturation process of endothelial adherens junctions. The presence of several putative proteins within the VE-cadherin based complex was confirmed by immunoprecipitation.

For Peer Review

Materials and methods

Cells

Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC) were extracted from umbilical cords and cultured in M199 supplemented with 20% foetal calf serum (Biowest), 50 µg/ ml low serum growth supplement (LSGS, Cascade Biologics Tebu-Bio, Le Perray en Yvelines, France) and kept in a 5 % CO_2 humidified atmosphere, as previously described **[2]** . After plating, HUVECs were cultured during 3 (subconfluent) or 5-7 (confluent) days before being harvested. These two states were designated as subconfluent and confluent HUVECs respectively afterwards in the manuscript. For proteomic analysis, HUVECs extracted from a single umbilical cord were seeded in one 25 cm^2 culture flask and then expanded to a 702 cm^2 surface in 2 passages, until cells reached confluency.

Antibodies

The polyclonal anti-VE-cadherin antibody (Anti-Cad3) was obtained by immunizing rabbits with the recombinant fragment Cad3 encompassing the amino acid stretch 259-439 of human VE-cadherin **[14]** . It was affinity-purified onto a column grafted with the recombinant Cad3 as previously described **[6]** . Anti -β-catenin, anti-α-catenin, and anti-γ-catenin antibodies were purchased from BD Biosciences (Le pont de Claix, France). Anti-actin antibody was purchased from Sigma-Aldrich (Saint Quentin-Fallavier, France) and anti-cortactin antibody from Euromedex (Souffelweyersheim, France). Non immune IgG (Rabbit immunoglobulins Negative Control) were purchased from Dako (Trappes, France).

Immunoprecipitation

60 µg of affinity-purified Anti-Cad3 antibody were mixed with 200 µl of a suspension of protein A-Sepharose beads (Sigma-Aldrich Chimie, Saint-Quentin Fallavier, France). After a 2 hour incubation time at 4°C, the mixture was centrifuged at 200 g during 5 min. To

For Peer Review

covalently immobilize the antibody, 437.5 µM EGS (Pierce, Brebières, France) were added to the antibody-grafted beads for 30 min at room temperature. The cross-linking reaction was then stopped using 50 µM Tris-HCl, pH 7. Following washes in PBS, the Anti-Cad3-grafted beads were equilibrated in the lysis buffer (10 mM PIPES pH 7, 100 mM NaCl, 300 mM sucrose, 3 mM $MgCl_2$, 0.5% IGEPAL CA-630, 1 mM EDTA, 2 mM PMSF, 5 µg/mL leupeptine, 2 µg/mL aprotinine, 1 mM Na orthovanadate). In these conditions, 200 µl of bead suspension were used to immunoprecipitate VE-cadherin extracted from a 78 cm^2 confluent endothelial cell monolayer using the following protocol (**Fig 1B**): briefly, HUVEC monolayers were washed at least three times with PBS, lysed in 1 mL of lysis buffer for 20 min at 4°C. Cell lysates were centrifuged at 15 000 g for 10 min, then supernatants were collected and immediately mixed with 50 µl of Protein A-sepharose beads for 2 hours at 4°C to be pre-cleared. The cleared lysates were separated from beads by a 200 g centrifugation for 5 min at 4°C and then mixed with the Anti-Cad3 immobilized beads. Following an overnight contact at 4°C, beads were collected by centrifugation and rinsed three times with lysis buffer. Captured proteins were then eluted from the beads by boiling with 50 µl Laemmli buffer devoid of reducing agent. Eluted proteins were treated with 1 mM DTT to disrupt the intramolecular disulfide bridges. To distinguish specifically-retained proteins from unspecific ones, immunoprecipitation controls were performed by grafting non immune rabbit IgG on the beads using conditions rigorously identical to those used for the anti-VE-cadherin immunoprecipitations.

Actin cytoskeleton depolymerization assay

HUVEC subconfluent cells were harvested 3 days after plating, and were lysed and prepared for immunoprecipitation as described before. To provoke depolymerisation of actin filaments, 100 µM Latrunculin B (Sigma-Aldrich), or 50 µL DMSO for negative control, was added to the lysates during the immunoprecipitation.

For Peer Review

Western blotting

Cell extracts were separated under reducing conditions on SDS-PAGE and electro-transferred onto a pure nitrocellulose membrane (BioRad). After blocking with 5% non-fat dry milk, proteins were detected by specific primary antibodies and horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse antibody (Sigma-Aldrich). The immunoreactive bands were revealed using ECL western blotting detection kit (Amersham Biosciences) and the signal was recorded onto autoradiography films (Amersham Biosciences).

SDS PAGE and in-gel trypsin digestion

Samples were resolved on a 4-12% gradient gel (Criterion™ XT Precast, Biorad, France). Gel staining was performed with either Coomassie blue or silver dyes. Gel dyes (Dodeca Silver Stain Kit, and Bio-Safe Coomassie G250 stain), and XT MOPS Running Buffer were purchased from BioRad (Marnes-la-Coquette, France). The migration lane on the 1-D gel was cut into bands (about 1.5 mm large) and each band was further cut into sub-pieces. The gel pieces were washed at room temperature twice with 100 µl of 50 mM ammonium bicarbonate / acetonitrile (1:1) (v/v) for 30 min and with 100 µl of acetonitrile for 15 min before being dried in a Speed Vacuum concentrator (Savant, Framingdale, NY, USA). Dried bands re-hydrated with 100 µl of H_2O_2 7% (v/v) aqueous solution for 15 min in darkness at room temperature, washed with 100 µl acetonitrile for 15 min, before being dried again. Bands were re-hydrated with a total of 150 ng of sequencing grade modified trypsin (Promega, Madison, WI, USA) diluted in 20 µl of digestion buffer [Tris-HCl 50mM, Cacl2 10mM, urea 0.1M pH 8.1/ acetonitrile 95/5/ (v/v)] for 15 min at 4°C. Following the addition of 30 µl of digestion buffer, digestion was performed at 37°C for 5 h under permanent shaking. Digests were removed and peptides extracted from gel bands with 50 µl of acetonitrile / 0.6 M urea solution (90/10) (v/v) for 30 min. The digestion solution and extracted solution were pooled and evaporated to dryness under speed vacuum. Dry peptide samples were redissolved in 25µl

For Peer Review

of water/acetonitrile 95/5 (v/v) containing 0.2% formic acid (FA) prior to LC/MS/MS analysis.

LC-nanoESI-MS/MS

NanoLC-ESI-MS/MS-analyses were performed on an integrated nanoLC-MS/MS system (Micromass) comprising a three-pumping Micromass/Waters CapLC system with an autosampler, a stream select module configured for pre-column plus analytical capillary column, and a Micromass Q-Tof Ultima API mass spectrometer fitted with nano-LC sprayer, operated under MassLynx 4.0. Injected samples, from in gel digestion, (6 µl) were first trapped and desalted isocratically on a PepMap µC18 precolumn cartridge 65 mm (300 µm id, 5 µm and 100 Å, Dionex, Sunnyvale, CA, USA). Chromatographic separation was accomplished by loading peptide samples onto a 15 cm fused silica C18 column (75 µm id, 3 µm, 100 Å and 360 µm od; Dionex) using autosampler. Sequential elution of peptides was performed using a following linear two solvent gradient: (i) from 10% to 40% solvent B for 40 min, (ii) from 40% to 90% solvent B for 5 min, (iii). The remaining percentage of the elution solvent is made of solvent A. Composition of solvents are [Water/CH_3CN 95/5 (v/v) containing in 0.1% FA] for solvent A and [CH_3CN/Water 90/10 (v/v) containing 0.1% FA] for solvent B. Flow rate through the nanoLC column is set to 200-300 nL/min. The mass spectrometer was calibrated using the product ions generated from fragmentation of the doubly-charged molecular ion of Glu-fibrinopeptide B. Raw data were processed using PeptideAuto (ProteinLynx, MassLynx 4.0) using smooth 3/2, Savitzky Golay). The mass spectrometer was operated in the positive ion electrospray ionization mode with a resolution of 9,000–11,000 full-width half-maximum. For automatic LC-MS/MS analysis the QTOF Ultima instrument is run in data dependent mode (DDA) with the following parameters: 1 s scan time and 0.1 s interscan delay for MS survey scans; 400-1600 and 50-2000 m/z mass ranges for the survey and the MS/MS scans respectively; 5 components; MS/MS to MS switch after 5 s; switchback threshold:30 counts/s; include charge states 2, 3 and 4 with the corresponding optimized collision energy profiles. A list of the m/z corresponding to the most intense peptides of trypsin was set as an exclude list. Peptide identification from the resulting MS/MS dataset was achieved using an in-house MASCOT server (version 2.0) (Matrix Sciences, London, UK).

Each sample was submitted to consecutive searches against the NCBIr database, using MASCOT 2.0. MASCOT search parameters used with MS/MS data were: database =

For Peer Review

homo sapiens, enzyme = trypsin/P, one missed cleavage allowed, variable modifications. For the *in-gel* digestion procedure, acetyl-Nter /oxidized methionine under sulfone and sulfoxide form/ FMA+1 / FMA-1 / Cysteic acid were chosen as modifications with a peptide tolerance = 0.25 Da, MS/MS tolerance = 0.25 Da, peptide charge = 2+/3+.. Proteins identified by at least two peptides with a MASCOT MOWSE score higher than 50 were automatically validated. When this criterion was not respected, the fragmentation spectrum from each peptide was manually interpreted using the conventional fragmentation rules. In particular, we looked for a succession of at least five *y*- and/or *b*-ions, specific immonium ions, specific fragment ions (proline, glycine), and signatures of the eventual modifications carried by the peptides. In cases where proteins were mainly identified by a single peptide match, the MS/MS ions were manually examined for identifiable sequence tag and independently verified using the PEAKS studio program (http://www.bioinformaticssolutions.com/). The algorithm can efficiently choose the best amino acid sequence, from all possible amino acid combinations, to interpret the MS/MS spectrum according to the same chemical modifications defined in Mascot. Binds were focused to look at possible partnerships. (http://www.blueprint.org/bind/bind.php).

For Peer Review

Results

Isolation of the junctional VE-cadherin–based complex from confluent HUVEC monolayers

Endothelial adherens junctions are sub-cellular structures essentially composed of the VE-cadherin-based complex **[6]** . To completely characterize its molecular composition in physiological conditions, the junctional complex was first isolated from confluent HUVEC monolayers by an anti-VE-cadherin immunoprecipitation. A proteomic analysis was then performed on the immunoprecipitate to identify the proteins that participate in formation of the complex (**Fig 1**).

Practically, HUVEC lysis was performed using a buffer specifically elaborated to preserve the interaction of VE-cadherin with its direct and indirect partners (**Fig 1B**). Afterwards, the cell lysate was precleared on uncoupled protein A-sepharose beads to remove non specific interactions that might exist between certain proteins and the beads. Next, the pre-cleared lysate was allowed to interact with Protein A-Sepharose beads grafted with our home-made immunopurified polyclonal anti-VE-cadherin antibody Anti-Cad3 **[14]** . This affinity support was elaborated by coupling covalently to beads the antibody using the homobifunctional reagent EGS (**Fig 1A**). The conditions of the coupling reaction were strictly controlled to preserve the antigenic reactivity of the antibody (see Materials and methods). Following an overnight incubation, the proteins retained on the Anti-Cad3-grafted beads were eluted using not reducing conditions to avoid liberation of the antibody light chains. After reduction with DTT, the eluted proteins were separated by one-dimensional SDS-PAGE (**Fig 1C**). To obtain quantity of immunoprecipitated proteins compatible with proteomic analysis, confluent HUVEC monolayers recovering surfaces equivalent to 702 cm^2 (9x 78 cm2) were

For Peer Review

required to perform a single immunoprecipitation experiment. In these conditions, the immunoprecipitated proteins could be detected on the gel by Coomassie blue staining.

The immunoprecipitation process was controlled step by step by gel electrophoresis analysis (**Fig 2)**. First, in order to verify that conditions used to covalently graft the antibody to the sepharose beads were suitable, the coupled beads were submitted to a Laemmli buffer elution**.** Under these conditions, only a small quantity of the antibody and its cross-link fragmentary products were detached (**Fig 2, lane 2).** These contaminating Anti-Cad 3-derived products were also co-eluted with the specifically-retained proteins when immunoprecipitations were performed (**Fig 2, lane 4,** arrow heads). But, owing to their low relative abundance, they did not mask the specific bands (**Fig 2, lane 4,** arrows) and did not hinder the subsequent proteomic analyses. Second, a preclearing step of cell lysates was systematically performed to eliminate contamination by non-specific adsorption to the uncoupled beads. Indeed, following contact with uncoupled protein A-Sepharose beads, a non negligible quantity of cell lysate was effectively adsorbed and could be desorbed by elution with Laemmli buffer (**Fig 2, lane 5**). Third, to clearly discriminate specifically-immunoprecipited proteins from contaminating ones, immunoprecipitates collected from beads grafted with either the Anti-Cad3 antibody (**Fig 2, lane 4, arrows**) or with irrelevant rabbit immunoglobulins (**Fig 2, lane 3**) were compared. Bands were considered specific if they could only be detected in the immunoprecipitation performed with the Anti-Cad3 antibody (**Fig 2, lane 4**). Fourth, from comparison between lanes 4 and 7 in **Fig 2**, it could be excluded that these bands corresponded to the proteins present in the culture medium (**Fig 2, lane 7**).

The identity of the proteins co-immunoprecipitated with VE-cadherin was partially revealed by Western blot using antibodies directed against the so far known VE-cadherin-interacting proteins (**Fig 3, lane 3**). Thus, it was possible to detect two isotypes for p120 and

For Peer Review

α–, β–, γ– catenins in addition to the cytoskeletal protein β–actin. This attested that our immunoprecipitation protocol was sufficiently efficient to allow the isolation of the junctional VE-cadherin-based complex.

MS analysis of the VE-cadherin– based complex

This immunoprecipitation method allowed the isolation of a mature VE-cadherin–based junction more complex than that pre-supposed. Indeed, the proteomic analysis led to the identification of proteins neither detected before at the cell-cell junctions nor identified as partners of the cadherin complex.

Practically, following the electrophoretic separation of the immunoprecipitated proteins**,** the specific protein bands were manually excised before being in gel-digested by trypsin **(Fig 2, lane 4)**. Then, LC-MS/MS analysis together with data base searching allowed the identification of the proteins. The procedure was extremely reproducible at the level of protein identification. From three independent proteomic analyses, 53 different proteins were identified in total (**Table 1**). Among them, five catenins were found. Thus, β1-catenin, α1-catenin, γ-catenin and p120 isoform 1AC were identified from the unambiguous sequencing of 23, 44, 13, 11 peptides respectively. The fifth catenin identified was ARVCF (Armadillo-Repeat gene deleted in Velo-Cardio-Facial syndrome- accession number: gi/4502247)(6 peptides), a p120 family protein known to be associated with classical cadherins in adherens junctions whose function is poorly understood **[15]** .

The proteomic analysis also revealed the existence of additional proteins, not known to be able to interact with cadherin complexes that could be classed in different families. The first one corresponded to the cytoskeletal proteins. Thus, the VE-cadherin complex seems to be connected to microtubules, actin and intermediate filaments. Indeed, α-tubulin (5 peptides), β2-tubulin (10 peptides), β5-tubulin (10 peptides), γ-actin (17 peptides) and

For Peer Review

vimentin (20 peptides) were found in the anti-VE-cadherin -immunoprecipitate. The second protein family was composed of actin- interacting proteins. Among them, the annexin sub-family was represented by annexin I (9 peptides); annexin II, isoform 2 (17 peptides); annexin V (1 peptide) **[16]** **.** Other actin-binding proteins identified as partners were α-actinin 4 (1 peptide), myosin heavy chain 9 (10 peptides) **[17]** **;** tropomyosin 4 (4 peptides) and 3 (4 peptides) **[18]** , transgelin 1 (2 peptides) **[19]** , transgelin 2 (2 peptides) **[20]** , Cystein and Glycin-Rich Protein (1 peptide) **[21]** and moesin (9 peptides) **[22]** . The heat shock proteins constituted the third family of proteins co-immunoprecipitated with the VE-cadherin complex. Thus, Hsp 27 (5 peptides), MTHsp75 (6 peptides), Hsp 70 (11 peptides) and colligin (1 peptide) were also detected in the immunoprecipitates. The other proteins participating to the VE-cadherin complex belonged to protein families involved in the protein refolding such as Protein Disulfide Isomerases (PDI) (2 members), peptidyl propyl isomerase (1 member), thioredoxin and chaperones (BIP) or in the post-translational modifications of the proteins (transglutaminase 2 isoform a, 3 peptides). Proteins involved in fibrinolysis such as plasminogen (1 peptide) and plasminogen activator inhibitor (PAI, 1 peptide) or in angiogenesis such as angiopoietin 2 (1 peptide) **[23]** were also found in the immunoprecipitates. Some hypoxia–associated proteins were also identified **[24]** such as neural enolase (7 peptides) and glyceraldehyde -3- phosphate dehydrogenase (8 peptides) and also the antioxidant enzyme peroxiredoxin 1 (2 peptides) **[25]** . Among all the proteins detected in the immunoprecipitate, 14-3-3 epsilon **[26]** was the only one involved in intracellular signalling. Furthermore, six hypothetical proteins were also detected in the anti-VE-cadherin immunoprecipitate. Results generated by the proteomic analyses of the anti-VE-cadherin immunoprecipitate were summed up in **Table 1**.

A control proteomic analysis was performed on immunoprecipitate isolated from beads grafted with non immune Ig to assess binding specificity (**Fig 2, lane 3, Table 2**). As

For Peer Review

expected, neither VE-cadherin nor its known intracellular partners were detected in the immunoprecipitate. By contrast, some of the proteins observed in the anti-VE-cadherin immunoprecipitate were also immunoprecipitated with irrelevant Ig. This is the case for α– and β–tubulins, the heat shock proteins MTHSP75 and BIP, glyceraldehyde -3- phosphate dehydrogenase, transglutaminase and angiopoietin 2. This indicated that these proteins were found to irrelevant binding and not due to participation in the VE-cadherin complex.

Connexion of actin filaments to the VE-cadherin complex

Actin was detected in anti-VE-cadherin (17 peptides) as well as irrelevant Ig immunoprecipitates (5 peptides) (**Tables 1 and 2**). In both experiments, actin was co-immunoprecipitated with actin-interacting proteins (**Tables 1 and 2).** But**,** whereas in irrelevant Ig immunoprecipitate, actin co-immunoprecipitated with only a single actin-binding protein, filamin (**Table 2**)**,** in the anti-VE-cadherin immunoprecipitation, it interacted with numerous actin-binding proteins such as annexins, moesin, transgelins, α-actinin, myosin, tropomyosin (**Table 1**). This indicates that actin in non immune Ig immunoprecipitate is likely monomeric whereas in anti-VE-cadherin immunoprecipitate, it is incorporated in filaments. Moreover, using latrunculin B **[27]** , we were able to *in vitro* depolymerise actin co-immunoprecipitated with VE-cadherin (**Fig 3, lane 2**), indicating that our immunoprecipitation process allowed the isolation of a VE-cadherin complex connected to actin filaments.

Recently, the actin nucleation promoting factor cortactin has emerged as an important regulator of actin dynamics at sites where adhesive contact mediated by E-cadherin are being extended **[28]** . Surprisingly, cortactin were not found in our proteomic analyses. To verify whether cortactin was present in nascent and/or mature adherens junctions, we performed anti-VE-cadherin immunoprecipitations on both subconfluent and confluent HUVECs.

For Peer Review

Western blot analyses revealed the presence of two isotypes of cortactin in the anti-VE-cadherin immunoprecipitate performed on subconfluent HUVECs **(Fig 3, lane 1)** whereas they were almost undetectable in VE-cadherin-based complex extracted from confluent HUVECs (**Fig 3, lane 3**). The two isotypes of cortactin probably correspond to the wild type and the variant SV1 of cortactin. SV1 is generated in all normal human tissues by alternative mRNA splicing of exon 11 of the human gene **[29]** . Moreover, association of cortactin with the VE-cadherin-based complex depends on the maturation state of adherens junctions. This probably reflects the remodelling of actin cytoskeleton accompanying the maturation of endothelial adherens junctions.

We then attempted to understand how cortactin was tethered to the VE-cadherin complex. To reach this goal, latrunculin B was added to cell lysate during the immunoprecipitation process. Following latrunculin B treatment, western blot analyses showed that, as expected, α–, β–, γ– and p120-catenins were present in the VE-cadherin immunoprecipitates in amounts similar to those found in immunoprecipitates obtained in the absence of the drug (**Fig 3, lanes 1 and 2**). By contrast, the decrease of the amount of actin co-immunoprecipitated with VE-cadherin resulted in an almost complete disappearance of cortactin (**Fig 3, lane 2**). It can be deduced that cortactin is indirectly linked to the VE-cadherin complex through interaction with actin filaments.

For Peer Review

Discussion

In the past, cell-cell junctions and more particularly adherens junctions were believed to have rigid structures. Now, it is generally admitted that they possess highly dynamic properties. In endothelial cells, adherens junctions are mainly composed of the VE-cadherin-based complex. VE-cadherin is an adhesive receptor that plays a crucial role in the maintenance or in the restoration of the integrity of the endothelium **[6]** . It is also involved in the endothelial cell growth and consequently in angiogenesis **[30]** **[31]** . Taken together these observations suggest that adherens junctions must be tightly regulated to both stabilize endothelium and allow cell proliferation and migration. These antagonist effects may be accomplished by modulating the composition of adherens junctions according to the various physiological situations encountered by endothelial cells.

Herein, we have used an immunoprecipitation method to purify the VE-cadherin-based junctional complex from confluent primary human endothelial cell monolayers. This immunoprecipitation was performed using an antibody directed against the extracellular part of VE-cadherin thus avoiding disturbance of interactions existing between the cytoplasmic tail of VE-cadherin and its intracellular partners. This immunoprecipitation method in conjonction with LC-MS/MS led to the identification of 47 real partners participating in the elaboration of the VE-cadherin-based complex.

Among these proteins, some of them are already known to interact with VE-cadherin (directly or indirectly) such as α–, β–, γ–, and p120-catenins. Whereas p120 interacts with the membrane-proximal region **[8]** , β– and γ–catenins bind, in a mutually exclusive fashion, to the C-terminal part of the VE-cadherin cytoplasmic domain **[32]** **[33]** . They in turn recruit α–catenin **[33]** **[34]** . Each of these partners was unambiguously identified by sequencing at least 11 peptides per protein. These results validate our method for the isolation of the VE-cadherin-derived complex.

For Peer Review

Until recently α-catenin was considered to act as a bridge between cadherin, β– or γ–catenins and the actin cytoskeleton **[35]** . In December 2005, **Drees et al. [12]** and **Yamada et al. [36]** contested this prevailing dogma. They proved in an *in vitro* model that once α-catenin interacts with the cadherin-β–/ γ–catenin complex, it becomes unable to bind to actin. They also affirmed that no direct or indirect connection exists between actin and adherens junctions. This affirmation cannot explain why altering the actin cytoskeleton destabilizes adherens junctions (**Durmort et al. unpublished data) [37]** . On the contrary, this last observation strongly supports the existence of some kind of physical link between actin and the adherens junctions **[38]** . Our proteomic results corroborate this assumption since we were able to isolate a VE-cadherin-catenin-complex connected to actin filaments by co-immunoprecipitation.

Our proteomic study identified actin in both immunoprecipitates obtained using anti-VE-cadherin or non immune Ig. But in the first case, actin co-immunoprecipitated with numerous actin-binding proteins whereas in the second case, it interacted only with a single actin-binding protein designated as filamin. These results indicate that actin is not a contaminant present in the anti-VE-cadherin immunoprecipitate but, in contrast, is effectively tethered to the VE-cadherin-catenin complex. In our hands, it was possible to *in vitro* depolymerize actin filaments co-immunoprecipitated with VE-cadherin using latrunculin B (**Fig 3**). It can therefore be deduced that actin linked to VE-cadherin complex is incorporated in filaments that were preserved during the immunoprecipitation process.

In the literature, vinculin **[39]** and α-actinin **[40]** have regularly been described as proteins capable of mediating interactions between α-catenin and the actin cytoskeleton. Surprisingly, our results establish that the interaction between the VE-cadherin-catenin complex and actin might be mediated by multiple actin-binding proteins never identified before at sites of adherens junctions. In addition to α–actinin and vinculin, annexins I, II and

For Peer Review

V, moesin, transgelins 1 and 2, myosin, and tropomyosin were found. This suggests that the connection existing between the VE-cadherin-catenin complex and actin filaments is more complicated than previously supposed, α-catenin being therefore not the only protein able to support this link.

The actin-binding proteins annexin II and moesin were described as proteins present in the cytoplasm and on the cytoplasmic face of plasma membrane at sites of cholesterol rafts **[41] .** They were also reported as part of a complex composed of actin, α-actinin and ezrin in BHK cells that serves as an interface between membranes containing high amounts of cholesterol and the actin cytoskeleton. Altogether, these results suggest that moesin and annexin II may participate in the molecular system anchoring cortical cytoskeletal elements to the VE-cadherin complex. Moreover, it was recently demonstrated that a fraction of N-cadherin is associated in an indirect way with lipid rafts **[42] .** VE-cadherin may also be sequestrated within lipid raft. It can be assumed that annexin II and/ or moesin may mediate the connexion between the VE-cadherin complex and the lipid rafts. By decreasing lateral diffusion, this lipid raft-mediated trapping probably aids stabilization of the VE-cadherin complex at early cell-cell contacts.

Our immunoprecipitation experiments indicated that cortactin, another actin-binding protein, is immunoprecipitated with the VE-cadherin complex in subconfluent HUVECs. Actin filament depolymerization using latrunculin B induces the release of cortactin from the VE-cadherin complex. This observation suggests that cortactin is connected to the VE-cadherin complex via actin filaments **(Fig 3)**. The presence of cortactin within the VE-cadherin complex correlates with the fact that this protein is recruited to nascent cell-cell adhesive contacts with its partners Arp 2/3 complex and N-WASP in response to cadherin-mediated homophilic interactions **[28] [43]** . By contrast, our experiments established that cortactin was not detected in VE-cadherin immunoprecipitate extracted from confluent

For Peer Review

HUVECs. This explains why our proteomic study, carried out on mature junctional VE-cadherin-based complex, did not detect the presence of this protein. This observation indicates that maturation of interendothelial adherens junctions is accompanied by a remodelling of the actin filaments tethered to the VE-cadherin complex. At nascent junctions, cortactin probably associated with the Arp2/3 complex to initiate polymerization of branched actin filaments whereas, in more mature adherens junctions, other proteins such as formin-1 may promote polymerization of linear actin filaments.

Myosins, another actin-binding protein found in the VE-cadherin-based junctionnal complex, are molecular motors that possess heavy chains able to move along tracks of filamentous actin. Their role in adherens junction assembly is not well understood but it seems that they may regulate cell polarization and correct positioning of the adherens and tight junctions within the plasma membrane **[44]** .

Concerning transgelins, they constitute a new class of actin-binding proteins never described in endothelial cells whose cellular function has not been well defined. Our preliminary unpublished data showed that transgelin 2 is distributed along actin filaments.

Our proteomic analysis indicated that the VE-cadherin-based complex contains vimentin, a major component of intermediate filaments. This corroborate recent results establishing that N-cadherin **[45]** and VE-cadherin **(Durmort et al.** unpublished data**)** are linked to intermediate filaments**.** Furthermore, it is not possible to affirm or, on the contrary, to exclude the possibility that the junctional complex is effectively connected to microtubules. Indeed, in the experimental conditions used for the immunoprecipitation experiments, microtubules depolymerise to generate dimers **[46]** .

Following the identification of these actin-binding proteins at the interendothelial junctions, it will become possible to establish how they interact with the cadherin/catenin complex and what role they play in actin organization at adherens junction sites.

For Peer Review

Captions for figures

Fig 1: Schematic illustration of the isolation, SDS-PAGE and mass spectrometry analyses of the VE-cadherin-based complex

A: Binding and covalent coupling of Anti-Cad3 antibody to Protein A-Sepharose beads. The polyclonal anti-VE-cadherin antibody Anti-Cad3 was first captured on protein A-Sepharose beads prior to covalently immobilizazion using the crosslinking reagent EGS.

UPAS: uncoupled Protein A-Sepharose beads; AbPAS: Protein A-Sepharose beads coupled with the AntiCad3 antibody; RabPAS: Protein A-Sepharose beads covalently coupled to the AntiCad3 antibody.

B: Isolation of the VE-cadherin–based complex by immunprecipitation. Confluent monolayers of HUVEC were lysed. Following a pre-clearing step using uncoupled Protein A sepharose beads (UPAS), lysates were mixed with suspensions of Anti-Cad3-coupled beads (RabPAS) and the VE-cadherin-derived complexes were eluted from the beads under non-reducing conditions.

C: Identification of the proteins constituting the VE-cadherin complex. Immunoprecipitated VE-cadherin complexes were analyzed by SDS-PAGE. Following Coomassie blue staining, the protein bands were excised from the gel and proteins in gel-digested by trypsin. The resulting peptides were analyzed by LC/ MS/ MS.

Fig 2: Separation of the proteins forming the VE-cadherin-based complex

Following the isolation of the VE-cadherin complex by immunoprecipitation, VE-cadherin-associated proteins were separated on a 4-15 % Criterion XT Precast gel and visualized by Coomassie blue staining (**lane 4**). To facilitate comparison, total lysate (**lane 6**), proteins not specifically adsorbed to uncoupled protein A-Sepharose beads (**lane 5**) and proteins contained within the culture medium (**lane 7**) were fractionated on the same gel. To discriminate

For Peer Review

between specifically-immunoprecipitated proteins and non-specific ones, immunoprecipitations were performed either with the Anti-Cad3 antibody (**lane 4**) or with unrelated Ig (**lane 3**). To verify the efficiency of covalent coupling of anti-Cad3 antibody to beads, products directly eluted by Laemmli buffer from untreated Anti-Cad3-covalently-coupled beads were also analyzed in parallel (**lane 2**). **Lane 1**: protein standards. Molecular mass markers (kDa) are indicated at the left margin. Arrow head: bands corresponding to Anti-Cad3-derived fragments; Arrow: specific bands.

Fig 3: Western blot analysis of VE-cadherin co-immunoprecipitated proteins prior and after *in vitro* depolymerization of actin cytoskeleton by latrunculin B

Anti-VE-cadherin immunoprecipitates, obtained from subconfluent (lanes 1 and 2) or confluent HUVECs (lane 3) were treated with 10 µM Latrunculin B (lane 2) or with 50 µL of DMSO (lanes 1 and 3). Following separation of the proteins by electrophoresis and transfer, the membrane was successively incubated with antibodies directed against VE-cadherin, p120- , α–, β–, γ– catenins, actin and cortactin.

For Peer Review

Captions for tables

Table 1: Compilation of the proteins identified in VE-cadherin complex

Following anti-VE-cadherin immunoprecipitation, electrophoretic separation and in-gel digestion, the protein components of the VE-cadherin complex were identified by MS/MS mass spectrometry. The table gives from columns 1 to 7 the protein acronym, the protein accession number according to the NCBir database, the isoelectric point (pI,), the molecular mass (Da), the Mascot Score of in gel digestion, the protein sequence coverage and the number of peptides assigned by MS/MS.

Table 2: List of the proteins identified on immunoprecipitate isolated from beads grafted with non immune Ig

The table gives from columns 1 to 7 the protein acronym, the protein accession number according to the NCBir database, the isoelectric point (pI,), the molecular mass (Da), the Mascot Score of in gel digestion, the protein sequence coverage and the number of peptides assigned by MS/MS.

For Peer Review

Acknowledgments :

We are indebted to staff of the maternity hospital from Hôpital Nord (Grenoble, France) for kindly collecting umbilical cords for these experiments. We thank Dr Maighread Gallagher for critical reading of the manuscript. This work was supported by grants N° 4447 from the Association pour la Recherche sur le Cancer and from la Ligue régionale contre le cancer (73). S. H. is a recipient of a fellowship from Association de Recherche sur la Polyarthrite (ARP).

For Peer Review

References

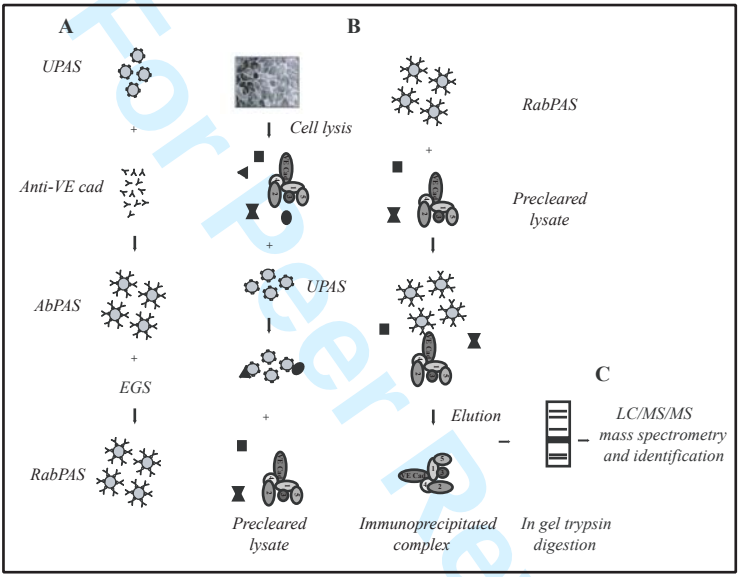
[1] Takeichi, M., Science 1991, *251*, 1451-1455
[2] Lampugnani, M. G., Resnati, M., Raiteri, M., Pigott, R., *et al.*, J Cell Biol 1992, *118*, 1511-1522
[3] Bazzoni, G.,Dejana, E., Physiol Rev 2004, *84*, 869-901
[4] Dejana, E., Bazzoni, G.,Lampugnani, M. G., Exp Cell Res 1999, *252*, 13-19
[5] Hordijk, P. L., Anthony, E., Mul, F. P., Rientsma, R., *et al.*, J Cell Sci 1999, *112 (Pt 12)*, 1915-1923
[6] Gulino, D., Delachanal, E., Concord, E., Genoux, Y., *et al.*, J Biol Chem 1998, *273*, 29786-29793
[7] Corada, M., Mariotti, M., Thurston, G., Smith, K., *et al.*, Proc Natl Acad Sci U S A 1999, *96*, 9815-9820
[8] Reynolds, A. B., Daniel, J., McCrea, P. D., Wheelock, M. J., *et al.*, Mol Cell Biol 1994, *14*, 8333-8342
[9] Bershadsky, A., Trends Cell Biol 2004, *14*, 589-593
[10] Wallez, Y., Vilgrain, I.,Huber, P., Trends Cardiovasc Med 2006, *16*, 55-59
[11] Ozawa, M.,Kemler, R., J Cell Biol 1992, *116*, 989-996
[12] Drees, F., Pokutta, S., Yamada, S., Nelson, W. J., *et al.*, Cell 2005, *123*, 903-915
[13] Kobielak, A.,Fuchs, E., Nat Rev Mol Cell Biol 2004, *5*, 614-625
[14] Hermant, B., Bibert, S., Concord, E., Dublet, B., *et al.*, J Biol Chem 2003, *278*, 14002-14012
[15] Kausalya, P. J., Phua, D. C.,Hunziker, W., Mol Biol Cell 2004, *15*, 5503-5515
[16] Rescher, U.,Gerke, V., J Cell Sci 2004, *117*, 2631-2639
[17] Krendel, M.,Mooseker, M. S., Physiology (Bethesda) 2005, *20*, 239-251
[18] Gunning, P. W., Schevzov, G., Kee, A. J.,Hardeman, E. C., Trends Cell Biol 2005, *15*, 333-341
[19] Fu, Y., Liu, H. W., Forsythe, S. M., Kogut, P., *et al.*, J Appl Physiol 2000, *89*, 1985-1990
[20] Kobayashi, R., Kubota, T.,Hidaka, H., Biochem Biophys Res Commun 1994, *198*, 1275-1280
[21] Harper, B. D., Beckerle, M. C.,Pomies, P., Biochem J 2000, *350 Pt 1*, 269-274
[22] Ivetic, A.,Ridley, A. J., Immunology 2004, *112*, 165-176
[23] Polverini, P. J., J Dent Educ 2002, *66*, 962-975
[24] Graven, K. K.,Farber, H. W., J Lab Clin Med 1998, *132*, 456-463
[25] Rhee, S. G., Chae, H. Z.,Kim, K., Free Radic Biol Med 2005, *38*, 1543-1552
[26] Esposito, C.,Caputo, I., Febs J 2005, *272*, 615-631
[27] Coue, M., Brenner, S. L., Spector, I.,Korn, E. D., FEBS Lett 1987, *213*, 316-318
[28] Helwani, F. M., Kovacs, E. M., Paterson, A. D., Verma, S., *et al.*, J Cell Biol 2004, *164*, 899-910
[29] van Rossum, A. G., de Graaf, J. H., Schuuring-Scholtes, E., Kluin, P. M., *et al.*, J Biol Chem 2003, *278*, 45672-45679
[30] Carmeliet, P., Lampugnani, M. G., Moons, L., Breviario, F., *et al.*, Cell 1999, *98*, 147-157
[31] Crosby, C. V., Fleming, P. A., Argraves, W. S., Corada, M., *et al.*, Blood 2005, *105*, 2771-2776
[32] Ozawa, M., Ringwald, M.,Kemler, R., Proc Natl Acad Sci U S A 1990, *87*, 4246-4250
[33] Navarro, P., Caveda, L., Breviario, F., Mandoteanu, I., *et al.*, J Biol Chem 1995, *270*, 30965-30972
[34] Aberle, H., Schwartz, H.,Kemler, R., J Cell Biochem 1996, *61*, 514-523
[35] Kemler, R., Trends Genet 1993, *9*, 317-321

For Peer Review

[36] Yamada, S., Pokutta, S., Drees, F., Weis, W. I., *et al.*, Cell 2005, *123*, 889-901
[37] Quinlan, M. P.,Hyatt, J. L., Cell Growth Differ 1999, *10*, 839-854
[38] Gates, J.,Peifer, M., Cell 2005, *123*, 769-772
[39] Weiss, E. E., Kroemker, M., Rudiger, A. H., Jockusch, B. M., *et al.*, J Cell Biol 1998, *141*, 755-764
[40] Knudsen, K. A., Soler, A. P., Johnson, K. R.,Wheelock, M. J., J Cell Biol 1995, *130*, 67-77
[41] Harder, T., Kellner, R., Parton, R. G.,Gruenberg, J., Mol Biol Cell 1997, *8*, 533-545
[42] Causeret, M., Taulet, N., Comunale, F., Favard, C., *et al.*, Mol Biol Cell 2005, *16*, 2168-2180
[43] Verma, S., Shewan, A. M., Scott, J. A., Helwani, F. M., *et al.*, J Biol Chem 2004,
[44] Ivanov, A. I., Hunt, D., Utech, M., Nusrat, A., *et al.*, Mol Biol Cell 2005, *16*, 2636-2650
[45] Kim, Y. J., Sauer, C., Testa, K., Wahl, J. K., *et al.*, J Cell Sci 2005, *118*, 3883-3894
[46] Castoldi, M.,Popov, A. V., Protein Expr Purif 2003, *32*, 83-88

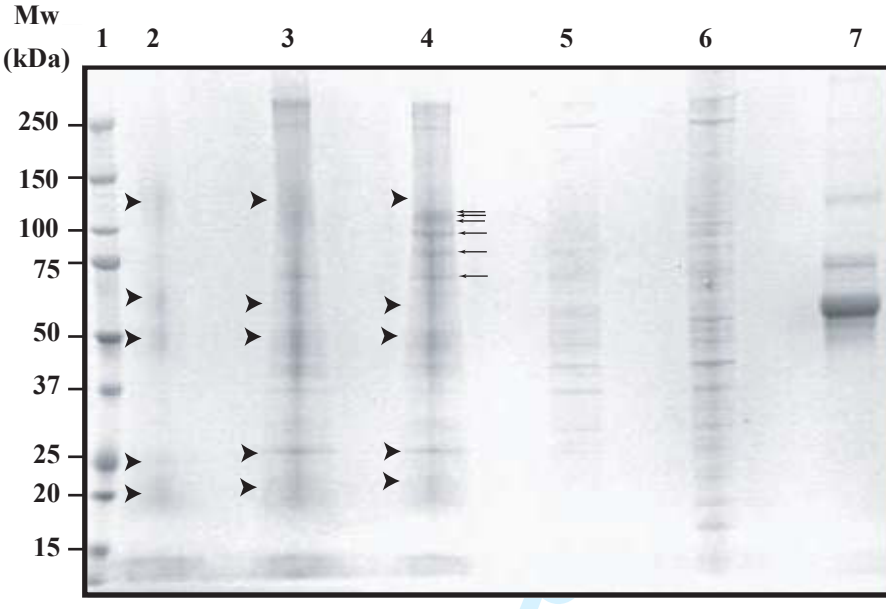
For Peer Review

Fig 1



For Peer Review

Fig 2:



Review

For Peer Review

Fig 3:

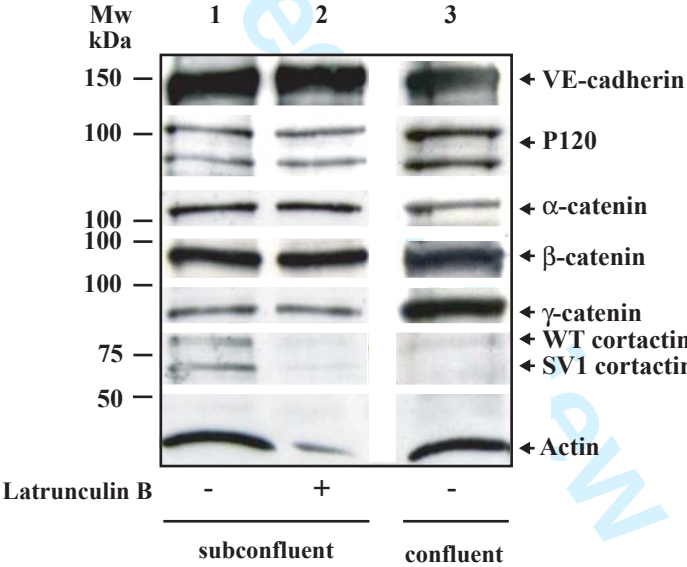


Table 1:

description	accession	pI	score	mass (Da)	cov %	Nb peptides
vascular endothelial cadherin	**gi|1814076**	**5.22**	**1088**	**87474**	**25.5**	**19**
catenin, alpha 1	gi|55770844	5.95	2609	100009	56.0	44
catenin (cadherin-associated protein), beta 1	gi|4503131	5.53	1424	85442	38.2	23
Plakoglobin	gi|762885	5.88	713	81583	22.0	13
p120 catenin isoform 1AC	gi|3152821	6.41	646	104912	14.7	11
armadillo repeat protein	gi|4502247	6.38	250	104577	10.2	6
vimentin	gi|57471646	5.19	1102	49623	54.1	20
actin, gamma, cytoplasmic	gi|6752954	5.31	1004	41766	60.8	17
Tubulin, beta, 2	gi|20809886	4.76	615	49776	28.5	10
tubulin, beta 5	gi|7106439	4.78	553	49639	28.8	10
myosin, heavy polypeptide 9, non-muscle	gi|12667788	5.50	465	226392	6.1	10
moesin	gi|4505257	6.08	455	67778	21.3	9
alpha-tubulin	gi|340021	4.94	413	50120	15.1	5
tropomyosin 4	gi|4507651	4.67	139	28504	19.4	4
similar to tropomyosin 3 isoform 2 isoform 17	gi|73961099	4.73	136	28853	16.9	4
transgelin 2	gi|4507357	8.41	124	22377	11.6	2
alpha actinin 4	gi|2804273	5.27	79	102204	1.4	1
smooth muscle protein transgelin 1	gi|177175	8.56	64.28	22461	16.9	2
cysteine and glycine-rich protein 1	gi|4758086	8.90	44	20554	7.8	1
colligin	gi|30130	8.27	36	46238	3.6	1
BiP protein	gi|6470150	5.23	1093	70888	35.1	19
heat shock 70kDa protein 8 isoform 1	gi|5729877	5.37	602	70854	20.7	11
MTHSP75	gi|292059	5.97	308	73734	12.2	6
heat shock protein 27	gi|662841	7.83	243	22313	30.7	5
protein disulfide isomerase-related protein 5	gi|1710248	4.95	135	46170	6.9	2
glutathione transferase (EC 2.5.1.18)	gi|87564	5.42	64	23159	7.6	1
TXNDC5 protein (thioredoxin)	gi|12654715	5.32	184	36155	16.4	5
peptidylprolyl isomerase A isoform 1	gi|10863927	7.82	135	17870	18.9	2
protein disulfide isomerase	gi|860986	6.10	70	56644	4.4	2
enolase 1	gi|4503571	7.01	388	47139	24.4	7
angiopoietin 2	gi|4557315	5.41	40	56883	2.0	1
unnamed protein product Annexin	gi|35218	5.41	66	75812	4.8	2
Annexin II, isoform 2	gi|18645167	7.57	849	38552	48.1	17
Annexin I	gi|442631	7.77	476	35018	31.5	9
p90, 80K-H=tyrosine-phosphorylated protein	gi|1438753	4.34	127	59259	5.9	3
Chain C, Annexin V	gi|809190	4.94	118	35783	5.0	1
14-3-3 epsilon	gi|5803225	4.63	62	29155	9.8	2
CNDP dipeptidase 2	gi|8922699	5.58	303	52746	18.9	7
transglutaminase 2 isoform a	gi|39777597	5.17	150	77209	6.3	3
glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	gi|7669492	8.57	376	36030	29.3	8
peroxiredoxin 1	gi|32455266	8.27	121	22096	14.6	2
aldolase A protein	gi|28595	8.76	52	11930	13.9	1
Plasminogen	gi|38051823	6.89	41	90526	1.2	1
unnamed protein product	gi|31092	9.10	350	50095	19.7	7

For Peer Review

unnamed protein product	gi|34272	4.79	218	33293	15.3	3
Hypothetical protein LOC124801	gi|27882563	8.22	139	21746	11.3	2
Unknown (protein for IMAGE:4099962)	gi|13623543	5.02	135	51741	7.8	3
unnamed protein product	gi|7020584	4.55	55	19360	11.7	1
unnamed protein ,plasminogen activator inhibitor 1	gi|35245	6.23	53	9559	13.3	1
hypothetical protein	gi|5912131	7.68	51	51925	1.7	1
ACADVL protein	gi|18044943	8.76	147	68015	6.0	3
proteasome 26S ATPase subunit 3	gi|21361144	5.08	128	49073	9.3	3
SH3-domain GRB2-like 1	gi|4506929	5.31	56	41464	3.3	1

For Peer Review

Table 2 :

description	accession	pI	score	mass	coverage	#peptides
filamin, muscle isoform [Homo sapiens]	gi|5419655	5,61	957,99	287177	8,32	17
filamin 1 (actin-binding protein-280)	gi|4503745	5,73	756,24	280586	5,29	11
lamin A/C isoform 1 precursor [Homo sapiens]	gi|27436946	6,57	540,80	74095	14,16	8
unknown [Homo sapiens]	gi|62198449	5,48	415,03	243288	4,15	7
beta-tubulin [Homo sapiens]	gi|1297274	4,86	382,19	50485	14,67	6
beta actin [Homo sapiens]	gi|4501885	5,29	339,13	41710	18,40	5
alpha-tubulin [Homo sapiens]	gi|37492	5,02	212,85	50126	9,76	3
MTHSP75	gi|292059	5,97	189,83	73734	6,63	3
heat shock protein [Homo sapiens]	gi|4204880	5,56	127,75	69952	3,91	2
BiP [Homo sapiens]	gi|1143492	5,03	109,64	72071	3,98	2
glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	gi|31645	8,27	108,51	36031	6,57	2
Chain F, Human Tissue Transglutaminase	gi|20151078	5,17	106,29	77209	3,64	2
actin-binding protein homolog ABP-278	gi|3282771	5,47	95,81	278018	0,85	2
elongation factor Tu	gi|704416	7,69	74,39	49509	2,65	1
beta-subunit (AA 1-312) [Homo sapiens]	gi|28931	4,90	65,25	34026	4,49	1
reticulocalbin 1 precursor [Homo sapiens]	gi|4506455	4,86	59,44	38866	3,63	1
angiopoietin 2 [Homo sapiens]	gi|4557315	5,41	53,12	56883	2,02	1
eukaryotic translation initiation factor 4A, isoform 2	gi|4503531	5,33	49,38	46365	2,46	1

For Peer Review

1.3 Discussion : Nouvelle conception de la jonction adhérente

Les outils développés pour ce travail ont permis de déterminer, dans nos conditions particulières d'expérimentation, la composition protéique globale du complexe des jonctions adhérentes endothéliales matures. Elle a permis notamment de retrouver les partenaires connus de la VE-cadhérine tels que les α-, β-, γ-caténines et p120 et de révéler la présence de nouveaux partenaires comme l'annexine 2 et la moésine. La méthode a toutefois ses limites et il conviendra d'interpréter ces résultats avec nuance.

En particulier, le fait de ne pas détecter la présence d'une protéine ne signifie pas qu'elle ne soit pas présente au sein du complexe jonctionnel. Il est possible que cette protéine ne possède pas de site de clivage par la trypsine ou qu'elle soit en concentration inférieure au seuil de détection de la spectrométrie de masse. Enfin, elle a pu être masquée par les anticorps résiduels décrochés des billes PAS ou par des contaminants notamment les kératines.

Ainsi, nous n'avons pas retrouvé la kinase Src qui est constitutivement associée à la VE-cadhérine. De même, la desmoplakine n'a pas pu être mise en évidence puisque, de par sa taille (210 et 240 Kda), elle a été probablement « noyée » dans les contaminants accumulés en haut du gel d'électrophorèse. En outre, bien que certaines données bibliographiques fassent état d'une association entre la VE-cadhérine et le VEGFR2, la présence de ce dernier dans notre analyse protéomique n'a pas été révélée **(Grazia Lampugnani et al., 2003; Lampugnani et al., 2006)**. De même, l'absence de la vinculine et des formines est notable. Plusieurs explications s'offrent à nous. Ces protéines peuvent ne pas être associées au complexe à base de VE-cadhérine dans les cellules endothéliales quiescentes. Il se peut également que le tampon de lyse que nous avons utilisé ne conserve pas d'éventuelles interactions avec ces protéines. Enfin, ces protéines peuvent avoir été, elles aussi, masquées par d'autres plus abondantes.

Nos résultats ne font pas écho aux travaux de Drees et coll. et Yamada et coll. **(Drees et al., 2005; Yamada et al., 2005b)**. En effet, leurs études démontrent l'incapacité de l'α-caténine à participer à l'architecture des jonctions adhérentes épithéliales puisque cette protéine serait incapable de se lier à la fois à la β-caténine et à l'actine *in vitro*. Les auteurs en concluent que l'α-caténine serait absente des jonctions adhérentes des cellules confluentes. Une nouvelle théorie est alors apparue, présentant l'α-caténine comme une protéine capable de réticuler les filaments d'actine entre eux, à la membrane, mais incapable d'interagir avec la jonction **(Perez-Moreno and Fuchs, 2006; Weis and Nelson, 2006)**. Or, nos analyses du complexe jonctionnel mature établissent formellement la présence de l'α-caténine (**article 1,**

table 1 et figure 3, piste 3). En outre, l'étude des jonctions adhérentes établies entre cellules sub-confluentes et confluentes démontre que non seulement l'α-caténine fait partie du complexe des jonctions non matures, mais qu'elle se trouve en interaction directe avec le complexe (**article 1, figure 3 pistes 1 et 2**). Effectivement, alors que les filaments d'actine sont dépolymérisés à l'aide de la latrunculine B **(Coue et al., 1987)**, l'α-caténine est toujours présente dans l'immunoprécipitat, en quantité équivalente à celle de l'immunoprécipitat contrôle, réalisé sans drogue. Ces différences de résultats reflètent peut-être l'importance du modèle d'étude choisi. Les équipes de MM Nelson et Weis ont privilégié des études biochimiques très élégantes, hors du contexte cellulaire épithélial. Il est envisageable que, dans ces conditions, une protéine reliant l'α-caténine au cytosquelette d'actine ait fait défaut, et que les interactions normalement établies dans la cellule aient été impossibles à reproduire *in vitro*. Ceci a par conséquent conduit à tirer des conclusions différentes des nôtres. De plus, nous ne pouvons exclure que l'organisation des jonctions adhérentes endothéliales présente des différences avec celle des jonctions épithéliales.

L'ensemble de ces résultats est schématisé et synthétisé dans la **figure 23**. Nous avons tenté d'établir un diagramme du complexe protéique formant la jonction adhérente endothéliale.

Fort de nos résultats obtenus par l'analyse protéomique, nous avons entrepris l'étude d'un partenaire particulier, l'annexine 2. En parallèle, nous avons amorcé la production d'outils de biologie moléculaire pour réaliser une étude similaire d'un autre partenaire, la moésine.

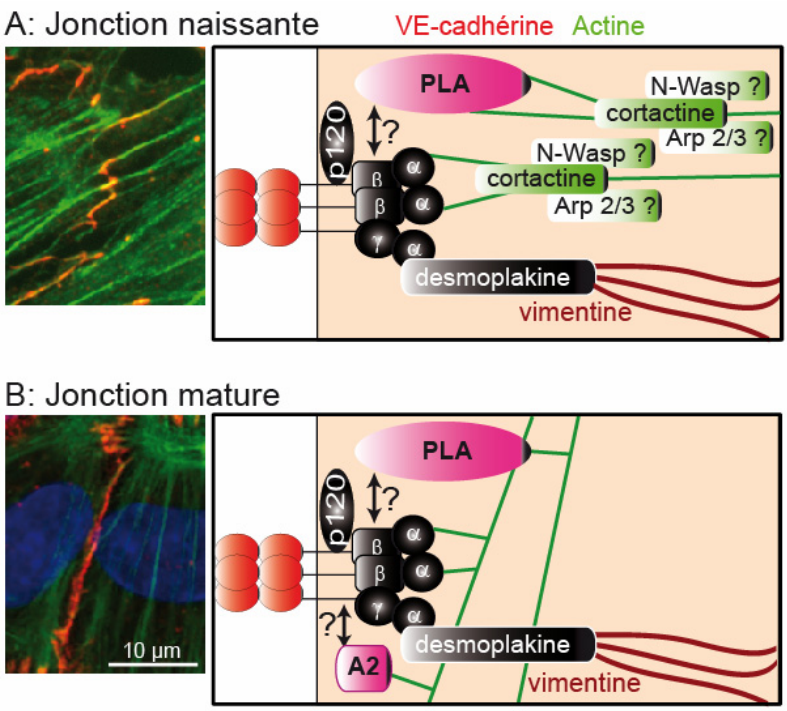


Figure 23: Représentation schématique des jonctions adhérentes des cellules endothéliales sub-confluentes (A) et confluentes (B).

A : Les jonctions naissantes, établies entre cellules endothéliales sub-confluentes, présentent une organisation des molécules de VE-cadhérine en zigzag, et des filaments d'actine perpendiculaires à la jonction. Dans ce complexe, les caténines (α, β, γ et p120) sont présentes. Les cytosquelettes d'actine et de vimentine (filaments intermédiaires) sont associés à la jonction, par l'intermédiaire respectivement des protéines liant l'actine (PLA) et certainement la desmoplakine. Les nucléateurs de l'actine, le complexe Arp2/3/cortactine/N-Wasp ne sont pas connectés au complexe jonctionnel, mais participent au remodelage du cytosquelette d'actine afin de permettre l'établissement des jonctions.

B : Le complexe protéique qui compose les jonctions adhérentes se modifie au cours de leur maturation. Les filaments d'actine sont devenus un réseau parallèle aux jonctions linéaires, et les nucléateurs de l'actine ont disparu. Les PLA demeurent et parmi celles-ci se trouve l'annexine 2 (A2).

2 ETUDES DU ROLE DES NOUVEAUX PARTENAIRES DE LA VE-CADHERINE IDENTIFIES PAR ANALYSE PROTEOMIQUE

2.1 L'annexine 2

2.1.1 Présentation des annexines

Les annexines sont des protéines qui ont la particularité d'associer des structures biologiques entre-elles, notamment les membranes **(Gerke et al., 2005; Gerke and Moss, 2002)**. Les annexines possèdent en commun :

- la capacité de se lier aux phospholipides chargés négativement par l'intermédiaire d'ions calcium, de façon réversible ;
- quatre domaines structuraux conservés, de soixante-dix résidus amino-acyles chacun, nommés « annexin repeat », qui forment un domaine central conservé (**figure 21**).

Le domaine central conservé, autrement dénommé le « corps », est structuré en hélice α, et constitue le domaine d'interaction avec les membranes et les ions calcium. Cette région adopte une forme légèrement incurvée, ce qui ménage deux faces aux annexines. La face externe convexe interagit avec le calcium et les phospholipides acides (en particulier la phosphatidylsérine, le phosphatidylinositol et l'acide phosphatidique), tandis que la face interne concave peut s'associer à différents partenaires cytosoliques **(Rescher and Gerke, 2004)**.

2.1.1.1 Oligomérisation

En absence de calcium, l'extrémité N-terminale de l'annexine 2 pourrait être associée à la face concave de son domaine central (**figure 21**) **(Gerke and Moss, 2002)**. La fixation d'ions calcium induirait l'ouverture de cette annexine, permettant à l'extrémité N-terminale d'interagir avec une calciprotéine particulière, la S100A10 ou p11. Cette protéine appartient à une famille de petites protéines (~ 10 kDa) qui contiennent deux motifs « EF-hands » consécutifs connectés par une région charnière flexible, et deux extrémités N- et C-terminales libres **(Lewit-Bentley et al., 2000; Schafer and Heizmann, 1996)**. L'annexine 2 s'associe avec la protéine S100A10 pour former un hétérotétramère $(\text{annexine 2})_2/(\text{S100A10})_2$ où chaque sous-unité d'un dimère central $(\text{S100A10})_2$ entre en interaction avec une molécule d'annexine 2 (**figure 21**) **(Gerke and Moss, 2002; Lewit-Bentley et al., 2000; Rety et al.,**

1999). Ce complexe hautement spécifique a été observé *in vitro*, dans des expériences de cristallographie notamment, aussi bien qu'*in vivo*, où il a pu être isolé. Au cours de l'évolution, les sites de liaison aux ions calcium de S100A10 ont subi des mutations qui confèrent à cette protéine une conformation correspondant à un état activé permanent.

Deux monomères d'annexine 2, en hétérotétramère avec deux protéines S100A10, auraient la capacité de mettre en contact, par la face incurvée de leur domaine central, deux membranes (**figure 24**).

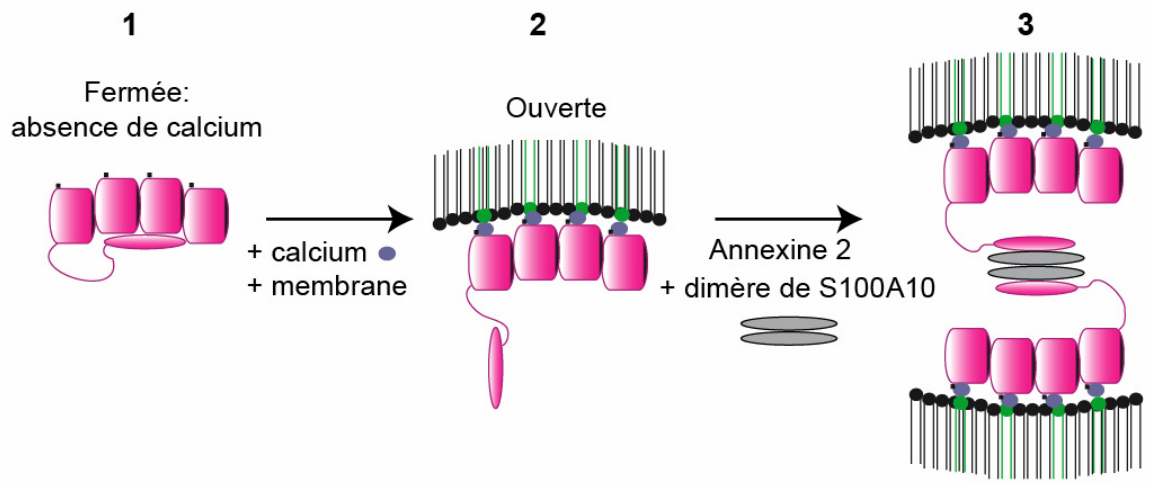


Figure 24 : Modèle d'interaction de l'annexine A2 avec les membranes. D'après **(Gerke and Moss, 2002)**.
L'annexine 2 est formée de quatre domaines répétés (le corps), et d'une queue N-terminale mobile. En l'absence de calcium elle adopte une conformation « fermée », sa queue interagissant avec son domaine central (**1**). La fixation d'ions calcium « ouvre » la conformation de l'annexine et permet son interaction avec les phospholipides acides des membranes (ici figurés en vert) (**2**). L'annexine 2 s'associe par son domaine N-terminal avec la calciprotéine p11 et forme des hétérotétramères comportant deux annexines et deux calciprotéines. Les deux sites d'interaction avec les membranes portés par les annexines permettent le rapprochement de deux membranes (**3**).

2.1.1.2 Trafic intracellulaire

On distingue deux populations d'annexine 2, l'une cytosolique et l'autre associée aux membranes **(Gerke and Moss, 2002; Rescher and Gerke, 2004)**. La balance entre ces deux localisations n'est pas uniquement régulée par la présence de phospholipides acides mais également par la concentration locale de calcium intracellulaire **(Gerke et al., 2005; Gerke and Moss, 2002)**. L'annexine 2 est associée aux différentes types de membranes, dont les membranes plasmiques, les membranes des endosomes, des pinosomes, du Golgi, et des granules de sécrétion, ce qui sous-tend son implication dans le trafic intracellulaire engendré

par les voies de biosynthèse, d'endocytose et d'exocytose **(Gerke et al., 2005; Gerke and Moss, 2002; Harder and Gerke, 1993)**.

2.1.1.3 Organisation membranaire et association à l'actine

Les annexines sont considérées comme des centres organisateurs de la membrane plasmique. L'annexine la plus étudiée dans ce domaine est sans conteste l'annexine 2. Elle est vraisemblablement impliquée dans le regroupement de structures particulières des membranes que sont les radeaux membranaires **(Babiychuk and Draeger, 2000; Babiychuk et al., 2002)**. Il s'agit de compartiments organisés autour des lipides présents dans les membranes cellulaires **(Foster et al., 2003; Paradela et al., 2005; Pike, 2003; Pike, 2006)**. Ce sont de petits domaines (10 à 200 nm), hétérogènes, très dynamiques, composés de sphingolipides, gangliosides et cholestérol. Ces radeaux membranaires sont parfois stabilisés *via* des interactions protéines-protéines ou protéines-lipides élaborant ainsi des plates-formes de taille plus large. De part leur fonction dans l'endocytose et l'exocytose, les radeaux de cholestérol sont impliqués dans le trafic et la signalisation intracellulaires.

A l'heure actuelle, les radeaux de cholestérol sont considérés comme des zones d'ancrage du cytosquelette d'actine **(Filipenko and Waisman, 2001)**. D'ailleurs, la solubilisation du cholestérol membranaire détruit les radeaux et induit une réorganisation massive du cytosquelette d'actine. Il passe en effet d'une forme d'anneau sous-cortical à des fibres de stress, qui, en rigidifiant la cellule, limite la mobilité latérale des protéines membranaires **(Kwik et al., 2003)**. L'annexine 2, qui est capable de se lier à l'actine grâce à un site spécifique constitué de neuf résidus amino-acyles en position C-terminale, apparaît comme un intermédiaire entre les radeaux et le réseau d'actine **(Filipenko and Waisman, 2001; Hayes et al., 2004a; Hayes et al., 2004b)**. Elle exerce de plus une activité de pontage des filaments, d'une manière dépendante du calcium, *via* un site situé dans le corps de la protéine. Il est à noter pourtant que l'annexine 2 n'est associée ni aux fibres de stress, ni aux filaments d'actine cytoplasmiques, mais qu'elle s'associe aux filaments d'actine uniquement au niveau des radeaux de cholestérol **(Gerke and Moss, 2002; Hayes et al., 2004b)**.

Cependant, à l'heure actuelle, aucune donnée n'a démontré une interaction directe entre le cholestérol et l'annexine 2. On peut donc imaginer que l'hétérotétramère (annexine $2)_2$/$(S100A10)_2$ est recruté à la membrane par des phospholipides particuliers des radeaux (phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate). Par le jeu d'associations latérales, une agrégation des radeaux pourrait s'engager, formant un point d'ancrage pour les filaments d'actine **(Rescher and Gerke, 2004; Rescher et al., 2004)** (**figure 24**). Dans la région sous-membranaire de ces

radeaux s'accumule AHNAK, une protéine de liaison à l'actine, qui interagit avec S100A10 au sein de l'hétérotétramère (annexine 2)$_2$/(S100A10)$_2$, ce qui expliquerait l'existence d'une interaction indirecte entre les radeaux de cholestérol et l'hétérotétramère (**figure 25**) **(Benaud et al., 2004; De Seranno et al., 2006)**. L'annexine 2 n'est pas la seule protéine capable de se lier à l'actine au sein de ces radeaux. L'α-actinine, la moésine et l'ezrine, dans des cellules BHK (Baby Hamster Kidney) y ont également été identifiées **(Harder et al., 1997)**.

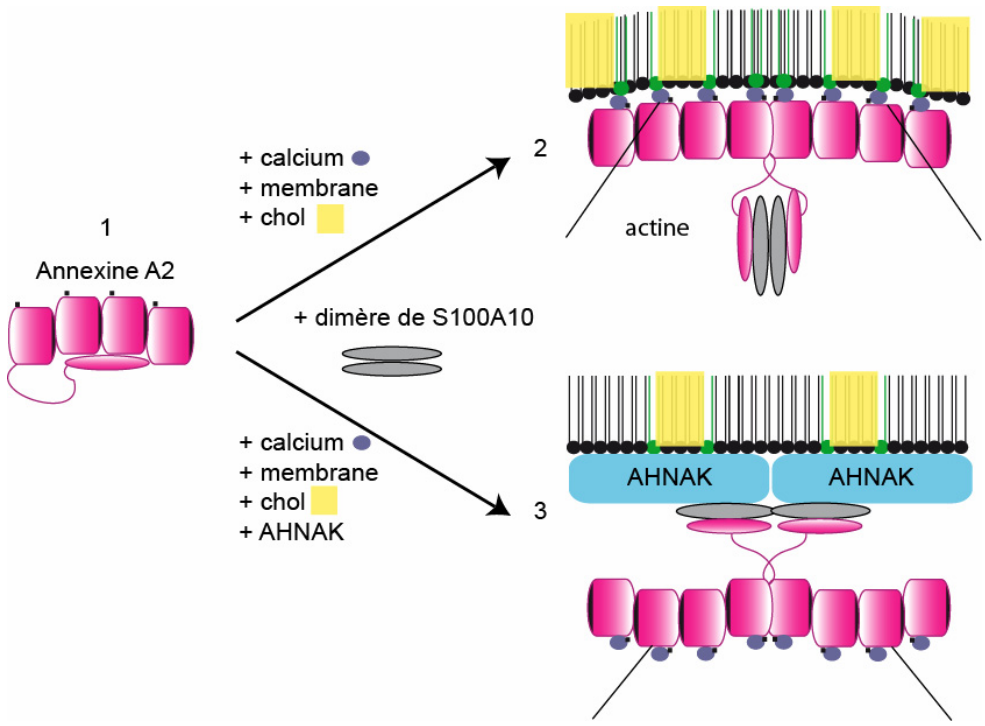


Figure 25 : Modèle d'agrégation des radeaux de cholestérol induit par l'annexine A2. D'après **(Babiychuk and Draeger, 2000; Benaud et al., 2004; De Seranno et al., 2006)**.
L'annexine 2, en l'absence de calcium adopte une position « fermée » dans le cytosol (**1**). Suite à la fixation d'ions calcium, elle s'associe avec la membrane au niveau des radeaux de cholestérol (chol, figurés en jaune). La queue N-terminale interagit avec la protéine p11 et des hétérotétramères (annexine 2)$_2$/(p11)$_2$ se constituent. Ainsi, soit en interaction directe avec la membrane (**2**), soit par l'intermédiaire de AHNAK (**3**), les complexes (Annexine 2)$_2$/(p11)$_2$ permettent le rapprochement des radeaux de cholestérol et l'arrimage de filaments d'actine à la membrane.

L'annexine 2 a un rôle majeur dans le remodelage du cytosquelette d'actine. Elle est à l'origine de la formation d'un piédestal à base d'actine qui permet l'attachement du pathogène *Escherichia coli* à la membrane des cellules gastro-intestinales **(Gerke et al., 2005; Merrifield et al., 2001; Zobiack et al., 2002)**. De plus, dans les contacts naissant entre les cellules épithéliales, elle induit indirectement une réorganisation du cytosquelette d'actine en re-localisant Rac1 à la membrane où cette protéine favorise un remodelage dynamique de l'actine **(Hansen et al., 2002)**. L'annexine 2 aurait enfin également un rôle dans l'arrêt de la

polymérisation de l'actine en inhibant l'élongation des filaments par leur extrémité barbée **(Hayes et al., 2006)**. Ainsi, l'annexine 2 exerce un véritable contrôle de la dynamique du réseau d'actine.

2.1.2 Article n°2 : rôle d’un partenaire de la jonction : l’annexine2

Contribution of annexin 2 to the architecture of mature endothelial adherens junctions

Running title: **Annexin 2 stabilizes interendothelial junctions**

Stéphanie Heyraud[1], Michel Jaquinod[2], Claire Durmort[3], Emilie Dambroise[1], Evelyne Concord[1], Jean Patrick Schaal[4], Philippe Huber[1], and Danielle Gulino-Debrac [1§]*

Key words: VE-cadherin; annexin 2; actin; adherens junctions

[1] Laboratoire de Physiopathologie vasculaire, INSERM U882; [2] EDyP, INSERM UM201; [3] LIM, IBS, CNRS UMR 5075; CEA, Direction of Life Sciences, 38054 Grenoble, France; Joseph Fourier University, 38054 Grenoble, France

[4] Département de Gynécologie Obstétrique, Centre Hospitalier Universitaire Michallon, BP 217, 38043 Grenoble Cedex 09, France

[§] corresponding author: D. Gulino-Debrac, iRTSV, APV, INSERM U882, CEA-Grenoble, 17 rue des Martyrs, 38054 Grenoble Cedex 9, France; email: danielle.gulino@cea.fr

Number of characters:

Title: 75

Condensed title: 86

Abstract: 155 words

Introduction: 906 words; Results: 2466 words; Discussion: 1575 words

Materials and methods: 978 words

Abstract (155 words)

The VE-cadherin-based complex is involved in the maintenance of vascular endothelium integrity. Using immunoprecipitation experiments, we have demonstrated that, in confluent human umbilical vein endothelial cells, the VE-cadherin-based complex interacts with annexin 2 and that annexin 2 translocates from the cytoplasm to the cell-cell contact sites as cell confluence is established. Annexin 2, located in cholesterol rafts, binds both to the actin cytoskeleton and the VE-cadherin-based complex so the complex is docked to cholesterol rafts. These multiple connections prevent the lateral diffusion of the VE-cadherin-based complex thus strengthening adherens junctions in the ultimate steps of maturation. Moreover, we observed that the down-regulation of annexin 2 by siRNA induces a delocalization of VE-cadherin from adherens junctions and consequently a destabilization of these junctions. Furthermore, our data indicate that the decoupling of the annexin 2/p11 complex from the VE-cadherin-based junction, triggered by Vascular Endothelial Growth Factor treatment, facilitates the switch from a quiescent to an immature state.

Introduction

Vascular endothelium consists of a monolayer of endothelial cells which lines the whole vascular tree. It forms an active boundary between the bloodstream and the underlying tissues thus controlling the movement of circulating white cells between blood and inflamed tissues. The endothelium is also at the origin of the extension of pre-existing vasculature through formation of neo-vessels, a process named angiogenesis **(44)**. Adherens and tight junctions which hold together endothelial cells modulate leukocyte traffic and angiogenesis. Without diminishing the importance of tight junctions, adherens junctions are particularly crucial in controlling the formation and maintenance of interendothelial adhesion.

Endothelial cells express a cell-specific cadherin designated as Vascular Endothelial cadherin (VE-cad) which constitutes the main component of interendothelial adherens junctions **(4, 13, 30)**. This transmembrane adhesive protein plays a crucial role in the maintenance of endothelium integrity and in the modulation of its permeability **(3, 20)**. As for other members of the cadherin receptor family, VE-cad links endothelial cells together by homophilic interactions mediated by its extracellular part and associates intracellularly with β- or γ-catenin in a mutually exclusive fashion and with p120. Despite their sequence similarities, β-/γ-catenins and p120 bind to distinct sites on the cytoplasmic tail of VE-cad. While β-catenin or γ-catenin links to the distal part of the VE-cad cytoplasmic tail, p120 interacts with the membrane proximal domain. These three catenins also exhibit different biological cellular roles. Whereas p120 stabilizes VE-cad at the plasma membrane **(47, 48),** β-/γ-catenins interacts with α-catenin. Afterwards in the manuscript, the complex formed by VE-cad and α-, β-, γ-, p120 catenins is designated as "VE-cad-based complex" or "VE-cad complex".

Until recently, it was commonly admitted that α-catenin binding to β- or γ-catenins promotes connections between the VE-cad-based complex and the actin cytoskeleton, thus strengthening the VE-cad ectodomain-based interactions **(8, 35, 39)**. But this concept was challenged since it was recently demonstrated that α-catenin cannot simultaneously bind to β-catenin and the actin cytoskeleton **(49)**.

Although it would be premature to dismiss a role for α-catenin, it is possible that some other actin-binding proteins that bind to the different components of adherens junctions might also be involved in the connection of the VE-cad complex with the actin cytoskeleton. In fact, during the cadherin-mediated cell-cell adhesion, the actin cytoskeleton undergoes a drastic reorganization. Thus, it was recently reported that, upon cadherin liganding, two actin populations with a different spatial distribution are clearly distinguishable at early epithelial cell-

cell contacts **(50)**. The first population is composed of thin circumferential actin bundles and the second is localized at cell-cell junctions. These two actin populations are regulated by distinct mechanisms. Indeed, the actin bundles are formed by reorganizating pre-existing actin filaments and the junctional filaments by *de novo* actin polymerization. To ensure the dynamic coordination between cadherin homophilic liganding and the remodelling of both actin populations, more regulatory proteins are required than assumed previously **(33)**.

To bring some light on the connection existing between the VE-cad-based complex and the actin cytoskeleton, we examined the composition of the junctional VE-cad-based complex extracted from confluent endothelial cell monolayers by combining anti-VE-cad immunoprecipitation (IP) with proteomic tools, thereby identifying novel VE-cad partners (**unpublished data**). In these experiments, annexin 2 (A2) was identified as one of the most abundant VE-cad partners.

The superfamily of annexins forms a Ca^{2+}-dependent regulated class of proteins able to dock in a reversible manner onto the inner leaflet of the plasma membrane by interacting with acidic phospholipids **(19)**. A2 interacts, *via* its N-terminal domain, with p11 (also called S100A10) to form a heterotetramer in which a central p11 dimer connects two A2 monomers (12, 26, 32). Moreover, A2 exhibits an F-actin binding site localized within the last 9 amino acid residues of its C-terminus **(17)**. A2 is not only able to bind to actin but can also bundle actin filaments **(22)**. It participates in the regulation of membrane organization and more particularly in the assembly of cholesterol rafts **(2)**. These A2 containing- cholesterol rafts are highly dynamic membrane domains that serve as F-actin assembly platforms. The precise role of A2 in the dynamic remodelling of these platforms remains to be elucidated. Nevertheless, Hayes et al. recently demonstrated that A2 regulates actin polymerization by interfering with the barbed ends of growing actin filaments **(23)**.

In the present manuscript, we examined the role played by A2 in the regulation and/or stabilization of endothelial adherens junctions. We have demonstrated by immunoprecipitation that A2 interacts directly with the junctional VE-cad-based complex. In addition, our results prove that A2 is absolutely required to maintain VE-cad at cell-cell junctions. Our data also indicate that A2 docks the VE-cad-based complex to cholesterol rafts and binds actin fibers to the complex as cells reach confluence. Thus, connection of the VE-cad-based complex to both cholesterol rafts and to A2-anchored actin filaments strengthens adherens junctions in the ultimate step of maturation.

Reciprocally, it can be assumed that the opening of adherens junction may result from A2 and VE-cad-based complex decoupling. To test this hypothesis, we evaluated effects of the pro-

angiogenic Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) on the A2/VE-cad-based complex organization in HUVECs. We showed that VEGF induced a drastic perturbation of the VE-cad localization, a release of A2 from the plasma membrane to the cytoplasm and a decoupling of A2 from the VE-cad-based complex. This dissociation leads to the disconnection of the VE-cad complex from the actin cytoskeleton, an event that may constitute one of the earliest steps in adherens junction destabilization favoring the increase of vascular permeability.

Materials and methods

Reagents and antibodies

The monoclonal anti-VE-cad antibody BV9 was from Santa Cruz Biotechnologies. The polyclonal antibody directed against human VE-cad anti-Cad3 was produced as previously described **(24)**. Anti-annexin 2, anti-annexin 1, anti-annexin 5, anti- α-, β-, γ- catenins and anti-PECAM-1 antibody were purchased from BD Biosciences. Anti-N-cadherin antibody and rabbit non-immune IgG were purchased from DakoCytomation. Anti-β-actin, FITC- and TRITC-phalloidin, methyl β cyclodextrin (MβCD) and latrunculin B (La B) were from Sigma-Aldrich. Cy2- or Cy3-goat anti-rabbit antibodies and Cy2- or Cy3-goat anti-mouse antibodies were purchased from Immunotech. Cy5-goat anti-mouse and Cy5-goat anti-rabbit antibodies were provided by Amersham Biosciences. Alexa 488-labelled goat-anti-IgG1, Cy3-labelled goat-anti-IgM were purchased from Molecular Probes. Recombinant VEGF was from PeproTech Inc.

Cell culture

HUVECs were isolated and cultured as previously described **(30)**. Only cells on passage 2 were used.

Immunofluorescence microscopy

After treatment, cells cultured on fibronectin-coated glass coverslips were fixed and permeabilized in methanol 85%, 15 mM PIPES pH 7.7, 2 mM $MgCl_2$ for 10 min at -20°C and blocked with 0.5% BSA in PBS. After several washing steps in PBS, cells were incubated with primary antibodies and then with the adequate secondary antibodies. The coverslips were mounted onto slides with DAPI-containing mowiol 40-88 (Sigma-Aldrich). Cells were then observed using an Axioplan 2 microscope (Zeiss) equipped with an Achroplan x 50 objective. Images were captured with an AxioCam MR camera using Axiovision software.

When specified, cells were observed on a confocal microscope TCS-SP2 (Leica) with a x63/1.4 objective. For image acquisition (1024x1024, 8bit), Alexa 488, TRITC, Cy5 and DAPI fluorescence were excited and collected sequentially (400 Hz line by line) by using the 488nm wavelength of an argon laser for Alexa 488, the 543nm wavelength of an helium-neon laser for TRITC, the 633nm wavelength of an helium-neon laser for Cy5 excitation and the 405nm wavelength of a photodiode for DAPI. Fluorescence emission was collected from 498 to 540nm for Alexa488, from 573 to 630 nm for TRITC, from 644 to 720nm for Cy5 and from 410 to 460nm for DAPI.

Immunoprecipitation (IP)

Affinity beads were prepared as followed: 60 µg of affinity-purified anti-Cad 3 or 6 µg of anti-A2 antibodies were mixed with 30 µL of a suspension of protein A- or protein G- Sepharose beads respectively (Sigma-Aldrich). After a 2 hour incubation time at 4°C, centrifugation at 200 g during 5 min and several washs in PBS, grafted beads were equilibrated in the lysis buffer L (10 mM PIPES pH 7, 100 mM NaCl, 300 mM sucrose, 3 mM $MgCl_2$, 1 mM EDTA, 2 mM PMSF, 5 µg/mL leupeptine, 2 µg/mL aprotinine) containing 0.5% IGEPAL CA-630. HUVEC monolayers were washed twice with PBS, lysed in 1 mL of 0.5% IGEPAL-containing buffer L for 20 min at 4°C. After lysate centrifugation at 15 000 g for 10 min, supernatants were incubated overnight at 4°C under continuous mixing with antibody-grafted protein A-/G-Sepharose beads. IPs were each time performed on a 78 cm² cell monolayer. To elute immunoprecipitated proteins, beads were washed 3 times in lysis buffer and then boiled in 50 µL Laemmli buffer for 10 min. Whole elutions were loaded on SDS-PAGE for Western blot analysis.

Cell treatments

After brief washing in PBS, HUVEC monolayers were incubated in culture medium containing either 3.8 mM MβCD for 30 min or 0.5 µM La B for 5 min. To determine whether VE-cad was internalized following La B treatment, La B-treated cells were incubated with trypsin-EDTA at 0.5 g/L for 2 min prior cell lysis and Western blot analysis.

HUVECs were starved between 3 and 6h before a 30 min stimulation with either VEGF (50 ng/mL) in serum-free medium.

Subcellular fractionations

To separate cytoplasm from membrane, HUVEC monolayers were lysed in detergent-free buffer L. After centrifugation at 1000 g for 3 min at 4°C to remove unbroken cells, supernatants were collected and recentrifuged at 150 000 g for 30 min at 4°C. The resulting supernatants corresponded to the non-membrane fractions, designated as the cytoplasmic fraction afterwards in the manuscript, and pellets, resuspended in 0.5% IGEPAL-containing buffer L, to the membrane fractions. To isolate cholesterol raft-associated proteins, membrane pellets were resuspended in buffer L containing 0.01% digitonin. After a 20 min incubation on ice, homogenates were centrifuged at 150 000 g for 30 min at 4°C. The resulting supernatants

contained cholesterol raft-associated proteins while the pellets contained the other membrane-associated proteins.

LC-MS/MS

Cholesterol raft-associated proteins were separated on 4-12% gradient gel (Criterion™ XT Precast, BioRad) and gels were stained by Coomassie blue (Bio-Safe Coomassie G250 stain, BioRad). The Coomassie-blue stained protein bands were in-gel digested with trypsin and the recovered peptides were separated by liquid chromatography on silica C18 column (Dionex) prior to analysis on an integrated nanoLC-MS/MS system. Peptide identification from the resulting MS/MS dataset was achieved using an in-house MASCOT server (Matrix Sciences, London).

Western blotting

Cell extracts were analyzed under reducing conditions by SDS-PAGE using either 10% Tris-Glycine or 15% Tris-Tricine home-made gels, or 4-12% gradient Criterion™ XT gels and electro-transferred onto a pure nitrocellulose membrane (BioRad). After blocking with 5% non-fat dry milk, proteins were detected by specific primary antibodies and horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse or anti-rabbit antibodies (Sigma-Aldrich). The immunoreactive bands were revealed using the ECL Western blotting detection kit (Amersham Biosciences). Signals recorded on autoradiography films (Amersham Biosciences) were quantified using a Gel Doc EQ apparatus and Quantity One software (BioRad).

siRNA interference

21-nt siRNA duplex 5'-UCAUCCACACCUUUGGUCUUU-3' and 5'-UCAGCAUCAAAGUUAGUAUUU-3' targeting sequences for human A2 were purchased from Dharmacon. HUVECs were plated a day before siRNA transfection in medium without antibiotics. 75 pmoles of siRNA were transfected with Oligofectamin (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Transfection was performed twice at an interval of 24 hours. Then, siRNA-transfected HUVECs were plated on glass coverslips in complete medium and used for various experiments 24 and 48h after plating. Cells were then fixed at 4 or 5 day post-transfection.

Results

Cell density-dependent localization of annexin 2 to endothelial cell-cell junctions

By combining immunoprecipitation with proteomic studies, we recently determined the protein composition of confluent HUVEC adherens junctions (unpublished data). Numerous actin-binding proteins, not previously thought to localize at adherens junctions, were thus revealed. Among them, A2 was found. Here, we examined the possible role of A2 in the regulation and/or stabilization of VE-cad-based adherens junctions.

First, the subcellular localization of A2 was explored in density-increasing HUVEC monolayers. To do so, the membrane and cytoplasmic fractions were separated from subconfluent and confluent HUVECs by ultracentrifugation and analyzed by Western blot (**Fig 1A**). As expected, in subconfluent as well as in confluent cells, VE-cad was found in the membrane fraction (**Fig 1A**, lanes 2 and 4). The absence of VE-cad in the cytoplasm attested that this fraction was not contaminated by membranes (**Fig 1A**, lanes 1 and 3). On the contrary, it was observed that A2, which was exclusively found in the cytoplasmic fraction in subconfluent cells, distributed between the cytoplasm and the membranes in confluent cells (**Fig 1A**). These results showed that A2 partially translocated from cytoplasm to membranes as cell confluence increased.

To demonstrate A2 translocation, an immunocytochemical localization of A2 was performed on HUVECs plated at different densities. **Fig 1B** shows that A2 is exclusively cytoplasmic in subconfluent cells (Subconfluent, A2, and Magn., magnified image) and accumulates at the plasma membrane as cell confluence increases (Confluent, A2, and Magn., magnified image). To assess whether VE-cad and A2 co-localize at cell-cell contacts, confocal microscopy analysis was performed on 650nm optical sections (**Fig 1C,** larger areas are also shown in supplementary data **Fig S1**). This revealed that VE-cad and A2 effectively co-localized along the whole cell-cell junction (**Fig 1C**, white). Nevertheless, some minor restricted areas exhibit juxtaposed red and green dots, indicating thus that a few amount of A2, even thought localized at the plasma membrane, was not associated with the VE-cad-based junction (**Fig 1C**, merge). Moreover, at cell-cell contacts, A2 and VE-cad co-localize with the actin cytoskeleton (**Fig 1B**, Confluent, A2, and Magn., magnified image).

It is notable that the adherens junction architecture changes with increasing cell density. Actually, subconfluent cells possess an elongated shape and adherens junctions appear immature exhibiting a thin, discontinuous and zigzag staining for VE-cad (**Fig 1B**, VE-cad). As the cell density increased, cells adopted a cobblestone morphology and adherens junctions presented an intense linear VE-cad staining (**Fig 1B**, VE-cad). Moreover, phalloidin staining indicated that

parallel actin stress fibers visible in subconfluent HUVECs progressively re-orientated to constitute the actin cortical ring in confluent cells (**Fig 1B**, actin). This indicates that, as cell confluence is established, the actin cytoskeleton undergoes a major remodelling which correlates with the arrival of A2 at cell-cell junctions.

Connection of annexin 2 to the VE-cadherin-based complex

To assess whether A2 is associated with the VE-cad/catenin complex, A2 immunoprecipitates were analyzed by Western blot. As reported in **Fig 2 A**, antibodies directed against VE-cad, p120, α-, β- and γ-catenins recognized bands of 150, 120-100, 110, 93 and 83-80 kDa respectively. Besides VE-cad and catenins, p11, the protein known to form a heterotetrameric complex with A2 at the plasma membrane **(40)**, was also detected in the anti-A2 immunoprecipitates (**Fig 2 A**). Conversely, anti-VE-cad immunoprecipitation showed association with A2 only when cells have reached confluence (**Fig 2 B**). Other annexins expressed in endothelial cells such as annexin 1 (A1) and annexin 5 (A5) (**Table 1**), were not detected in anti-VE-cad IPs (**Fig 3 A**). Moreover, VE-cad was detected neither in anti-A1 (**Fig 3 B**) nor anti-A5 (**Fig 3 C**) IPs performed on confluent HUVECs. Altogether, these data indicate that the A2/p11 complex is associated with the VE-cad/catenin complex at adherens junction sites in confluent cells. It is noteworthy that N-cadherin, the other cadherin expressed by endothelial cells, and PECAM1, a transmembrane receptor that localizes at interendothelial cell-cell contacts, were not detected in anti-A2 IPs **(Fig 2A)**. Altogether, the results attested that A2 interacts specifically with the VE-cadherin-based complex.

Based on these results, A2 and the VE-cad-based complex may be either directly connected or associated *via* actin filaments. To resolve this question, the actin cytoskeleton was depolymerized in confluent HUVECs with La B **(11)**. Once the membrane and cytoplasm fractions were separated from cells either treated or not with La B, the subcellular localization of A2, actin and VE-cad was analyzed by Western blot (**Fig 4 A**). Quantification of the blotted bands indicated that the amount of membrane-associated A2 remained approximately constant before and after La B treatment (**Fig 4 A**). By contrast, a loss of 40% of the amount of membrane-associated actin was observed after La B treatment (**Fig 4 A**). This indicated that actin depolymerization did not induce a release of A2 from membranes. This is in agreement with confocal and phase contrast microscopy analyses performed on untreated and La B-treated HUVECs (**Fig 4 B**). The drug-induced depolymerisation of actin filaments lead to cell retraction and cell-cell junction disruption (**Fig 4 B, PC**). In spite of this drastic treatment, A2 remained co-localized with VE-cad at the cell edge, suggesting that VE-cad and A2 interact without requiring

actin filaments. Furthermore, anti-VE-cad and anti-A2 IP experiments were performed on HUVECs treated or not with La B (**Fig 4 C**) and the blotted bands were quantified (data not shown). Similar amounts of A2 were detected in VE-cad immunoprecipitates isolated from either La B- or non-treated cells. Conversely, in A2 immunoprecipitates, the amount of VE-cad co-immunoprecipitated remained unchanged between treated and untreated cells (**Fig 4 C**). These experiments revealed that, after actin cytoskeleton depolymerization, A2 did not decouple from the VE-cad-based complex. It could be concluded that, in confluent endothelial cells, the association of the A2/p11 complex to the junctional VE-cad-based complex does not require actin filaments.

Contribution of cholesterol raft-associated annexin 2 to the stability of adherens junctions

To evaluate the contribution of A2 in the localization of VE-cad at cell-cell junctions, A2 was knocked-down in HUVECs using a pool of two selected small interfering RNA (siRNA). Practically, one day after the second siRNA transfection, HUVECs were plated on glass coverslips and allowed to grow for additional 24 or 48 h periods of time prior to fixation. Four days after A2 siRNA transfection, immunoblot analysis indicated that 50 to 70% of A2 expression was abrogated while a scrambled siRNA had no effect (**Fig 5 A**). The effect observed with the A2 siRNA was specific since the expression of proteins such as actin, VE-cad and annexins 1 and 5 was not down-regulated following A2 siRNA transfection (**Fig 5 A**).

siRNA transfection induced no cell retraction as attested by phase contrast microscopy (data not shown). The effect of A2 down-regulation on VE-cad localization was then analyzed by immunofluorescence microscopy 24 and 48h after cell seeding on glass coverslips. At 24 or 48 h post seeding time, the immunofluorescence signal for A2 was undetectable in some cells while unaffected in others. This heterogeneity reflected the difficulty to transfect siRNA in HUVECs. As expected, transfection of the scrambled siRNA had no effect on A2 and VE-cad localization. At 24 h post-cell seeding time, A2 siRNA induced a drastic loss of VE-cad at adherens junctions between adjacent transfected cells (**Fig 5 B**). At 48 h post-cell seeding time, VE-cad began to re-appear at cell-cell junctions exhibiting a zigzag staining pattern, a characteristic feature of immature junctions. Thus, it could be concluded that A2 down-regulation significantly disturbs the localization of VE-cad at cell-cell junctions.

Knock-down by siRNA affected the whole pool of cellular A2. Consequently, it was difficult to state whether either membrane-associated A2 or cytoplasmic A2 was involved in the observed phenotype. To discriminate between these two possibilities, the cholesterol raft-disrupting drug MβCD **(10)** was used to release A2 from the plasma membrane. Subcellular

fractionation combined with immunoblotting analysis indicated that, following MβCD treatment, 60% of the membrane-bound A2 was released to the cytoplasm whereas, as expected, in confluent untreated HUVECs, A2 was mainly associated to membranes (**Fig 6 A** and **B**). 82% of actin remained associated with membranes after MβCD treatment indicating that actin was weakly affected by the drug (**Fig 6 A** and **B**).

As revealed by immunofluorescence microscopy, treatment of confluent HUVECs with MβCD provoked a disruption of adherens junctions leading to the formation of large gaps in the monolayer (**Fig 6 C**). Some cell-cell junctions resisted this treatment possibly due to poor accessibility of MβCD to cholesterol rafts. This cell-cell contact destabilization might result from adherens junction disruption possibly caused by VE-cad internalization or degradation. To determine whether VE-cad internalization took place subsequently to MβCD treatment, HUVECs were trypsinized prior to lysis. This trypsinization was used to remove cell surface-expressed VE-cad molecules while leaving intact internalized ones. Western blot analysis revealed that A2 and β-catenin, the loading control, showed no appreciable variation in protein levels (**Fig 7 A**). By contrast, trypsinization degraded the totality of VE-cad in both MβCD-treated and untreated HUVECs attesting that VE-cad remained at the cell surface following MβCD treatment (**Fig 7 A,** lanes 2 and 4). This experiment also revealed that following MβCD, VE-cad did not undergo degradation (**Fig 7 A,** compare lanes 1 and 3). It could be concluded that destabilization of adherens junctions observed subsequently to MβCD treatment was neither due to the loss of membrane-associated VE-cad nor to its degradation.

To search for the intracellular event involved in such a phenotype, the VE-cad-based complex was isolated by IP from either MβCD-treated or untreated HUVECs and its composition analyzed by Western blotting (**Fig 7 B**). Anti-VE-cad IP showed that following MβCD treatment, the VE-cad/catenin complex remained intact. On the contrary, a partial release of A2 from the VE-cad-based complex was observed (**Fig 7 B**). Anti-A2 IP confirmed the partial decoupling of A2 from the VE-cad/catenin complex in MβCD-treated cells. Consequently, it could be assumed that the MβCD-induced destabilization of adherens junctions resulted from the release of cholesterol raft associated-A2 and its disconnection from the VE-cad-based complex.

Actin was detected in both anti-VE-cad and anti-A2 IP isolated from confluent endothelial cells (**Fig 7 B**). But, after MβCD treatment, actin association was decreased in both VE-cad and A2 immunoprecipitations, therefore A2 exclusion from cholesterol rafts paralleled VE-cadherin-actin dissociation (**Fig 7 B**). Altogether, our results suggest that A2 connects the VE-cad-based complex to the actin cytoskeleton. This hypothesis is consistent with the drastic reshaping of actin filaments observed in MβCD-treated cells by immunofluorescence microscopy

(**Fig 7 C**). Indeed, in control untreated cells, actin fibers were parallel to the cell-cell junctions as defined by A2 and VE-cad labelling. On the contrary, after MβCD treatment, A2 disappeared from most cell-cell contact sites (**Fig 7 C**, magnified boxed area). Actin fibers adopted a radial orientation and VE-cad exhibited a zig-zag pattern staining at cell-cell junction reminiscent of the immature junction pattern.

Altogether, these results indicate that by stabilizing the cortical actin fibers and connecting the VE-cad-based complex, A2 is a major actor in the maintenance of endothelial adherens junction integrity.

Annexin 2-mediated docking of the VE-cadherin-based complex to cholesterol rafts

To determine whether VE-cad and the other proteins constituting the interendothelial adherens junctions were associated with cholesterol rafts, cholesterol-associated proteins were extracted from confluent HUVEC membranes using digitonin, a detergent able to bind exclusively to membrane-linked cholesterol **(15)**. Identification of proteins present within cholesterol rafts was achieved after in-gel digestion by trypsin and analysis of the resulting peptides by mass spectrometry (**Table 1** and complete results available on request to the corresponding author). As expected, clathrin and caveolin-1, two markers of cholesterol rafts, were detected thus attesting that the fractionation was correct. Although this protein extraction method enabled the solubilization of transmembrane proteins such as PECAM-1 and integrin β-1, VE-cad was not detected in the cholesterol rafts (**Table 1**). β-catenin, α-catenin, vinculin and α-actinin were the only proteins belonging to adherens junctions extracted by digitonin treatment (**Table 1**). Actin, tubulin and cytoskeleton-associated proteins such as actin-related protein 3 were also detected. In addition to A2, A1, A5 and annexin 6 were also found as well as AHNAK and moesin, two proteins known to belong to cholesterol rafts in other cell types **(18, 21)**.

Western blot analysis mostly confirmed most of the proteomic study i.e. the presence of A2, moesin, α-actinin, β-catenin, PECAM-1 and the absence of VE-cad, γ-catenin and p120 in cholesterol rafts (**Fig 8**). Additionally, the phosphatase SHP2 and the A2 partner p11 were also detected using specific antibodies. The only divergence observed between proteomic and Western blotting analyzes concerned α-catenin that was detected in cholesterol rafts by proteomic study (**Table 1**) and not by Western blotting (**Fig 8**). Other relevant proteins not present in the cholesterol raft fraction (lane 4) were found either in the cytoplasmic (lane 1) and total membrane fractions (lane 2) or in the fraction containing all the membrane-associated proteins not solubilized by digitonin (lane 3).

Furthermore, the fractionation method illustrated in **Fig 8** allowed a quantitative comparison of the amounts of proteins present in each fraction. It could be evaluated by Western blot analysis that approximately 70% of membrane-tethered-A2 and -moesin were concentrated in the cholesterol rafts. As expected, VE-cad, α- and γ-catenins appeared essentially present in the membrane fractions (**Fig 8, lanes 2 and 3**) whereas p120 distributed between the membrane and the cytoplasm fractions in a 80:20 ratio.

IPs of cholesterol raft-associated A2 were performed to assess whether, within rafts, the cholesterol-associated proteins interacted with A2. Among the cholesterol raft-associated proteins, only α-actinin, β-catenin, SHP2, actin and p11 appeared to be connected to cholesterol-associated A2 (**Fig 8, lane 5**). Moreover, compared to the raft fraction, the A2 immunoprecipitates were enriched in α-actinin and SHP2 (**Fig 8,** compare lanes 4 and 5).

Effects of VEGF on A2 localization at cell-cell contacts

VEGF is a cytokine known for its capacity to increase vascular permeability. We examined the localization of VE-cad and A2 in HUVECs in the presence or absence of VEGF. After a 30 min treatment with VEGF, VE-cad staining was greatly disturbed compared to control (**Fig 9 A**). At some cell-cell junction sites (**Fig 9**, VEGF, full arrow heads), VE-cad labelling exhibited a spike pattern reminiscent of what was observed in MβCD-treated cells (**Fig 7 C**). Furthermore, at these particular sites, no A2 was detected at cell-cell contacts. These data suggest that treatment of HUVECs by physiological agonists of vascular permeability such as VEGF may induce the decoupling of the A2/p11 complex from the VE-cad-based junction. To verify this hypothesis, anti-VE-cad IPs were performed on confluent HUVECs treated or not with VEGF **(Fig 9 B)**. It appeared that, following VEGF treatment, A2 was totally released from the VE-cad-based complex. Concomitantly, the amount of actin co-immunoprecipitated with VE-cad was drastically reduced. Altogether, these data indicated that VEGF treatment results in a VE-cad-based complex/A2 decoupling leading to a partial disconnection of the VE-cad-based complex from the actin cytoskeleton.

Discussion

Until recently, the VE-cad-based adherens junction was thought to be basically composed of the transmembrane adhesive receptor VE-cad, β-catenin and α-catenin bound directly to actin filaments **(13, 37)**. This model was elaborated only by considering indirect evidence. Recently, it was established that α-catenin cannot bind simultaneously to the cadherin/catenin complex and to actin filaments demolishing the idea that α-catenin constitutes the direct link between the actin cytoskeleton and adherens junctions **(49)**. Nevertheless, the actin cytoskeleton appears to play a crucial role in the regulation of adherens junction stability (33, 45). In fact, the interactions between the VE-cad-based complex and the underlying actin cytoskeleton are very dynamic and probably modulated by several intermediate proteins **(46)**. Obviously, it is of great interest to determine the nature of the proteins involved in this controversial connection. Using proteomic tools, we recently discovered that the VE-cad based complex is associated with several acting-binding proteins. Among them, A2 constituted one of the most abundant proteins. In the present manuscript, we established the role played by A2 in the stabilization of interendothelial adherens junctions.

Firstly, we observed that A2 translocates from the cytoplasm to the plasma membrane and more particularly to cell-cell contact sites as HUVECs become confluent (**Fig 1A and 1B**). This correlates with the fact that A2 docks to these specific sites when VE-cad-mediated adherens junctions reach maturity. Although the mechanism underlying the A2 targeting to membrane as cell confluence establishes remains to be elucidated, it probably requires the formation of the heterotetramer $(A2)_2(p11)_2$ (12). Indeed, immunofluorescent labelling of p11 and A2 perfectly overlapped with that of VE-cad at cell-cell junctions (data not shown).

Secondly, using immunoprecipitation experiments, we demonstrated that both A2 and p11 subunits interact with the VE-cad-based complex composed at least of VE-cad, α-, β-, γ-catenins and p120. This interaction is independent of actin filament binding since it is not abolished by drug-induced actin depolymerization treatment (**Fig 4**). By contrast, no interaction between A2 and N-cadherin, the other cadherin present in endothelium, was detected. Similarly, A2 does not interact with PECAM1, a receptor expressed at endothelial adherens cell-cell junctions. Moreover, among annexins expressed in the endothelium, only A2 possesses the ability to interact with the VE-cad-based complex.

The fact that the A2/p11 complex interacts with the VE-cad complex when cells reach confluence suggests that it may be involved in the maturation of interendothelial adherens junctions. This hypothesis is supported by the fact that abrogation of the expression of A2 in

HUVECs by specific siRNA (**Fig 5 A**) drastically disturbs the localization of VE-cad at cell-cell junctions (**Fig 5 B**).

Furthermore, our experiments performed on confluent endothelial cells pre-treated with MβCD, a cholesterol raft-disrupting drug **(10, 28)**, established that approximately 60% of the membrane-tethered pool of A2 are released into the cytoplasm (**Fig 6 B**). This results in a destabilization of adherens junctions with formation of intercellular gaps at some cell-cell contact sites (**Fig 6 C**). This destabilization is neither due to internalization nor degradation of VE-cad as attested by trypsin digestion experiments (**Fig 7A**) but from a delocalization of VE-cad from cell-cell junctions (**Fig 6 C**). The mechanism by which MβCD induces the disconnection of A2 from the VE-cad complex remains unknown. It can not be excluded that this event may result from the release of signalling proteins usually located in the cholesterol rafts **(36)**. siRNA down-regulation of A2 and MβCD-mediated depletion of membrane-associated A2 lead to very similar cellular effects i.e. partial disappearance of VE-cad from cell–cell junctions and a corollary destabilization of adherens junctions. The intracellular events involved in the stabilization/destabilization of interendothelial adherens junction thus appear to be related to the coupling/decoupling of the VE-cad-based complex and the A2/p11 complex.

As previously observed, a drastic actin cytoskeleton remodelling takes place during the maturation of endothelial adherens junctions. At cell subconfluence, HUVECs exhibit a network of parallel stress fibers while, at confluence, actin fibers aligned along cell-cell junctions to elaborate the actin cortical ring (**Fig 1B**). The formation of the actin cortical fibers locally and temporally correlates with the progressive arrival of A2 at the inner leaflet of the plasma membrane. As A2 is known to strongly interact with F-actin **(23)**, it may participate to recruitment of actin fibers at the origin of the actin cortical ring formation. Immunofluorescence analysis of cells treated with MβCD supports this view. At sites where A2 is released from the plasma membrane, the actin cortical ring is locally disrupted and actin fibers adopt a radial orientation (**Fig 7 C**). At these sites, A2 decouples from both the plasma membrane and the VE-cad-based complex (**Fig 7 B** and **Fig 7 C**). It can be deduced that, by connecting the actin cortical filaments to the VE-cad-based junction, the membrane-associated pool of A2 participates in the maintenance of adherens junction stability.

In confluent HUVEC, approximately 70% of membrane-associated A2 are localized in cholesterol rafts (**Fig 8**). Therefore, connection with the A2/p11 complex indirectly anchors the VE-cad complex to cholesterol rafts. Due to its stoichiometry, the AII/p11 complex may dock several VE-cad-based complexes. Using electron microscopy and biochemical studies, we recently established that each VE-cad complex is formed of hexameric structures in which six

molecules of VE-cad associate in an anti-parallel manner **(5, 25, 31)**. The multiplicity of interactions between the self-associated VE-cad molecules and the A2/p11 complex may lead to the elaboration of a supercomplex embedded in cholesterol rafts. Furthermore, at membrane cholesterol raft sites, the A2/p11 complex mediates interactions with the actin cytoskeleton **(17)** **(34, 38)**. Consequently, once connected to the cholesterol raft-anchored pool of A2, the VE-cad-based complexes may be indirectly bound to actin cytoskeleton. We propose a model of VE-cad-actin interaction through A2. In subconfluent endothelial cells, the VE-cad-based complex freely diffuses laterally in the plasma membrane. Simultaneously with the arrival of A2 at the membrane, the VE-cad-based complex is progressively docked to the A2-containing cholesterol rafts and indirectly linked to the actin cytoskeleton. This entrapment provides a rigid structure that considerably restricts lateral diffusion of the VE-cad-based complex thus strengthening and stabilizating adherens junctions in confluent endothelial cells (**Fig 10**). This correlates with observations made in myoblasts in which N-cadherin lateral diffusion is increased when raft structures are disrupted **(9)**.

To determine how the VE-cad-based complex and A2 are inter-connected, the cholesterol raft-associated proteins were isolated by digitonin extraction of cholesterol-bound proteins combined with ultracentrifugation. Identification of these proteins was obtained after their in-gel digestion by trypsin and analysis of the resulting peptides by mass spectrometry (**Table 1 and Fig 8**). Strikingly, VE-cad was not detected within the cholesterol raft-associated protein fraction whereas A2 was found. This suggests that the connection between the VE-cad-based complex and A2 is mediated through intermediate proteins possibly identified as those associated with A2 within cholesterol rafts. Our proteomic analysis reveals that, in cholesterol rafts, A2 interacts with actin, β-catenin, α-actinin, p11 and SHP2 (**Fig 8, lane 5**). This suggests that these last three proteins constitute candidates able to potentially connect A2 to the VE-cad/β-catenin complex.

Among the identified proteins, the phosphatase SHP2 is an interesting candidate. Indeed, on one hand, it was demonstrated to co-immunoprecipitate with the VE-cad-based complex by selectively interacting with β-catenin in confluent quiescent HUVECs **(41)**. This interaction maintains β-catenin under its dephosphorylated form **(6, 27)**. On the other hand, immunoprecipitation experiments performed on confluent cow pulmonary aortic endothelial cells revealed that SHP2 co-immunoprecipitates with A2 (7). Moreover, tyrosine phosphorylation of SHP2 promotes its dissociation from the VE-cad-based complex when HUVECs were activated by agonists able to increase vascular permeability such as thrombin **(41)**. This correlates with a drastic increase in tyrosine-phosphorylation of β-catenin. Consequently, the ability to associate with the VE-cad-based complex in a tyrosine phosphorylation-dependant manner may confer the

capacity to regulate the interaction between A2 and the VE-cad-based complex to the cholesterol raft-tethered pool of SHP2.

Endothelial adherens junctions are impaired in events such as angiogenesis **(42, 44)**. We reasoned that adherens junction opening might be correlated with the disconnection of A2 from the VE-cad-based complex. To test this hypothesis, we submitted confluent HUVEC monolayers to VEGF, a cytokine able to disrupt adherens junctions during *in vivo* and *in vitro* angiogenesis processes **(14, 29)**. Following this treatment, the junctional localization of A2 was dramatically disturbed (**Fig 9 A**). In fact, A2 is decoupled from the VE-cad-based complex subsequently to VEGF treatment (**Fig 9 B**). The VE-cad complex/A2 disruption that may be due to an indirect action of VEGF correlates with a disconnexion of the VE-cad-based complex from the actin cytoskeleton.

It could be assumed that, consecutively to MβCD or VEGF treatments, VE-cad and the catenins become phosphorylated **(16)** either by protein kinases such as Src **(1, 43)** or by the loss of SHP2 from the VE-cad-based complex thus initiating the junction disabling. Indeed, results in the literature indicated that membrane cholesterol depletion from confluent endothelial cells with MβCD induces the phosphorylation of p120 and γ-catenin **(10)**. In both cases, phosphorylation of the adherens junction components is induced by loss of SHP2 or destabilisation of cholesterol rafts, two phenomena that implicate the plasma membrane-associated pool of A2. Whether the VE-cad/A2 disconnection is linked to the phosphorylation status of VE-cad-based complex remains to be explored.

In the present manuscript, we provide evidence for the existence of a novel mechanism able to promote the maturation of the interendothelial adherens junctions. By connecting the VE-cad-based complex to the cholesterol raft-tethered pool of A2, a stabilization of adherens interendothelial junctions occurs allowing the switch from an immature to a mature state.

Footnotes

Abbreviations used in this paper: A1: annexin 1; A2: annexin 2; A5: annexin 5; HUVEC: Human Umbilical Vein Endothelial Cell; IP: immunoprecipitation; latrunculin B: La B; Methyl-β-cyclodextrin: MβCD; siRNA: small interfering RNA; VE-cad; Vascular Endothelial-cadherin; VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor; mAb: monoclonal antibody; pAb: polyclonal antibody.

Acknowledgments

We are indebted to staff of the maternity hospital from Hôpital Nord (Grenoble, France) for kindly collecting umbilical cords for these experiments. We thank Wallez Y. and Mannic T. for their help in VEGF use, Hewat E. for critical reading of the manuscript, and D. Grunwald for taking all confocal microscopy images.

S. H. is a recipient of a fellowship from Association de Recherche sur la Polyarthrite. This work was supported by grants from CNRS (ACI PCV and DRAB), Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC N°4447 and 3775) and Alliance des Recherche sur le Cancer (ARECA-ARC).

References

1. **Angelini, D. J., S. W. Hyun, D. N. Grigoryev, P. Garg, P. Gong, I. S. Singh, A. Passaniti, J. D. Hasday, and S. E. Goldblum.** 2006. TNF{alpha} Increases Tyrosine Phosphorylation of Vascular Endothelial-Cadherin and Opens the Paracellular Pathway Through Fyn Activation in Human Lung Endothelia. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. **291:** L1232-45
2. **Babiychuk, E. B., and A. Draeger.** 2000. Annexins in cell membrane dynamics. Ca(2+)-regulated association of lipid microdomains. J Cell Biol **150:**1113-24.
3. **Bazzoni, G., and E. Dejana.** 2004. Endothelial cell-to-cell junctions: molecular organization and role in vascular homeostasis. Physiol Rev **84:**869-901.
4. **Bazzoni, G., E. Dejana, and M. G. Lampugnani.** Endothelial adhesion molecules in the development of the vascular tree: the garden of forking paths. Curr. Opin Cell Biol **11:** 573-581.
5. **Bibert, S., M. Jaquinod, E. Concord, C. Ebel, E. Hewat, C. Vanbelle, P. Legrand, M. Weidenhaupt, T. Vernet, and D. Gulino-Debrac.** 2002. Synergy between extracellular modules of vascular endothelial cadherin promotes homotypic hexameric interactions. J Biol Chem **277:**12790-801.
6. **Biswas, P., J. Zhang, J. D. Schoenfeld, D. Schoenfeld, D. Gratzinger, S. Canosa, and J. A. Madri.** 2005. Identification of the regions of PECAM-1 involved in beta- and gamma-catenin associations. Biochem Biophys Res Commun **329:**1225-33.
7. **Burkart, A., B. Samii, S. Corvera, and H. S. Shpetner.** 2003. Regulation of the SHP-2 tyrosine phosphatase by a novel cholesterol- and cell confluence-dependent mechanism. J Biol Chem **278:**18360-7.
8. **Butz, S., J. Stappert, H. Weissig, and R. Kemler.** 1992. Plakoglobin and beta-catenin: distinct but closely related. Science **257:**1142-4.
9. **Causeret, M., N. Taulet, F. Comunale, C. Favard, and C. Gauthier-Rouviere.** 2005. N-cadherin association with lipid rafts regulates its dynamic assembly at cell-cell junctions in C2C12 myoblasts. Mol Biol Cell **16:**2168-80.
10. **Corvera, S., C. DiBonaventura, and H. S. Shpetner.** 2000. Cell confluence-dependent remodeling of endothelial membranes mediated by cholesterol. J Biol Chem **275:**31414-21.
11. **Coue, M., S. L. Brenner, I. Spector, and E. D. Korn.** 1987. Inhibition of actin polymerization by latrunculin A. FEBS Lett **213:**316-8.
12. **De Seranno, S., C. Benaud, N. Assard, S. Khediri, V. Gerke, J. Baudier, and C. Delphin.** 2006. Identification of an AHNAK binding motif specific for the Annexin2/S100A10 tetramer. J Biol Chem **281:**35030-8.
13. **Dejana, E.** 2004. ENDOTHELIAL CELL-CELL JUNCTIONS: HAPPY TOGETHER. Nature Reviews Molecular Cell Biology. Nat Rev Mol Cell Biol **5:**261-270.
14. **Dejana, E., R. Spagnuolo, and G. Bazzoni.** 2001. Interendothelial junctions and their role in the control of angiogenesis, vascular permeability and leukocyte transmigration. Thromb Haemost **86:**308-15.
15. **Elias, P. M., J. Goerke, D. S. Friend, and B. E. Brown.** 1978. Freeze-fracture identification of sterol-digitonin complexes in cell and liposome membranes. J Cell Biol **78:**577-96.
16. **Esser, S., M. G. Lampugnani, M. Corada, E. Dejana, and W. Risau.** 1998. Vascular endothelial growth factor induces VE-cadherin tyrosine phosphorylation in endothelial cells. J Cell Sci **111:**1853-65.
17. **Filipenko, N. R., and D. M. Waisman.** 2001. The C terminus of annexin II mediates binding to F-actin. J Biol Chem **276:**5310-5.

18. **Foster, L. J., C. L. De Hoog, and M. Mann.** 2003. Unbiased quantitative proteomics of lipid rafts reveals high specificity for signaling factors. Proc Natl Acad Sci U S A **100:**5813-8.
19. **Gerke, V., C. E. Creutz, and S. E. Moss.** 2005. Annexins: linking Ca2+ signalling to membrane dynamics. Nat Rev Mol Cell Biol **6:**449-61.
20. **Gulino, D., E. Delachanal, E. Concord, Y. Genoux, B. Morand, M. O. Valiron, E. Sulpice, R. Scaife, M. Alemany, and T. Vernet.** 1998. Alteration of endothelial cell monolayer integrity triggers resynthesis of vascular endothelium cadherin. J Biol Chem **273:**29786-93.
21. **Harder, T., R. Kellner, R. G. Parton, and J. Gruenberg.** 1997. Specific release of membrane-bound annexin II and cortical cytoskeletal elements by sequestration of membrane cholesterol. Mol Biol Cell **8:**533-45.
22. **Hayes, M. J., U. Rescher, V. Gerke, and S. E. Moss.** 2004. Annexin-actin interactions. Traffic **5:**571-6.
23. **Hayes, M. J., D. Shao, M. Bailly, and S. E. Moss.** 2006. Regulation of actin dynamics by annexin 2. Embo J. **25:** 1816-26.
24. **Hermant, B., S. Bibert, E. Concord, B. Dublet, M. Weidenhaupt, T. Vernet, and D. Gulino-Debrac.** 2003. Identification of proteases involved in the proteolysis of vascular endothelium cadherin during neutrophil transmigration. J Biol Chem **278:**14002-12.
25. **Hewat, E. A., C. Durmort, L. Jacquamet, E. Concord, and D. Gulino-Debrac.** 2007. Architecture of the VE-cadherin Hexamer. J Mol Biol **365:**744-51.
26. **Hubaishy, I., P. G. Jones, J. Bjorge, C. Bellagamba, S. Fitzpatrick, D. J. Fujita, and D. M. Waisman.** 1995. Modulation of annexin II tetramer by tyrosine phosphorylation. Biochemistry **34:**14527-34.
27. **Ilan, N., and J. A. Madri.** 2003. PECAM-1: old friend, new partners. Curr Opin Cell Biol **15:**515-24.
28. **Kwik, J., S. Boyle, D. Fooksman, L. Margolis, M. P. Sheetz, and M. Edidin.** 2003. Membrane cholesterol, lateral mobility, and the phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate-dependent organization of cell actin. Proc Natl Acad Sci U S A **100:**13964-9.
29. **Lambeng, N., Y. Wallez, C. Rampon, F. Cand, G. Christe, D. Gulino-Debrac, I. Vilgrain, and P. Huber.** 2005. Vascular endothelial-cadherin tyrosine phosphorylation in angiogenic and quiescent adult tissues. Circ Res **96:**384-91.
30. **Lampugnani, M. G., M. Resnati, M. Raiteri, R. Pigott, A. Pisacane, G. Houen, L. P. Ruco, and E. Dejana.** 1992. A novel endothelial-specific membrane protein is a marker of cell-cell contacts. J Cell Biol **118:**1511-22.
31. **Legrand, P., S. Bibert, M. Jaquinod, C. Ebel, E. Hewat, F. Vincent, C. Vanbelle, E. Concord, T. Vernet, and D. Gulino.** 2001. Self-assembly of the vascular endothelial cadherin ectodomain in a Ca2+-dependent hexameric structure. J Biol Chem **276:**3581-8.
32. **Lewit-Bentley, A., S. Rety, J. Sopkova-de Oliveira Santos, and V. Gerke.** 2000. S100-annexin complexes: some insights from structural studies. Cell Biol Int **24:**799-802.
33. **Mege, R. M., J. Gavard, and M. Lambert.** 2006. Regulation of cell-cell junctions by the cytoskeleton. Curr Opin Cell Biol **18:**541-8.
34. **Oliferenko, S., K. Paiha, T. Harder, V. Gerke, C. Schwarzler, H. Schwarz, H. Beug, U. Gunthert, and L. A. Huber.** 1999. Analysis of CD44-containing lipid rafts: Recruitment of annexin II and stabilization by the actin cytoskeleton. J Cell Biol **146:**843-54.
35. **Ozawa, M., H. Baribault, and R. Kemler.** 1989. The cytoplasmic domain of the cell adhesion molecule uvomorulin associates with three independent proteins structurally related in different species. EMBO J **8:**1711-7.
36. **Pike, L. J.** 2003. Lipid rafts: bringing order to chaos. J Lipid Res **44:**655-67.

37. **Pokutta, S., and W. I. Weis.** 2000. Structure of the dimerization and beta-catenin-binding region of alpha-catenin. Mol Cell **5:**533-43.
38. **Rescher, U., D. Ruhe, C. Ludwig, N. Zobiack, and V. Gerke.** 2004. Annexin 2 is a phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate binding protein recruited to actin assembly sites at cellular membranes. J Cell Sci **117:**3473-80.
39. **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:**8813-7.
40. **Schafer, B. W., and C. W. Heizmann.** 1996. The S100 family of EF-hand calcium-binding proteins: functions and pathology. Trends Biochem Sci **21:**134-40.
41. **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:**5983-6.
42. **Vila, E., and M. Salaices.** 2005. Cytokines and vascular reactivity in resistance arteries. Am J Physiol Heart Circ Physiol **288:**H1016-21.
43. **Wallez, Y., F. Cand, F. Cruzalegui, C. Wernstedt, S. Souchelnytskyi, I. Vilgrain, and P. Huber.** 2006. Src kinase phosphorylates vascular endothelial-cadherin in response to vascular endothelial growth factor: identification of tyrosine 685 as the unique target site. Oncogene. **26:** 1067-77.
44. **Wallez, Y., I. Vilgrain, and P. Huber.** 2006. Angiogenesis: The VE-Cadherin Switch. Trends Cardiovasc Med **16:**55-9.
45. **Waschke, J., F. E. Curry, R. H. Adamson, and D. Drenckhahn.** 2005. Regulation of actin dynamics is critical for endothelial barrier functions. Am J Physiol Heart Circ Physiol **288:**H1296-305.
46. **Weis, W. I., and W. J. Nelson.** 2006. Re-solving the cadherin-catenin-actin conundrum. J Biol Chem **281:**35593-7.
47. **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:**19199-208.
48. **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:**5141-51.
49. **Yamada, S., S. Pokutta, F. Drees, W. I. Weis, and W. J. Nelson.** 2005. Deconstructing the cadherin-catenin-actin complex. Cell **123:**889-901.
50. **Zhang, J., M. Betson, J. Erasmus, K. Zeikos, M. Bailly, L. P. Cramer, and V. M. Braga.** 2005. Actin at cell-cell junctions is composed of two dynamic and functional populations. J Cell Sci **118:**5549-62.

Table and figure legends

Table 1: **Examples of proteins identified in cholesterol rafts**

(Cholesterol raft-associated proteins, isolated as previously described in Materials and Methods, were separated by electrophoresis prior to be in-gel digested by trypsin. Identification of the trypsin peptides was achieved by MS/MS mass spectrometry.)

a: Only proteins relevant for this particular study are listed. Complete results are available on request to the corresponding author

Fig 1: Cell density-dependent accumulation of A2 at cell-cell junctions

(A): Redistribution of A2 to membranes in confluent HUVECs. Subcellular fractionation of subconfluent (lanes 1 and 2) and confluent (lanes 3 and 4) HUVECs was performed as described in Materials and Methods. Proteins isolated from cytoplasm (lanes 1 and 3) and membrane (lanes 2 and 4) fractions were analyzed on 10% Tris-Glycine gels prior to immunoblotting for VE-cad, and A2. Molecular weight markers (kDa) are given at the left margin of each blot.

(B): Subcellular distribution of A2, VE-cad and actin. HUVECs were plated on glass coverslips at two different densities and cultured for three days. Density of confluent cells (Confluent) was 8 times higher than that of subconfluent cells (Subconfluent). Cells were then stained with mAb anti-A2, pAb anti-Cad3, Cy5-labelled goat-anti-mouse and Cy3-labelled goat-anti-rabbit antibodies, FITC-labelled phalloidin, and DAPI. Right panels are magnified images of the areas boxed in left panels (Magn.). Bar: 20 µm.

(C): Confocal analysis of A2 and VE-cad in confluent HUVECS. Cells were plated on glass coverslips, cultured for three days, and then stained with mAb anti-A2, pAb anti-Cad3, Alexa 488-labelled goat-anti-mouse and Cy5-labelled goat-anti-rabbit antibodies. Co-localization was determined with the "CF2D" software from Leica. Images correspond to an optical section (≈650nm). The diagram (Co-localization) represents the relative intensity of the pixels in the red and the green images. Dots gated in the region of interest (yellow), corresponding to the co-localization, are represented in white in the images. Bar: 20 µm.

Fig 2: Association of annexin 2 to the VE-cad-based complex

(A): Anti-A2 IPs (IP A2), performed on confluent HUVEC, were resolved on 10% Tris-Glycine gels, electro-transferred and probed for VE-cad, N-cadherin (N-cad), PECAM-1, p120, α-, β-, γ-catenins (α-, β-, γ-cat) and actin and on 15% Tris-Tricine gels and probed for A2 and p11. For comparison, aliquots of whole cell lysates (Lys) were analyzed in parallel.

(B): Anti-VE-cad IPs were performed on subconfluent (-) and confluent (+) HUVEC and resolved on 4-12% gradient precast Criterion™ XT gels. As negative controls, whole cell lysate (Lys) and IPs performed on confluent HUVEC lysate using rabbit non-immune IgG (NI) were analyzed in parallel. Parallel blots were probed for VE-cad and A2. Molecular weight markers (kDa) are given at the left margin of each panel.

Fig 3: Specificity of the association between the VE-cad-based complex and the endothelial annexins

Anti-VE-cad **(A),** anti-A1 **(B)** and anti-A5 **(C)** IPs were performed on confluent HUVEC and were resolved on 12% Tris-Glycine gels. Anti-VE-cad IPs were immunoblotted for VE-cad and annexins 1, 2 and 5. Anti-A1 and anti-A5 IPs were probed for VE-cad and either A1 or A5 respectively. For comparison, aliquots of whole cell lysates (Lys) were analyzed in parallel. Molecular weight markers (kDa) are given at the left margin of each blot.

Fig 4: No requirement of actin filaments in the connection between A2 and the VE-cad-based complex

(A): Confluent HUVECs were treated or not with La B for 5 min. Membrane (M) and cytoplasm (C) fractions were separated from La B- treated (+) or untreated (-) cells. Proteins isolated from M and C fractions were analyzed on 10% Tris-Glycine gels and immunoblotted for VE-cad, actin, and A2. Molecular weight markers (kDa) are given at the left margin of the blot. The amounts of A2 and actin associated to membrane were quantified after scanning of immunoreactive bands (n=3 ± standard error). The histograms represent the mean percentages of A2 (grey bar) and actin (black bar) in treated compared to untreated cells (100%, white bars).

(B): Confocal microscopy analysis of VE-cad, A2 and actin in HUVEC before (Control) and after La B treatment. Cells plated on glass coverslips were stained with pAb Anti-Cad3, mAb anti-A2, Cy2-labelled goat-anti-rabbit antibodies, Cy5-labelled goat-anti-mouse, TRITC-labelled phalloidin and DAPI. Images correspond to a ≈ 650nm confocal optical section. The efficiency of La B treatment was verified by phase contrast (PC). In the merging panels, arrow heads point out areas where VE-cad and A2 perfectly co-localize. Bar: 20 µm.

(C): Anti-VE-cad and anti-A2 IPs were performed on lysates extracted from confluent La B-treated (+) or untreated (-) HUVECs. Anti-VE-cad and anti-A2 IPs were separated on 4-12% gradient precast Criterion XT and 10% Tris-Glycine gels respectively and immunoblotted for VE-cad and A2. Molecular weight markers (kDa) are given at the left margin of the blot.

Fig 5: Delocalization of VE-cad from adherens junctions induced by siRNA-mediated A2 down-regulation

(A): siRNA were used to knock-down A2 level in HUVECs. Western-blot analysis was performed to determine VE-cad, actin, A1, A2 and A5 levels in HUVECs transfected with control siRNA (lane 1) or A2 siRNA (lane 2). Lysates were resolved on 10% Tris-Glycine gels and probed for VE-cad, actin, A1, A2, and A5. Molecular weight markers (kDa) are given at the left margin of the blot.

(B): One day after the second siRNA transfection, HUVECs were plated on glass coverslips, cultured for 24h (upper panel, 4 days after transfection) or 48h (lower panel, 5 days after transfection) prior fixation. Cells were then labelled with mAb anti-A2, pAb anti-Cad3, Cy3-labelled goat-anti-mouse and Cy2-labelled goat-anti-rabbit antibodies, and DAPI. Empty arrow heads indicate adherens junctions where A2 and VE-cad co-localized and full arrow heads areas where adherens junctions are missing. Bar: 20 µm.

Fig 6: Disruption of adherens junctions induced by MβCD treatment

(A): Confluent HUVECs were treated with MβCD (+) for 30 min or untreated (-). Membrane (M) and cytoplasm (C) fractions were separated from MβCD-treated (+) or untreated (-) cells. Proteins isolated from M and C fractions were analyzed on 10% Tris-Glycine gels and probed for VE-cad, actin, and A2. Molecular weight markers (kDa) are given at the left margin of the blot.

(B): Quantification of the membrane-associated-A2 and -actin after scanning of immunoreactive bands in **(A)** (n=3 ± standard error). The histograms represent the percentages of A2 (grey bar) and actin (black bar) in treated compared to untreated cells (100%, white bars).

(C): HUVECs plated on glass coverslips were treated with MβCD for 30 min or not (Control). VE-cad, A2 and nuclei were labelled as previously described in **Fig 5 B**. Asterisks indicate gaps in the cell monolayers. Bar: 20 µm.

Fig 7: Decoupling of A2 from the VE-cad-complex induced by MβCD treatment

(A): Confluent HUVECs were treated with MβCD for 30 min (lanes 3 and 4) or not (lanes 1 and 2) and then submitted (lanes 2 and 4) or not (lanes 1 and 3) to trypsin digestion for 2 min prior lysis. Cell lysates were separated on 4-12% gradient precast Criterion™ XT gels and immunoblotted for VE-cad, β-catenin (β-cat), and A2. Molecular weight markers (kDa) are given at the left margin of the blot.

(B): Anti-VE-cad and anti-A2 immunoprecipitations were performed on confluent HUVECs treated for 30 min with MβCD (+) or untreated (-). Immunoprecipitates were separated on 10%

Tris-Glycine gels and probed for VE-cad, α-, β-, γ-catenins (α-, β-, γ-cat), actin and A2. Molecular weight markers (kDa) are given at the left margin of the blot.

(C): HUVECs were plated on glass coverslips, treated with MβCD for 30 min (MβCD) or untreated (Control), and stained for pAb anti-Cad 3, mAb anti-A2, Cy2-labelled goat-anti-rabbit and Cy3-labelled goat-anti-mouse antibodies, FITC-labelled phalloidin, and DAPI. Right panels are magnified images of the areas boxed in left panels (Magn.). Bar: 20 µm.

Fig 8: Identification of the proteins associated with cholesterol rafts

Subcellular fractionations performed on confluent HUVECs allowed the isolation of proteins contained in the cytoplasm (lane 1), in the total membranes (lane 2), in the digitonin-extracted cholesterol rafts (lane 4) and in the digitonin-insoluble membranes (lane 3). Proteins of each fraction were separated on 4-12% gradient precast Criterion XT gels and probed for A2, VE-cad, α-, γ-, β-catenins (α-, β-, γ-cat), p120, moesin, α-actinin, actin, SHP2 and PECAM-1. Samples of each fraction were also resolved on 15% Tris-Tricine gels and probed for p11. Anti-A2 immunoprecipitations were performed on the digitonin-extracted cholesterol raft fraction (lane5). After separation on 4-12% gradient precast Criterion XT gels, immunoprecipitates were probed for A2, VE-cad, α-, γ-, β-catenins (α-, β-, γ-cat), p120, moesin, α-actinin, actin, SHP2, and PECAM-1. Immunoprecipitations were also resolved on 15% Tris-Tricine gels and probed for p11. Proteins unambiguously identified were labelled with arrows. Molecular weight markers (kDa) are given at the left margin of the blots.

Fig 9: VEGF- induced delocalization of A2 and VE-cad from adherens junctions

(A): HUVECs plated on glass coverslips were treated with VEGF or not treated (Control). VE-cad, A2 and nuclei were labelled as previously described in **Fig 4 B**. Empty arrows pointed out adherens junctions where A2 and VE-cad co-localized and full arrows missing or perturbed junctions. Bar: 20 µm.

(**B**): Anti-VE-cad IPs were performed on confluent HUVECs treated for 30 min with VEGF (+) or untreated (-). Immunoprecipitates were separated on 10% Tris-Glycine gels and probed for VE-cad, β- catenins (β-cat), actin and A2. Molecular weight markers (kDa) are given at the left margin of the blot. For comparison, aliquots of whole cell lysates (Lys) were analyzed in parallel.

Fig 10: Potential mechanism of stabilization of VE-cad-mediated adherens junctions

In subconfluent HUVECs, adherens junctions are immature and poorly associated with the actin cytoskeleton. The VE-cad-based complex is free to move laterally in the plasma membrane.

Once HUVECs reach confluence and adherens junctions become mature, the A2/p11 complex, which accumulates underneath the plasma membrane at cholesterol raft sites (CR), associates with the VE-cad-based complex. Consequently, the complex is docked to cholesterol rafts. Thus, by providing a link between the VE-cad/catenin complex and the actin cytoskeleton, the cholesterol raft-embedded A2 stabilizes the adherens junctions, thereby allowing the development of stable intercellular connections.

Supplementary data

Fig S1: Co-localization of A2 and VE-cad in confluent HUVECS

Cells were plated on glass coverslips, cultured for three days, and then stained with mAb anti-A2, pAb anti-Cad3, Alexa 488-labelled goat-anti-mouse and Cy5-labelled goat-anti-rabbit antibodies. Nuclei were conterstained with DAPI (blue). Images correspond to a ≈650nm confocal optical section. Bar: 20 µm.

1 **Table 1**:

2

Description[a]	Accession	pI	Score	Mass	Coverage	# peptides
Cytoplasmic proteins						
actin, alpha	gi|178027	5,24	328,07	42081	22,28	6
actin, beta	gi|4501885	5,29	757,83	41710	37,33	10
actinin, alpha 1	gi|4501891	5,25	423,84	102993	9,19	6
actinin, alpha 4	gi|2804273	5,27	621,67	102204	13,01	8
actin-related protein 3	gi|27806335	5,61	32,64	47341	1,91	1
AHNAK nucleoprotein isoform 1	gi|61743954	5,80	180,05	628699	1,04	4
annexin 1	gi|442631	7,77	311,53	35018	24,52	5
annexin 2, isoform 2	gi|12655075	7,57	274,61	38580	22,12	5
annexin 5	gi|809190	4,94	104,72	35783	8,46	2
annexin 6, isoform 2	gi|71773415	5,46	81,98	75229	4,35	2
catenin, alpha	gi|1092190	6,06	47,65	100018	1,32	1
catenin, beta 1	gi|4503131	5,53	258,73	85442	9,48	4
moesin	gi|4505257	6,08	717,50	67778	26,34	11
tubulin, alpha	gi|340021	4,94	318,10	50120	12,86	4
tubulin, class I beta	gi|4580988	4,78	327,73	49639	17,57	6
vinculin isoform VCL	gi|4507877	5,83	544,83	116649	10,60	10
Membrane proteins						
PECAM-1	gi|129747	6,55	91,59	82484	3,25	2
integrin beta 1 (isoform 1B)	gi|19743815	5,35	62,12	87389	2,15	1
Raft markers						
clathrin heavy chain 1	gi|4758012	5,48	191,18	191493	2,87	4
caveolin 1	gi|4972627	5,85	46,24	13066	8,85	1

3

4

Figure 1

Heyraud

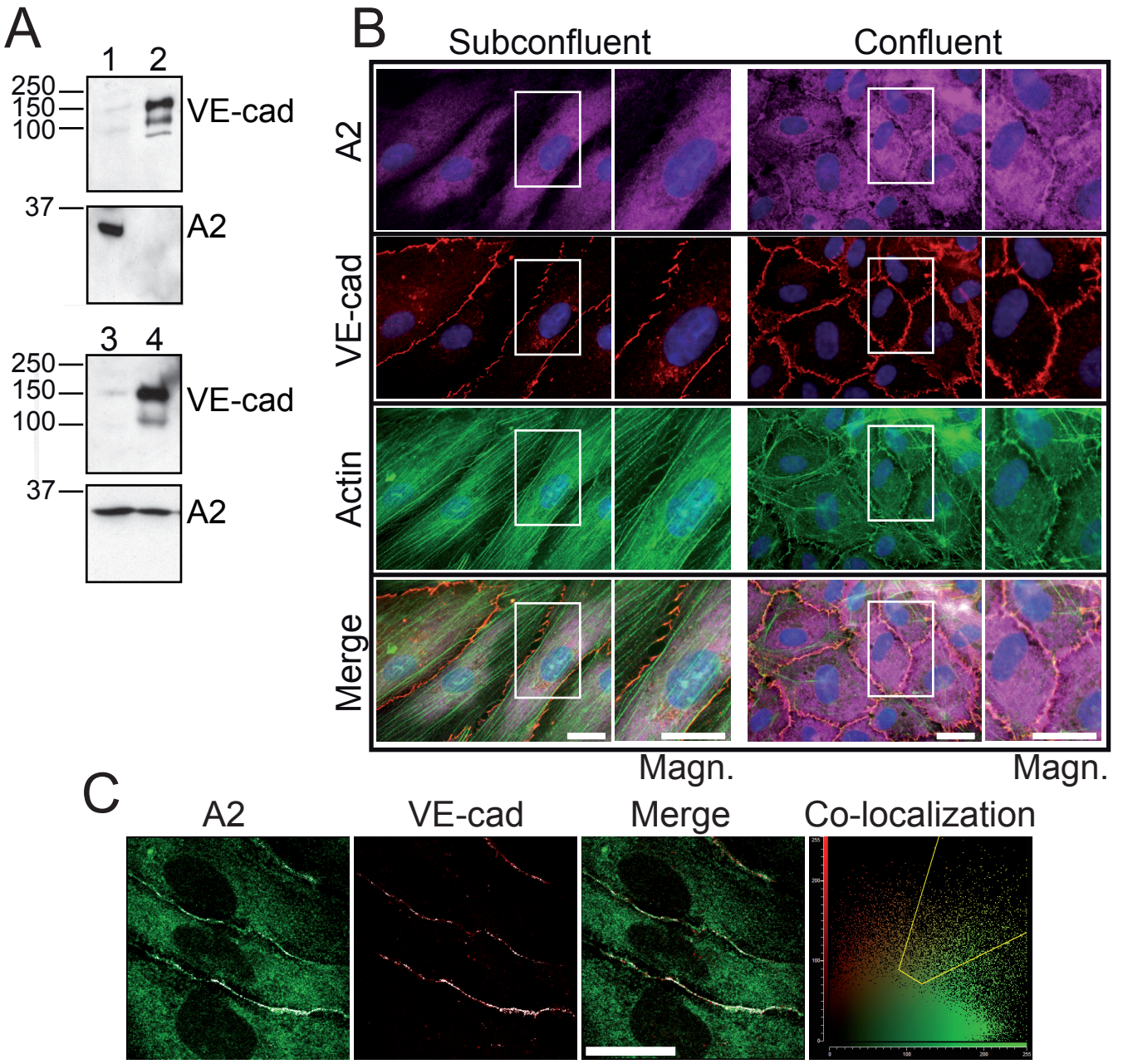


Figure 2

Heyraud

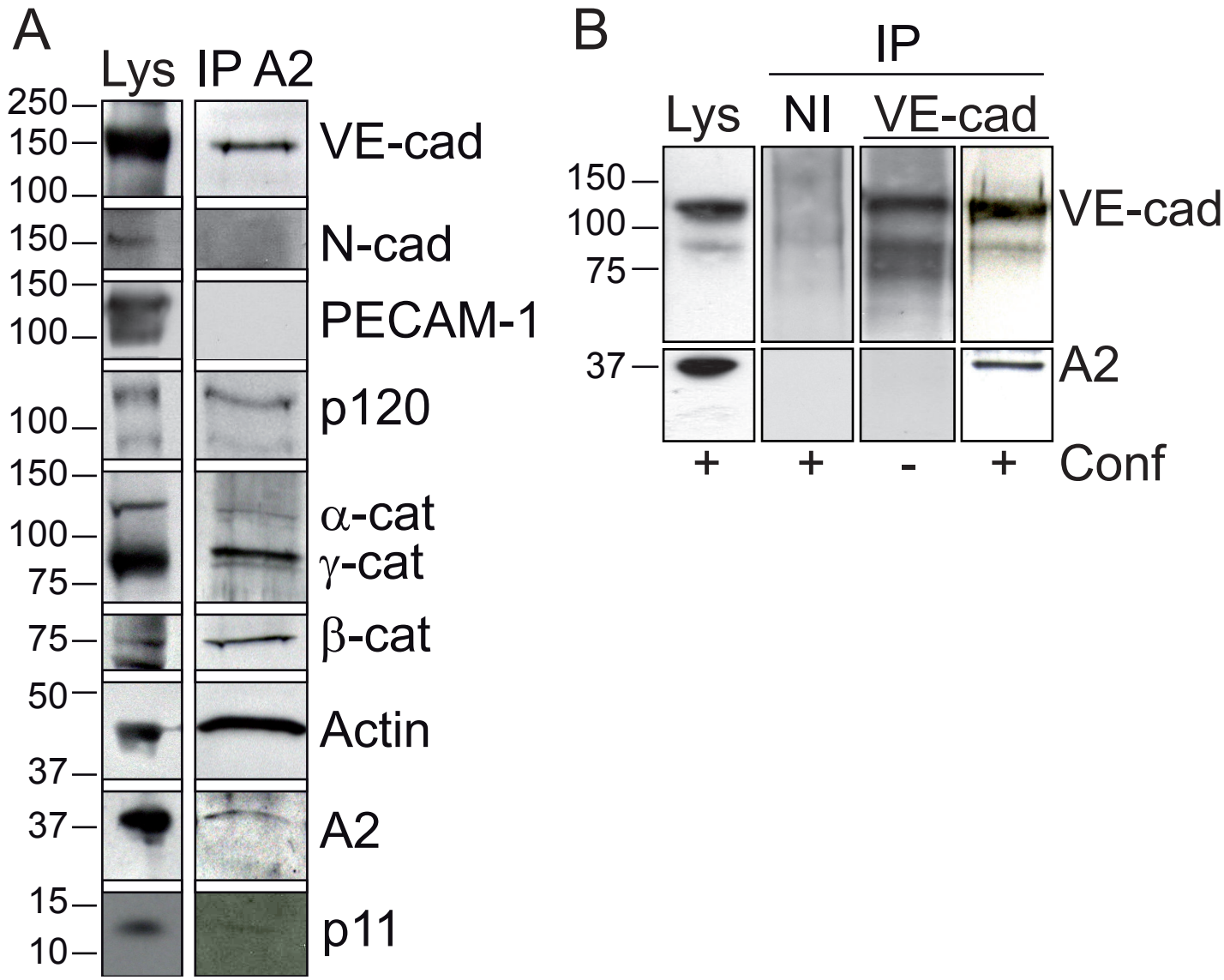


Figure 3

Heyraud

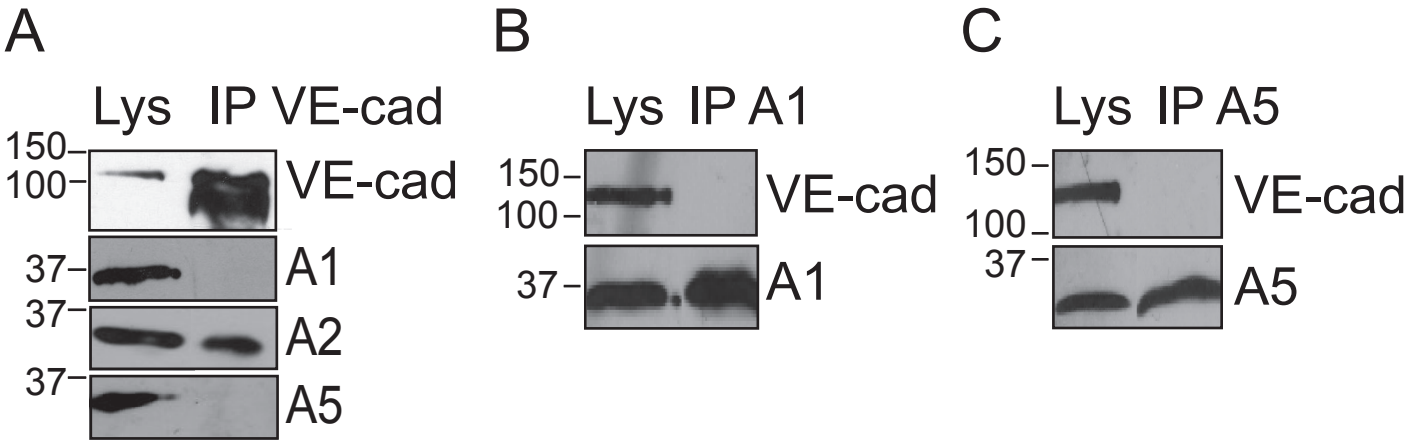
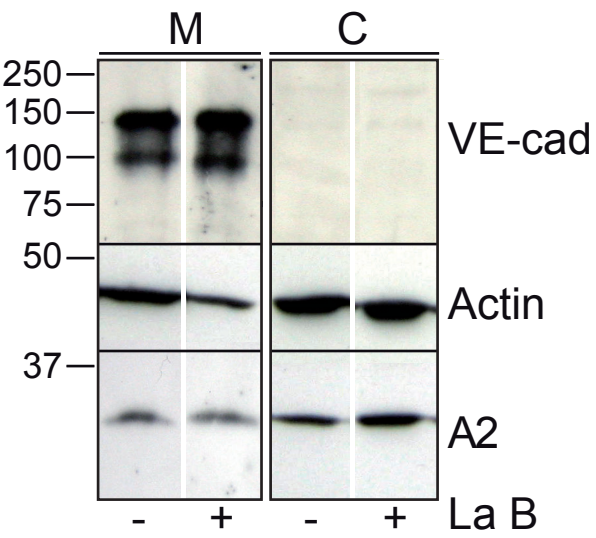
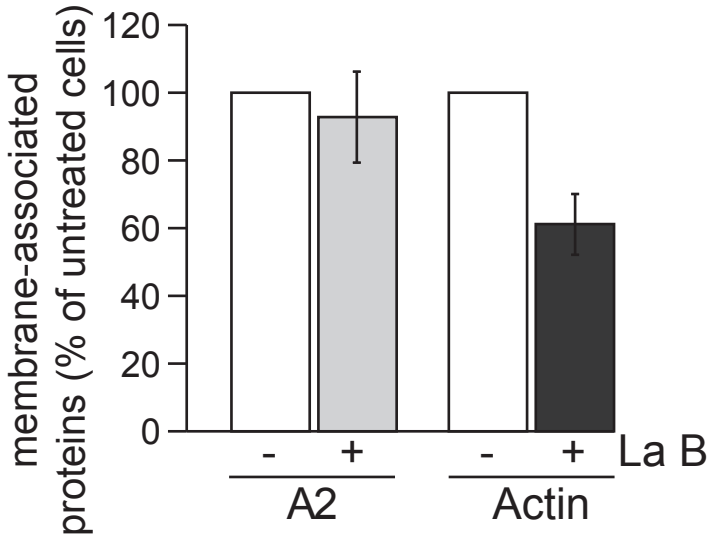


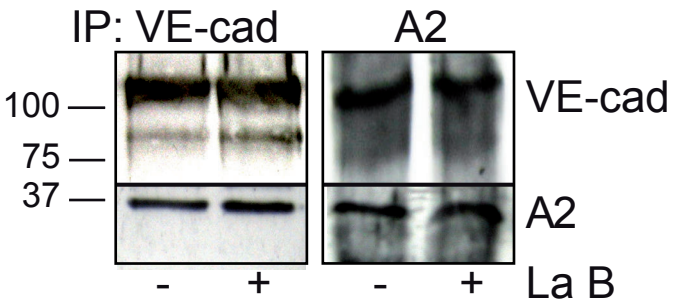
Figure 4 Heyraud

A





C



B

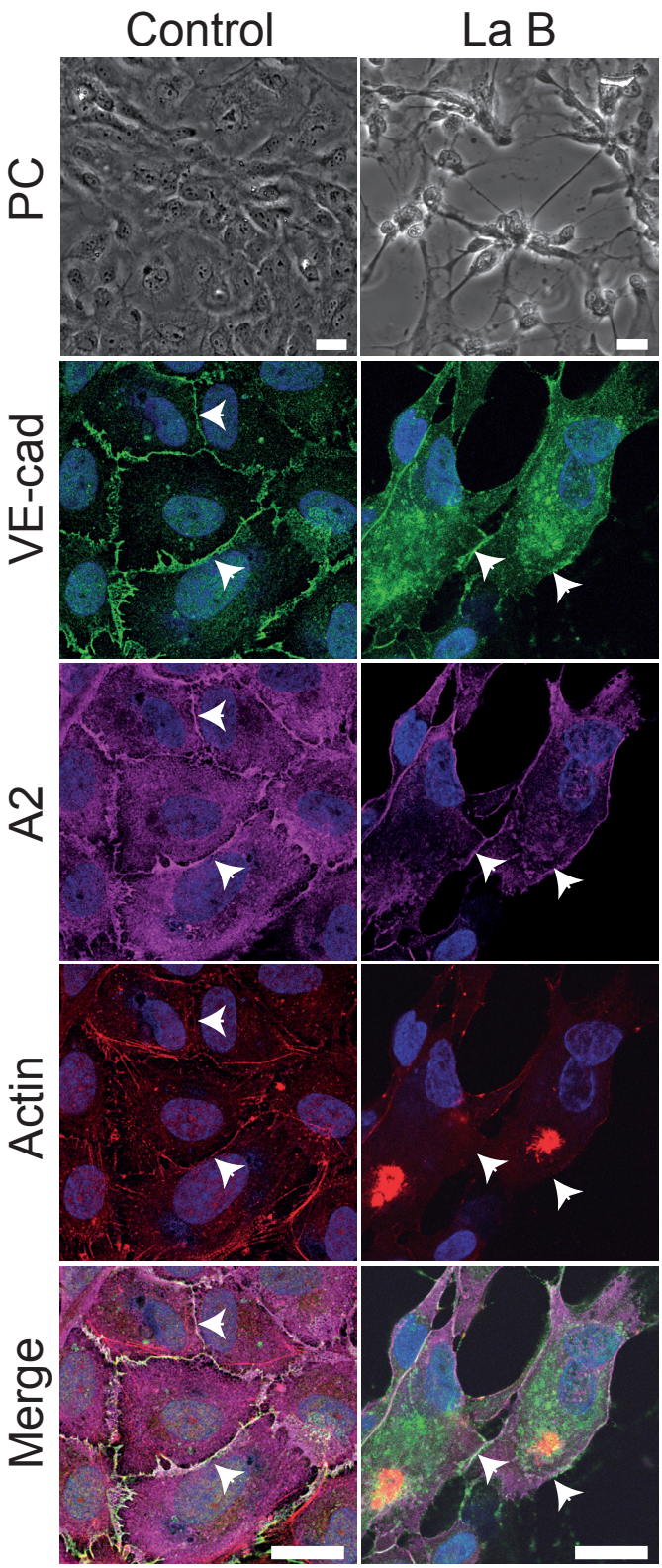


Figure 5

Heyraud

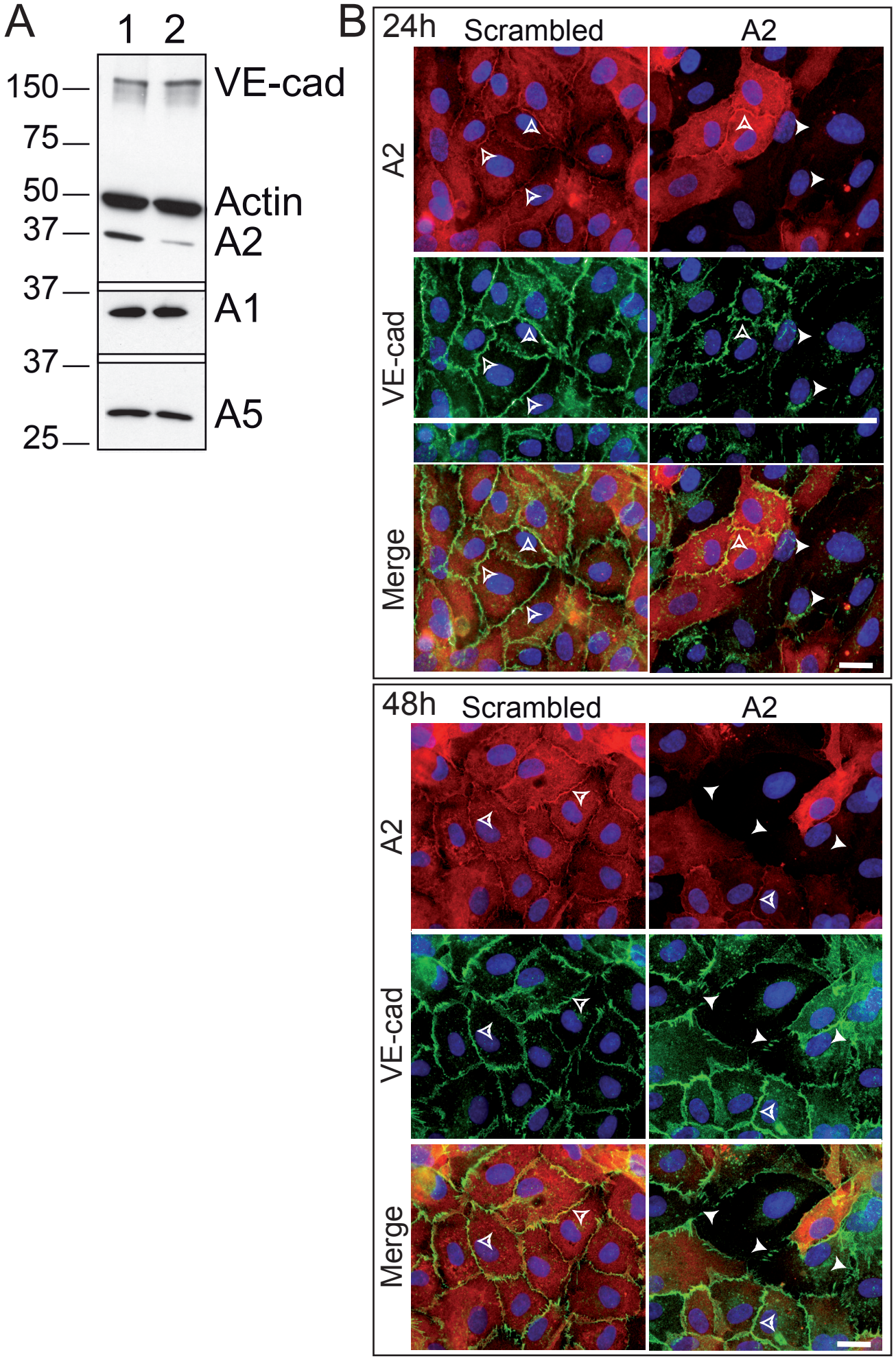


Figure 6

Heyraud

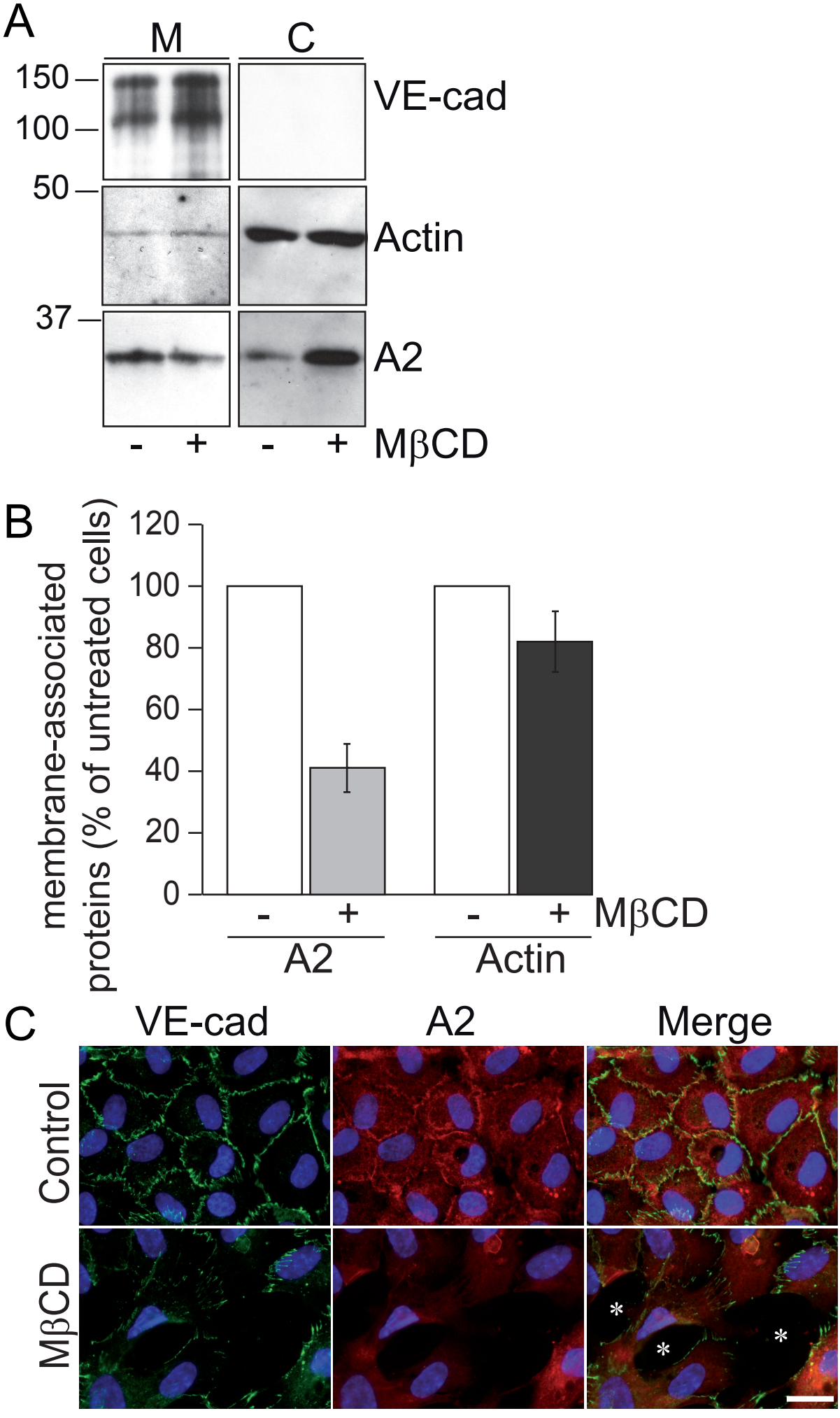


Figure 7

Heyraud

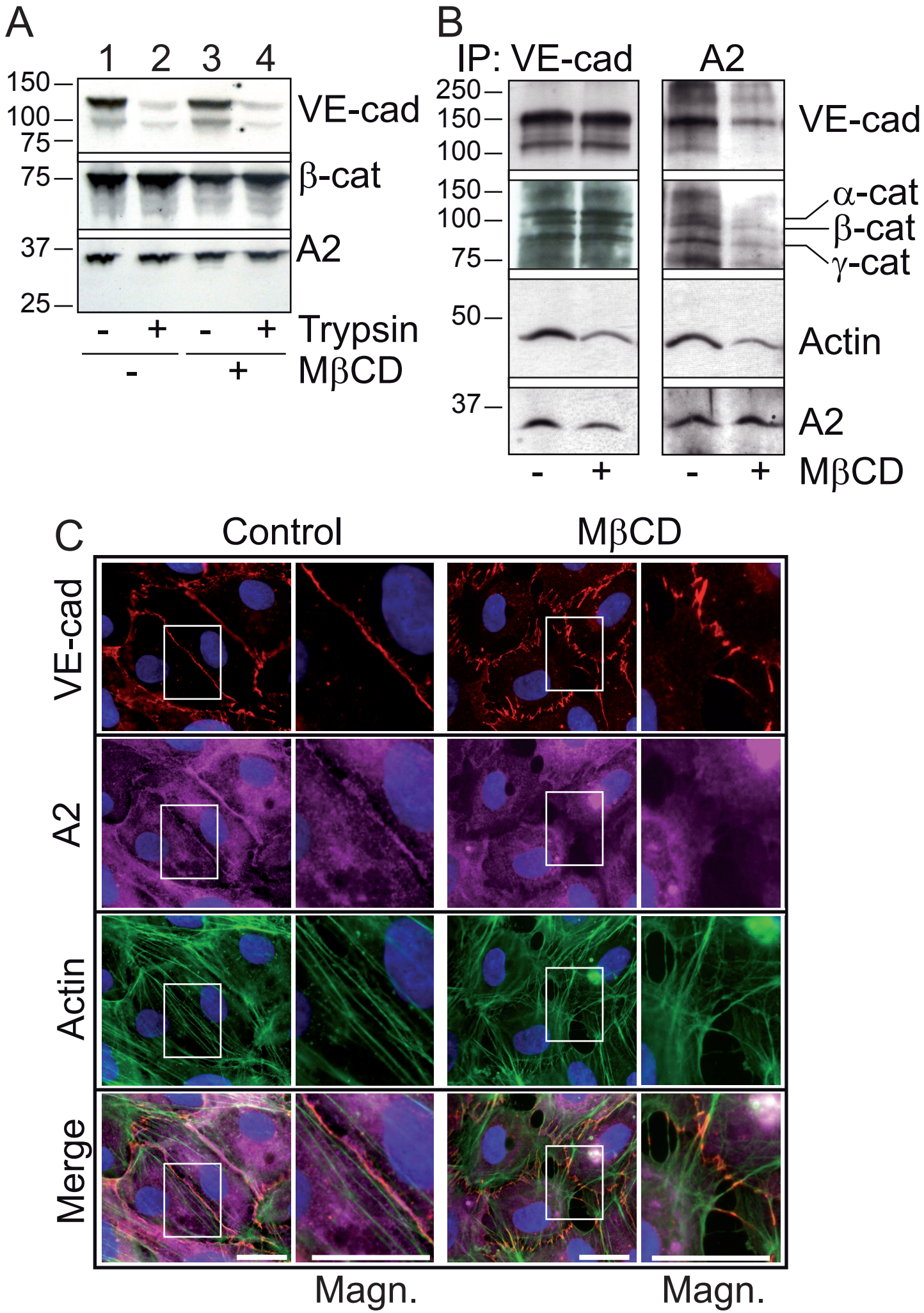


Figure 8

Heyraud

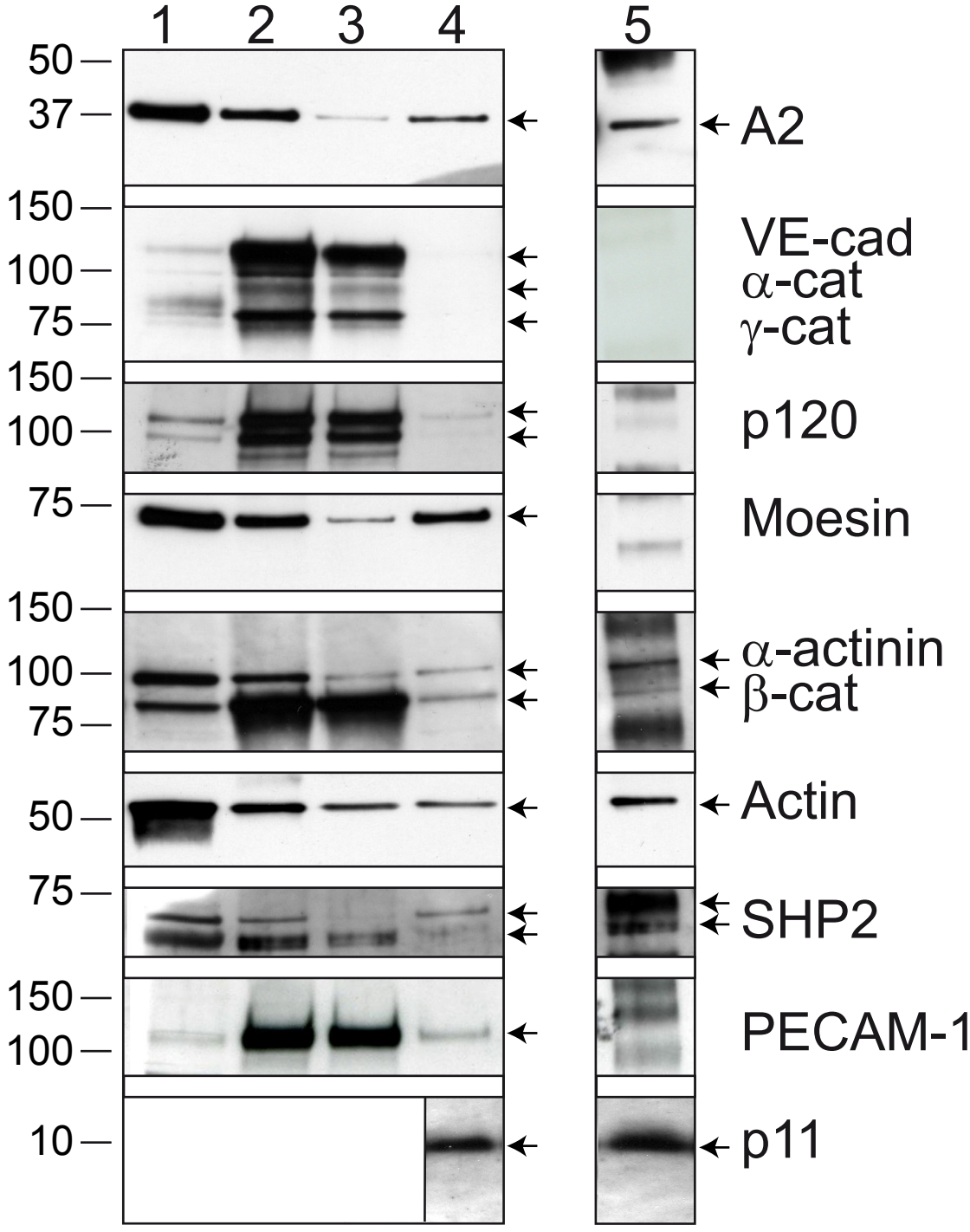


Figure 9

Heyraud

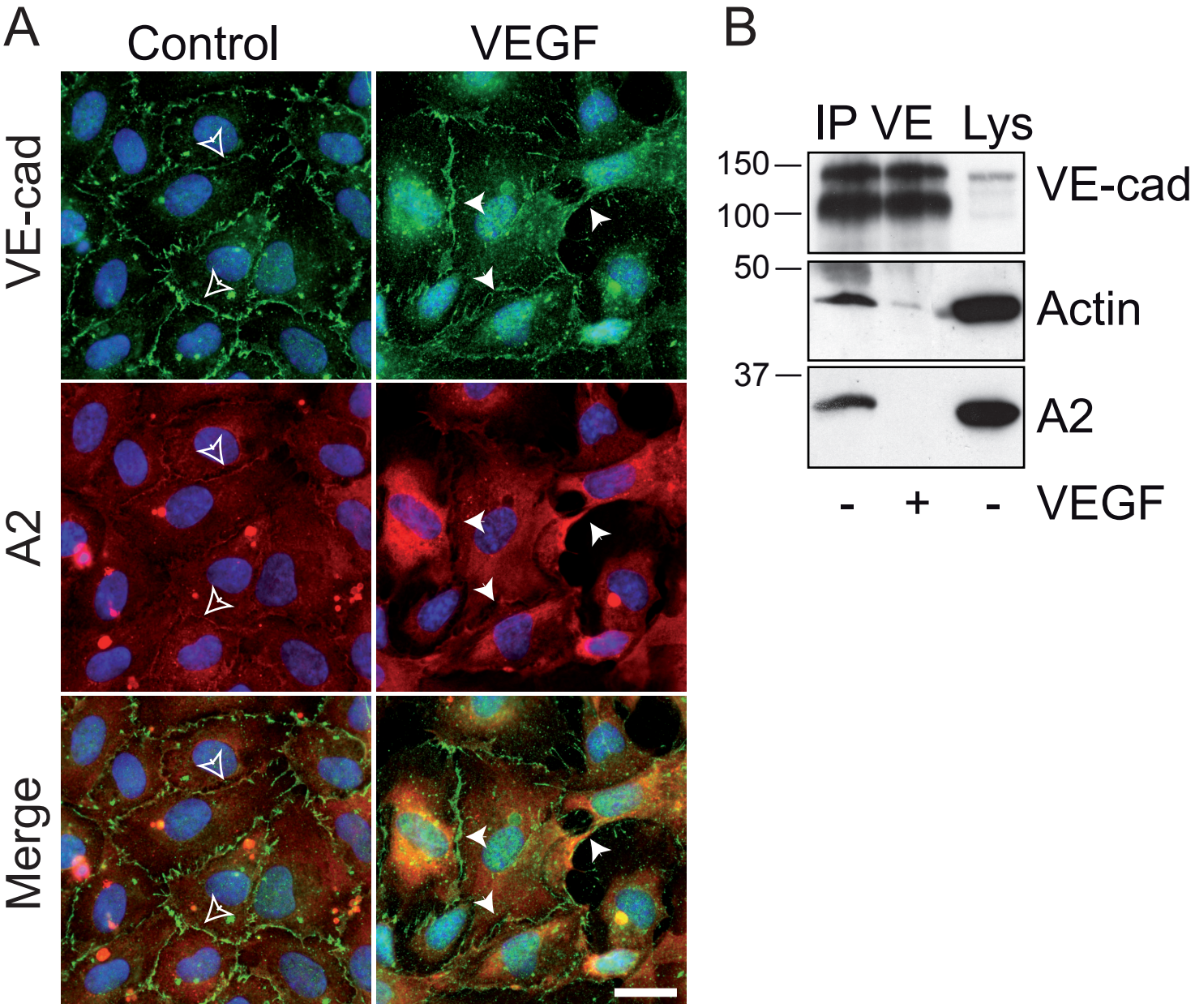
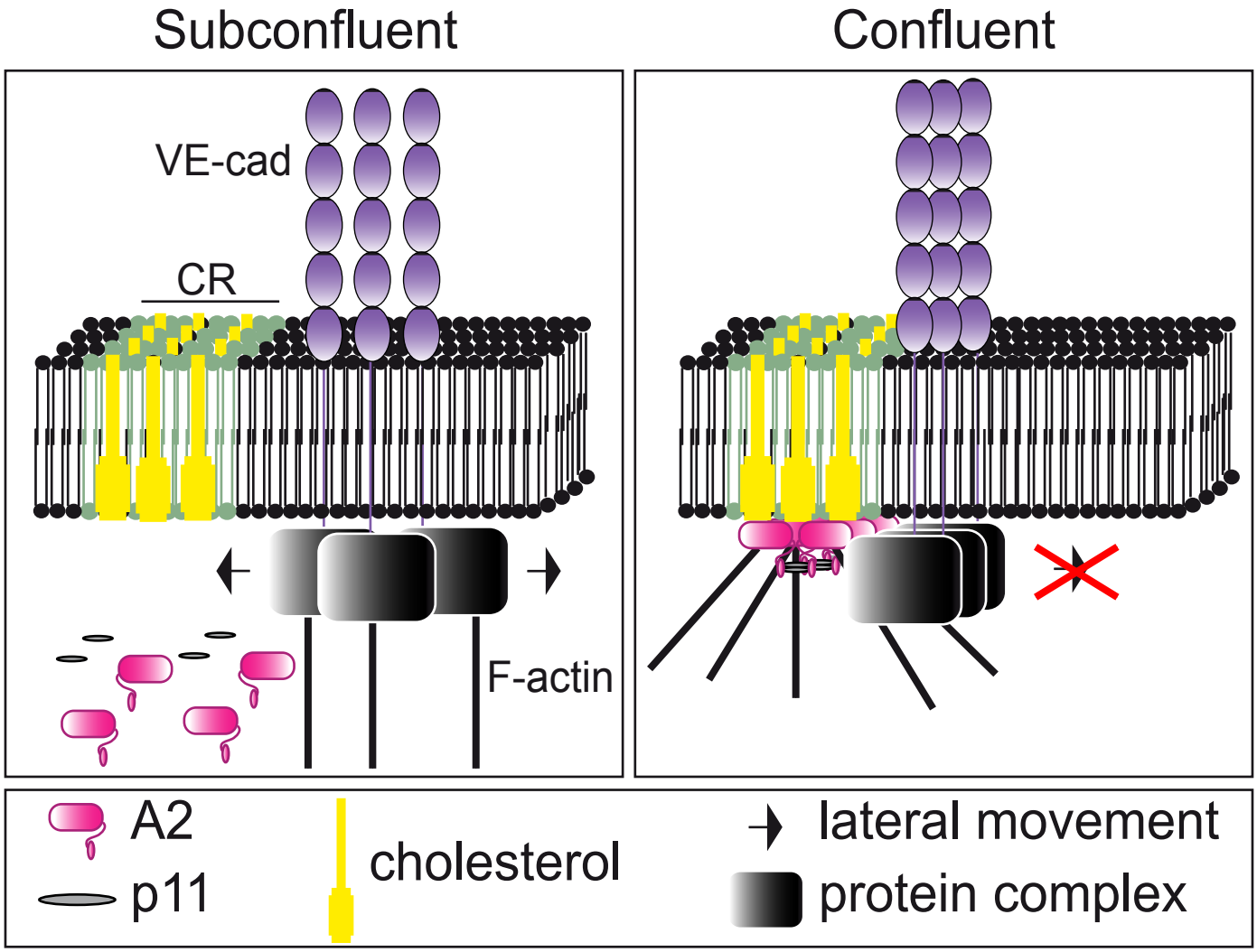


Figure 10

Heyraud



2.1.3 Discussion et perspectives : Implication de l'annexine 2 dans la stabilisation des jonctions adhérentes

Nos résultats ont pour la première fois montré l'existence d'une interaction entre l'annexine 2 et le complexe jonctionnel à base de VE-cadhérine dans un modèle de cellules endothéliales. Jusqu'à aujourd'hui, l'implication de l'annexine 2 dans la fonction et l'architecture des jonctions adhérentes n'avait été que suggérée par différents travaux mais jamais formellement démontrée.

Dans les zones de contacts entre les cellules endothéliales, l'annexine 2, qui s'accumule au niveau des radeaux de cholestérol, jouerait un rôle dans la stabilisation des jonctions adhérentes en s'associant avec la tyrosine phosphatase SHP2 **(Burkart et al., 2003; Corvera et al., 2000)**. Si les radeaux de cholestérol sont détruits, les contacts intercellulaires sont déstabilisés et des composants des jonctions adhérentes, tels la γ-caténine et p120, sont phosphorylés, ce qui suggère une dissociation du complexe jonctionnel **(Burkart et al., 2003; Lambert et al., 1997)**. D'autre part, Yamada et coll. ont également émis l'hypothèse que l'annexine 2 serait impliquée dans la formation des jonctions adhérentes épithéliales dans les cellules MDCK **(Yamada et al., 2006; Yamada et al., 2005a)**.

Ces résultats corroborent nos propres travaux qui suggèrent que la présence de l'annexine 2 stabilise la VE-cadhérine au niveau des jonctions endothéliales. En effet, les cellules endothéliales sub-confluentes présentent des jonctions lâches et perméables. Au fur et à mesure que s'établit la confluence, les jonctions se renforcent et adoptent une structure plus stable. Cette stabilisation pourrait provenir de la connexion du complexe à base de VE-cadhérine par l'annexine 2 d'une part aux radeaux de cholestérol, ce qui limite la diffusion latérale du complexe jonctionnel, et d'autre part au cytosquelette d'actine (**article 2, figure 9**). L'annexine 2 pourrait donc constituer l'un des chaînons manquants permettant d'établir la connexion des complexes cadhérine/β-caténine/α-caténine au réseau d'actine (**figure 26**).

Nos résultats indiquent que la connexion entre l'annexine 2 et la VE-cadhérine est indirecte. Nous envisageons qu'un « mini-complexe » incluant la β-caténine et la phosphatase SHP2 fasse le lien entre le complexe jonctionnel et l'annexine 2 (**figure 20**). Il conviendra par la suite de rechercher les partenaires directs de l'annexine 2 au sein du complexe par des techniques d'étude des interactions protéiques (blots overlay, GST-pull down).

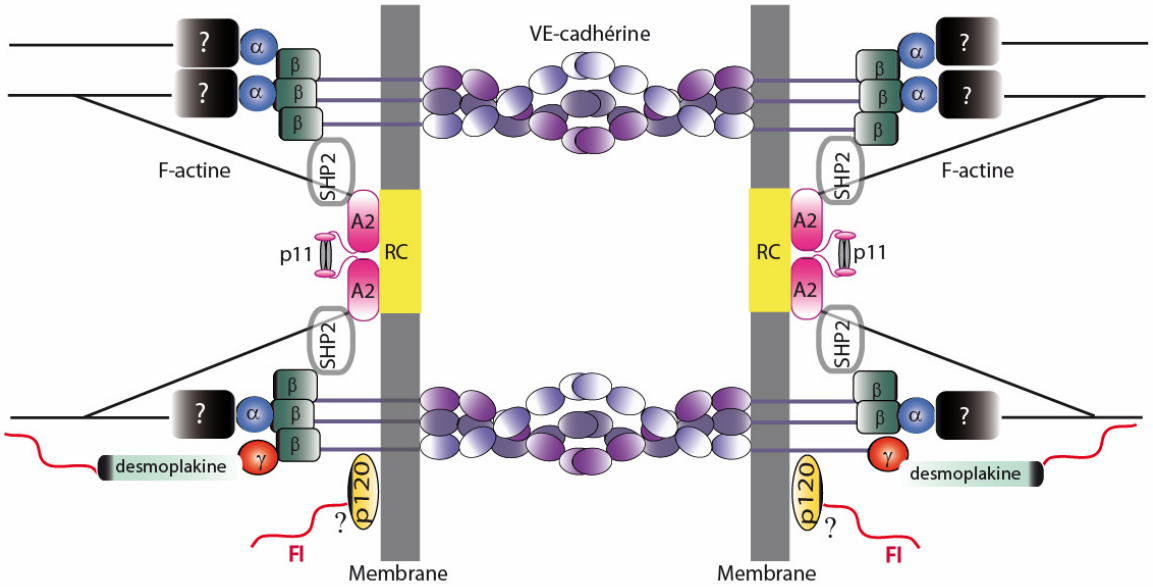


Figure 26 : Schéma hypothétique de l'organisation des complexes protéiques formant les jonctions adhérentes endothéliales.
Les molécules de VE-cadhérine s'assemblent en trimère à la surface cellulaire, et entrent en interaction avec un trimère porté par la cellule adjacente pour former une structure hexamérique. Par son extrémité intracellulaire, la VE-cadhérine s'associe à la β-caténine (β), qui à son tour, recrute l'α-caténine (α). Cette caténine soit directement, soit par l'intermédiaire d'une ou plusieurs autres protéines, établit une connexion avec le cytosquelette d'actine. Par ailleurs, le complexe jonctionnel est connecté aux filaments d'actine grâce à l'annexine 2 (A2) au sein de l'hétérotétramère qu'elle constitue avec p11, localisé au niveau des radeaux de cholestérol membranaires (RC). Cette protéine pourrait être indirectement associée à la VE-cadhérine par l'intermédiaire de la phosphatase SHP2 et de la β-caténine. Ce faisant, l'annexine 2 arrimerait le complexe jonctionnel aux radeaux de cholestérol, limitant sa mobilité latérale et stabilisant la jonction.
Lorsque la VE-cadhérine s'associe à la γ-caténine, celle-ci, en interagissant avec la desmoplakine, connecte le complexe jonctionnel aux filaments intermédiaires (FI).
p120, l'autre caténine associée à la VE-cadhérine, pourrait, directement ou non, offrir au complexe jonctionnel une autre connexion aux filaments intermédiaires.

De plus, en l'absence d'annexine 2, quel est le devenir de l'association du complexe au cytosquelette d'actine ? Nous avons montré que la connexion entre le complexe jonctionnel et l'annexine 2 est directe et ne nécessite pas de filaments d'actine. Nous suggérons que l'une des associations du complexe jonctionnel au cytosquelette d'actine se ferait par l'intermédiaire du domaine de liaison à l'actine (Actin Binding Domain, ABD) de l'annexine 2, situé sur son extrémité C-terminale. La question qui se pose alors est de déterminer si la présence de ce domaine est nécessaire à la localisation de l'annexine 2 aux jonctions. Pour répondre à cette interrogation, nous disposons de deux vecteurs permettant d'exprimer, en fusion avec la GFP, l'annexine 2 sauvage (A2-GFP, don de Moss S.E.) et une annexine 2 dépourvue de la zone d'interaction avec l'actine (A2ΔABD-GFP). La construction

A2-GFP devrait permettre de réaliser un sauvetage du phénotype induit par le siRNA bloquant l'expression de l'annexine 2. La construction A2ΔABD-GFP, quant à elle, pourrait permettre de déterminer l'importance du domaine de liaison à l'actine de l'annexine 2 dans la stabilisation des jonctions intercellulaires.

Nous avons montré qu'un traitement du tapis cellulaire par le VEGF induit une délocalisation de l'annexine 2, de la membrane au cytosol. Il est possible que cette cytokine, connue pour accroître la perméabilité vasculaire, induisent un détachement de l'annexine 2 du complexe jonctionnel, le rendant plus mobile dans la membrane **(Esser et al., 1998)**. Cette rupture des interactions aurait pour conséquence de rendre les jonctions plus lâches et plus déstructurées. A terme, il serait bon de déterminer par quels mécanismes est induite cette dissociation et comment elle est régulée. Les outils de vidéo-microscopie et la technique de recouvrement de fluorescence après photoblanchiment (FRAP) en cours d'installation au laboratoire, judicieusement utilisés, pourraient permettre de confirmer qu'il existe une mobilité latérale de la VE-cadhérine à la membrane quand elle n'est pas associée à l'annexine 2.

2.1 La moésine

Notre analyse protéomique nous a permis d'identifier également la moésine comme un nouveau partenaire intéressant de la VE-cadhérine et nous en avons tout juste initié l'étude. Cette protéine appartient à la famille des protéines ezrine, radixine, moésine (ou ERM).

2.2.1 Les protéines ERM

Les protéines ERM sont capables de lier l'actine à la membrane plasmique par des processus finement régulés **(Fievet et al., 2007; Ivetic and Ridley, 2004)**. Elles se sont révélées essentielles au développement embryonnaire et à l'intégrité épithéliale.

La moésine est une protéine d'environ 75 kDa composée des trois domaines distincts communs à chaque protéine de la famille ERM. Elle comporte un domaine N-terminal FERM (band Four point one ERM) très conservé qui permet la liaison à la membrane plasmique, un domaine central en hélice α présumé capable de favoriser les interactions protéiques, et un domaine C-terminal de liaison à l'actine, ABD (F-Actin Binding Domain) qui comporte des résidus thréonyles phosphorylables (**figure 27**). La moésine, sous sa forme inactive non phosporylée, se localise dans le cytoplasme, alors qu'on la retrouve associée à la membrane lorsqu'elle est phosphorylée et active. Cette activation met en jeu la phosphorylation d'au

moins un résidu thréonyle, le résidu T558, et aboutit à une modification conformationnelle **(Ivetic and Ridley, 2004; Nakamura et al., 1995)**. D'ailleurs, la mutation en aspartate du résidu T558 (T558D) rend la protéine constitutivement active **(Nakamura et al., 1995)**. La moésine est la cible de nombreuses kinases, dont la protéine kinase C ou la Rho-kinase et la protéine ERM majoritairement exprimée dans les cellules endothéliales **(Amieva and Furthmayr, 1995)**.

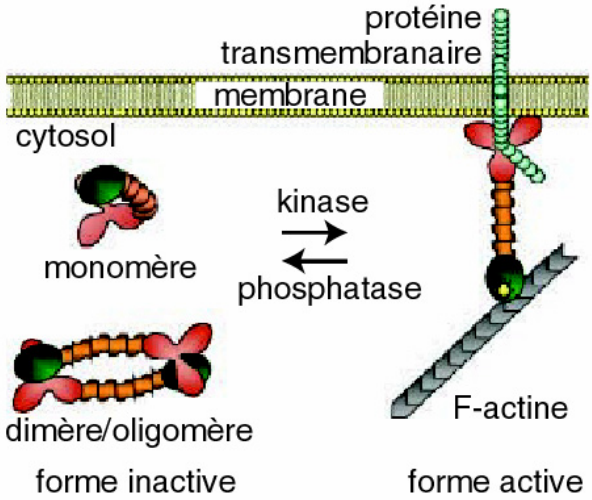


Figure 27 : Représentation schématique de la régulation de la moésine. D'après **(Ivetic and Ridley, 2004; Nakamura et al., 1995)**.
Lorsque le (ou les) résidu(s) thréonine(s) 558 et/ou 567 est (sont) phosphorylé(s), la moésine est dans une conformation linéaire active. La déphosphorylation de ces sites inactive la protéine qui se replie sur elle-même ou forme des homodimères tête-bêche.

Les ERM ont été identifiées et localisées aux jonctions adhérentes des cellules épithéliales **(Niggli and Rossy, 2007)**. Ces protéines sont également impliquées dans la signalisation car elles sont capables de moduler l'organisation des radeaux de cholestérol, au même titre que l'annexine 2 mais certainement par d'autres mécanismes. Pujuguet et coll ont établi l'existence d'une connexion entre la E-cadhérine et l'ezrine dans les cellules MDCK **(Pujuguet et al., 2003)**. Ces auteurs ont montré que l'expression dans ces cellules d'une molécule d'ezrine mutée en position T567D (constitutivement active), entraîne des perturbations morphologiques et fonctionnelles des jonctions adhérentes. Ceci pourrait être le résultat de l'internalisation de la E-cadhérine. Ces données nous ont amené à penser que la moésine pourrait jouer un rôle similaire dans l'établissement des jonctions adhérentes endothéliales, puisque nous l'avons identifié comme un des partenaires de la VE-cadhérine.

2.2.2 Résultats

Afin d'initier une étude fonctionnelle de cette protéine dans l'établissement et la maturation des jonctions adhérentes endothéliales, nous avons conçu des vecteurs d'expression eucaryotes de la moésine et de mutants constitutivement actifs en fusion avec la GFP. En nous référant aux données bibliographiques, et en tenant compte des homologies de séquences entre la moésine et l'ezrine, nous avons produit trois mutants (**figure 28**) : deux simples mutants moésine T558D-GFP et moésine T567D-GFP, et un double mutant moésine T558D-T567D-GFP.

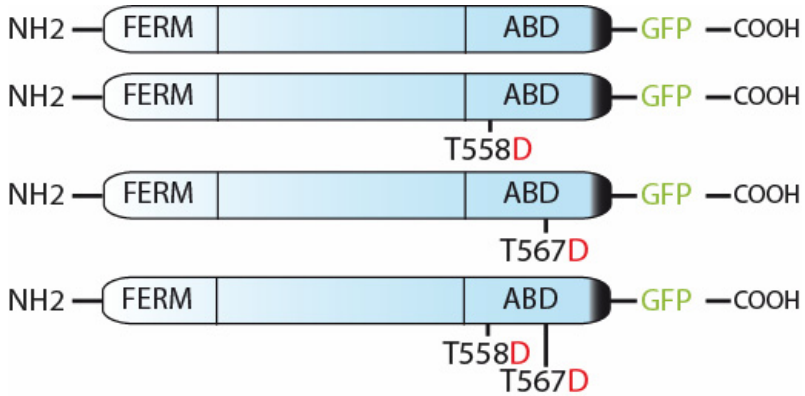


Figure 28 : Représentation des moésines recombinantes disponibles au laboratoire. Les ADNc codant la moésine ont été clonés dans le vecteur d'expression eucaryote pEGFP. Les mutants ont été obtenus par mutagenèse dirigée. Ces vecteurs permettent de faire exprimer transitoirement aux cellules HUVEC la moésine entière sauvage, les simples mutants T558D, T567D, le double mutant sur les résidus tyrosyles 558 et 567. (FERM : band Four point one ERM; ABD: F-Actin Binding Domain).

Notre analyse protéomique a identifié la moésine comme un partenaire de la VE-cadhérine au sein du complexe des jonctions adhérentes matures. Sa capacité à lier l'actine, pourrait lui conférer un rôle redondant de celui de l'annexine 2, d'autant plus que ces protéines ont été extraites des radeaux de cholestérol de cellules BHK (Baby Hamster Kidney) **(Harder et al., 1997)**. Nous avons donc cherché une interaction entre l'annexine 2 et la moésine dans les radeaux de cholestérol (**figure 7, article 2**). La fraction des radeaux a été isolée par un traitement à la digitonine 0,01%, comme indiqué dans la section « matérial et méthods » de l'article 2, puis une immunoprécipitation anti-annexine 2 a été réalisée. Bien que nos deux protéines soient présentes en grande quantité dans la fraction des radeaux (**figure 7, piste 4, article 2**), elles n'interagissent pas entre-elles (**figure 7 piste 5, article 2**). Cela sous-tend l'idée que la moésine aurait un rôle tout à fait particulier et distinct de celui de l'annexine 2 au sein des jonctions adhérentes inter-endothéliales.

En outre, bien qu'associée aux radeaux de cholestérol, la localisation sub-cellulaire de la moésine ne semble pas être affectée par la destruction de radeaux par un traitement des

cellules par la MβCD (voir la section « matériel et méthodes » de l'article 2). Comme le montre la **figure 26**, en présence (**piste 1**) ou en l'absence (**piste 2**) de radeaux intacts, la répartition de la moésine entre la fraction membranaire (M) et le cytoplasme (C) demeure identique. La localisation de la moésine, indépendante du cholestérol membranaire conforte donc l'idée que cette protéine jouerait un rôle particulier dans les jonctions adhérentes.

De plus, il semble que l'association de la moésine à la membrane soit également indépendante de l'état de polymérisation du cytosquelette d'actine. En présence (**figure 29, piste 1**) ou en l'absence (**figure 29, piste 3**) d'un cytosquelette d'actine fonctionnel et dynamique, la répartition de la moésine entre la fraction membranaire (M) et le cytoplasme (C) ne varie pas. Ceci corrobore les données de la littérature selon lesquelles la moésine s'arrime à la membrane par les protéines transmembranaires, les connectant ainsi aux filaments d'actine.

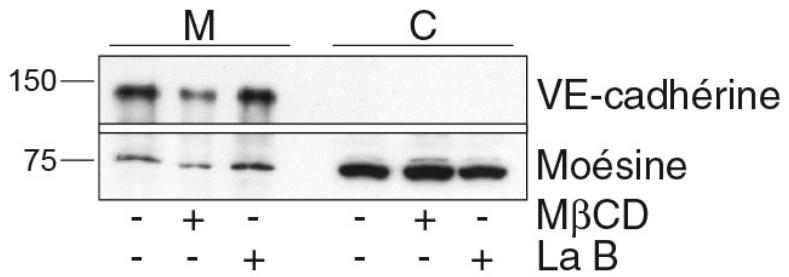


Figure 29 : L'association de la moésine à la membrane n'est affectée ni par un traitement cellulaire par la MβCD ni par la latrunculine B.
Les cellules HUVEC ont été traitées avec 3,8 mM MβCD (+) ou non (-) pendant 30 min ou traitées avec 5 µM latrunculine B (+ LaB) ou non (- LaB) pendant 5 min. Les membranes (M) ont été séparées des cytosols (C) par ultracentrifugation, comme indiqué dans la section « materials and méthods » de l'article n°2. Les extraits membranaires en quantités équivalentes ont été analysés par western-blot. Aucune variation significative des quantités de moésine trouvée dans chacune des fractions, quelque soit le traitement appliqué, n'a pu être mise en évidence.

Des résultats récents obtenus au laboratoire démontrent que la moésine est colocalisée avec la VE-cadhérine au niveau des protusions membranaires dans les cellules sub-confluentes, ce qui n'est plus le cas dans les jonctions des cellules confluentes (**figure 30**). Un rôle dans l'établissement des jonctions adhérentes peut être envisagé pour la moésine.

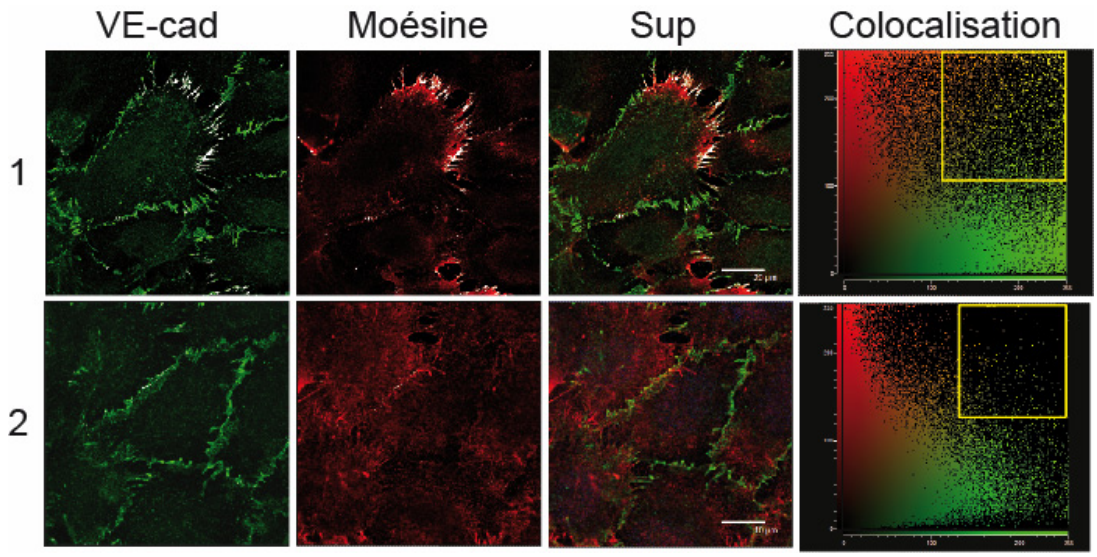


Figure 30 : Localisation sub-cellulaire de la moésine et de la VE-cadhérine en fonction de la confluence cellulaire
Un double immunomarquage (VE-cadhérine (VE-cad) : vert ; moésine : rouge ; superposition : Sup) a été réalisé sur des cellules HUVEC sub-confluentes (1) ou confluentes (2). Les noyaux, contre-colorés avec du DAPI, apparaissent en bleu. Les diagrammes de colocalisation font apparaitre en blanc les pixels verts et rouges parfaitement colocalisés. Les cellules sub-confluentes présentent une colocalisation de la VE-cadhérine et de la moésine sur les protrusions membranaires dans les jonctions en formation. Dans les jonctions adhérentes matures des cellules confluentes, il n'existe plus de colocalisation. Echelle : 20 µm

2.2.3 Discussion et perspectives : Rôle potentiel de la moésine dans les jonctions adhérentes naissantes

Nos résultats préliminaires indiquent que la moésine est un nouveau partenaire de la VE-cadhérine au sein des jonctions adhérentes. Bien que localisée au niveau des radeaux de cholestérol membranaires à l'instar de l'annexine 2, la moésine ne semble pas interagir avec cette dernière. Ces données suggèrent que la moésine pourrait avoir un rôle propre dans les jonctions adhérentes en cours d'élaboration, qui mérite notre intérêt. De plus, sa capacité à lier l'actine laisse penser que cette protéine pourrait constituer un autre moyen de relier le cytosquelette d'actine à la VE-cadhérine dans les cellules sub-confluentes.

Pour aller plus avant dans la connaissance des jonctions adhérentes endothéliales, l'équipe cherche à déterminer par quel mécanisme la moésine participe à l'architecture des jonctions adhérentes. L'équipe dispose de nombreux outils pour réaliser cette étude : des anticorps commerciaux, des siRNA anti-moésine, une collection de vecteurs d'expression eucaryotes de la moésine et des mutants (décrits dans la **figure 25**). En utilisant ces outils,

l'équipe sera à même d'évaluer l'importance de la moésine dans la morphologie des cellules HUVEC et dans la localisation de la VE-cadhérine.

3 DEVELOPPEMENT TECHNIQUE : RECHERCHE D'INHIBITEURS DE LA TRANSMIGRATION LEUCOCYTAIRE (CRIBLAGE A HAUT DEBIT)

3.1 Contexte scientifique

En conditions normales, le VEGF promeut chez l'adulte une angiogenèse physiologique au cours du cycle de la reproduction féminine et lors de la réparation tissulaire **(Byrne et al., 2005)**. La dérégulation du processus d'angiogenèse est impliquée dans le développement de pathologies ischémiques, inflammatoires ou tumorales **(Carmeliet, 2003)**. Les apports sanguins d'oxygène et de nutriments favorisent la croissance tumorale. Dans les cas de tumeurs solides, les cellules tumorales sécrètent du VEGF afin de mettre en place une néo-angiogenèse nécessaire à leur survie et leur développement **(Byrne et al., 2005; Jain, 2003; Jain, 2005)**. Les vaisseaux néo-formés sont imparfaits, leur diamètre est inconstant en raison de la pression exercée par la tumeur elle-même. Ils possèdent un endothélium déstructuré dont les jonctions sont mal organisées. En raison de cette organisation anormale, le flux sanguin est chaotique et les vaisseaux perméables, défauts imputables au déséquilibre entre les niveaux de cytokines pro- et anti-angiogéniques. Dans les vaisseaux tumoraux, le VEGF, en plus d'induire l'angiogenèse, augmente le diamètre des vaisseaux et la perméabilité vasculaire. Cette augmentation de la perméabilité profite aux cellules tumorales qui s'introduisent dans le flux sanguin et essaiment dans l'organisme. En outre, les cellules immunitaires infiltrées dans la tumeur peuvent également sécréter du VEGF pour induire soit une néo-angiogenèse à partir de vaisseaux préexistants, soit une vasculogenèse en attirant sur le site tumoral des progéniteurs endothéliaux. Par ailleurs, les cellules endothéliales des vaisseaux tumoraux expriment des molécules d'adhérence différentes en fonction de la région tumorale et des cytokines en présence (TNFα, VEGF, TGFβ…) rendant ainsi difficile une thérapie anti-tumorale ciblée.

Dans certaines pathologies, la sécrétion de VEGF aggrave les symptômes. C'est le cas pour la polyarthrite rhumatoïde (PR). Il s'agit d'un rhumatisme polyarticulaire chronique et inflammatoire. Avec le temps et la progression de la maladie, elle devient ankylosante, déformante, très douloureuse et parfois invalidante **(Firestein, 2003)**. Cette affection touche tout d'abord les articulations des mains et des pieds, puis se généralise à toutes les autres

articulations. Elle affecte principalement les femmes à partir d'une trentaine d'années et sa prévalence avoisine 1% de la population adulte mondiale. Son étiologie est malheureusement d'origine inconnue mais certainement multifactorielle. Historiquement considérée comme une maladie auto-immune en raison de l'auto-antigène dirigé contre le « facteur rhumatoïde » présent chez la plupart des patients, la PR aurait en outre des causes génétiques associées à certains allèles du complexe majeur d'histocompatibilité, ainsi que des causes immunitaires dues un emballement de la réponse inflammatoire tant humorale que cellulaire. L'inflammation de la membrane synoviale se traduit par une atteinte physique des articulations. En effet, l'infiltration massive dans l'articulation, de neutrophiles, puis de lymphocytes T et B, et de macrophages, qui sécrètent des cytokines, entretient la réaction inflammatoire. Les cellules immunitaires sécrètent d'une part diverses protéases qui dégradent la matrice extracellulaire et les structures articulaires, et d'autre part activent les ostéoclastes qui détruisent également l'articulation. En parallèle, la destruction des structures articulaires provoque une augmentation du volume de liquide synovial. Il en résulte un gonflement conduisant à une hypoxie qui stimule la sécrétion de VEGF, ce qui entraîne une angiogenèse, ainsi qu'une augmentation locale de la perméabilité endothéliale **(Byrne et al., 2005; Taylor, 2005)**. Ainsi s'auto-entretient la situation qui favorise la destruction des structures articulaires.

Aujourd'hui encore inhiber la progression tumorale est un enjeu de santé publique, dans la mesure où, bien que l'arsenal thérapeutique du cancérologue s'étoffe, avec dernièrement l'avènement d'un anticorps anti-VEGF, le bevacizumab (Avastin®, Roche), il n'est pas encore suffisamment spécifique. D'autre part, il reste l'épineux problème de la perméabilité vasculaire qui favorise certainement la dissémination tumorale. D'autres pathologies inflammatoires chroniques nécessitent d'améliorer nos connaissances sur la régulation de la perméabilité endothéliale afin de limiter l'infiltration leucocytaire. Pour ce faire, il est urgent de comprendre l'architecture des jonctions adhérentes, principales structures responsables de la régulation de la perméabilité vasculaire.

Dans une optique à long terme, le programme développé par l'équipe vise à rechercher des molécules capables d'interférer avec la transmigration leucocytaire. Cette recherche qui pourrait avoir des applications thérapeutiques directes dans le traitement des symptômes de certaines maladies inflammatoires chroniques, repose sur des résultats antérieurs obtenus au laboratoire. Hermant et coll., ont démontré que le passage des neutrophiles au travers d'une monocouche de cellules HUVEC s'accompagne de la protéolyse de la partie extracellulaire de la VE-cadhérine, induisant une ouverture transitoire des jonctions adhérentes endothéliales

(Hermant et al., 2003). Cette protéolyse résulte de l'action de deux protéases des neutrophiles, l'élastase et de la cathepsine G. La stratégie envisagée consiste à chercher, au sein de chimiothèques, des molécules capables d'inhiber spécifiquement cette protéolyse induite par les leucocytes lors de leur diapédèse.

3.2 Principe du test

La recherche de molécules capables de bloquer le clivage de la VE-cadhérine provoqué par l'élastase et la cathepsine G a été entreprise par la mise au point d'un ELISA (Enzyme Link ImmunoSorbent Assay), support du criblage. Cet ELISA a été conçu en vue de son automatisation afin qu'il soit effectué sur la plate-forme robotisée de Criblage de Molécules BioActives (CMBA) (Responsable : L. Lafanechère, iRTSV, CEA, Grenoble). La collection de molécules du CMBA contient la Chimiothèque Nationale (GDS CNRS), plus particulièrement celles développées par l'UMR 176 CNRS-IC (Institut Curie, Paris), l'UMR 7081 (Strasbourg), l'UMR 5616 (Grenoble), l'UMR 5181 (Lyon). Au total, le CMBA dispose de près de 12 000 molécules diverses et complexes, formatées en microplaques 96 puits. Par ailleurs, une autre plate-forme de criblage s'est développée au sein du CEA, à Saclay (DSV/DBJC/SMM/G3C), en étroite concertation avec le CMBA. Cette plate-forme s'est dotée d'une collection commerciale de 16 500 composés chimiques (DIVERSet™, ChemBridge), avec pour objectif la mise en commun de cette collection avec le CMBA. Il est donc possible de cribler 28 500 composés au CMBA.

Notre test ELISA devrait permettre de visualiser la protéolyse de la partie extracellulaire de la VE-cadhérine due à l'élastase et à la cathepsine G. Pour ce faire, nous utilisons un fragment recombinant comprenant les quatre premiers modules EC de la partie extracellulaire de la VE-cadhérine couplés à une étiquette polyhistidine à son extrémité C-terminale (VE-EC1-4-His). L'ELISA repose sur l'utilisation d'un anticorps de capture polyclonal, fixé au support, spécifiquement dirigé contre l'extrémité N-terminale du fragment recombinant et d'un anticorps de détection dirigé contre l'étiquette polyhistidine. L'anticorps de détection est couplé à la peroxydase, ce qui permet une révélation par chimioluminescence. L'intensité du signal est donc proportionnelle à la quantité de fragment recombinant. L'incubation avec l'élastase et/ou la cathepsine G purifiées entraîne la protéolyse du fragment recombinant, ce qui aboutit à une perte du signal luminescent. Si une molécule de la chimiothèque s'avère capable d'inhiber ce clivage, l'intégrité du fragment sera alors maintenue et le signal restauré (**figure 31**).

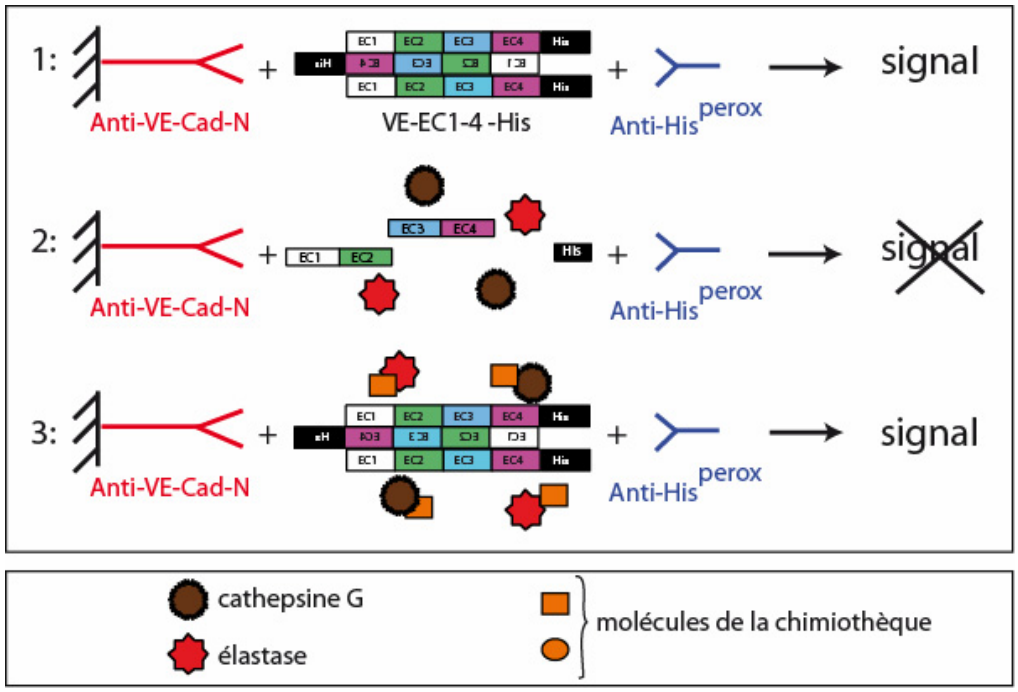


Figure 31 : Principe du test ELISA
1 : Le test ELISA permet la détection du fragment VE-EC1-4-His intact.
2 : Le fragment soumis à l'action des protéases, est dégradé et devient donc indétectable.
3 : Au cours du criblage, si une molécule de la chimiothèque testée s'avère apte à inhiber les protéases, l'intégrité du fragment VE-EC1-4-His sera préservée et le signal restauré.

3.3 Matériel et méthodes

3.3.1 Fragments recombinants

Les fragments recombinants VE-EC3-4 et VE-EC1-4 sont constitués respectivement des deux modules EC3 et EC4 et des quatre modules N-terminaux du domaine extracellulaire de la VE-cadhérine. Le fragment VE-EC1-4-His possède en plus une étiquette polyhistidine à son extrémité C-terminale (**figure 32**).

Tous ces fragments sont produits et utilisés en routine au laboratoire **(Bibert et al., 2002)**. Brièvement, les fragments sont synthétisés en bactérie, dans la souche *E.coli* BL21, puis purifiés à partir de la fraction insoluble en présence d'urée (0,5M) par chromatographie échangeuse d'anions. La fraction est ensuite placée en présence de calcium afin de favoriser le repliement des protéines, puis concentrée. Les agrégats générés au cours des étapes de purification précédentes sont éliminés par chromatographie d'exclusion. Les fragments recombinants sont conservés et dilués le cas échéant dans un tampon Tris 50mM pH 8, NaCl 100mM, $CaCl_2$ 5mM.

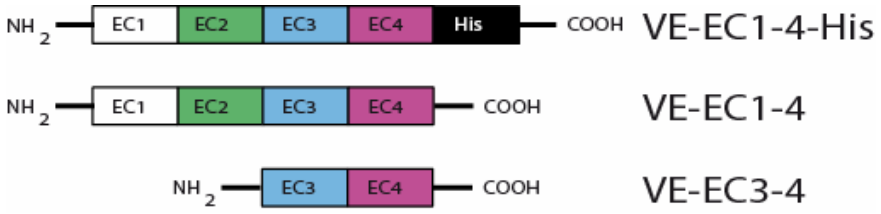


Figure 32 : Structure modulaire des fragments recombinants de la VE-cadhérine utilisés dans le dosage ELISA
Le fragment recombinant VE-EC1-4-His comporte les quatre modules extracellulaires N-terminaux de la VE-cadhérine ainsi qu'une étiquette polyhistidine à son extrémité C-terminale. Les fragments VE-EC1-4 (dépourvus d'étiquette polyhistidine) et VE-EC3-4 (sans les modules 1 et 2) ont été utilisés pour vérifier la spécificité du test.

3.3.2 Digestion des fragments recombinants par l'élastase et la cathepsine G

Le fragment VE-EC1-4-His (10µg/mL) est mélangé à l'élastase humaine de neutrophile (0,1 unité, Calbiochem) et/ou à la cathepsine G (0,05 unité, Athens Research), le but étant d'obtenir la digestion quasi totale du fragment avec un minimum de produits. Le mélange est incubé 2 heures à 37°C. La réaction est soit stoppée par ajout de tampon Laemmli pour analyse par électrophorèse, soit par un inhibiteur spécifique de nos protéases d'intérêt, le SLPI (Secretory Leucocyte Protease Inhibitor) recombinant humain (R&D systems), incubé 30 min à 37°C avec les enzymes **(Hermant et al., 2003)**.

3.3.3 Anticorps

Nous avons fait produire un anticorps spécifiquement dirigé contre la partie N-terminale de la VE-cadhérine par immunisation de lapins avec le peptide synthétique DWIWNQMHIDEEKNT correspondant aux 15 premiers amino-acides N-terminaux de la VE-cadhérine (Eurogentec). Cette séquence, qui ne présente pas d'homologie avec le reste de la molécule, a permis d'obtenir un anticorps (dénommé anti-N-ter). Sa spécificité a été démontrée par un test ELISA dans lequel l'anticorps reconnaît les fragments VE-EC1-4 et VE-EC1-4-His mais pas le fragment VE-EC3-4 dépourvu de l'extrémité N-terminale de la VE-cadhérine.

L'anticorps de détection dirigé contre l'étiquette polyhistidine (anticorps anti-His tag), couplé à la peroxydase est fourni par Sigma-Aldrich. Sa spécificité a été démontrée par le fait que cet anti-corps ne reconnait ni le fragment VE-EC1-4 ni le fragment VE-EC3-4.

3.3.4 ELISA

Les plaques 96 puits (Falcon, Beckson Dikinson) sont pré-traitées avec un tampon NaHCO3 0,1M pH 9,6, pendant une nuit à + 4°C, à raison de 100µL par puits. Chaque puits est saturé pendant 1h à + 4°C avec 200µL d'une solution de PBS et d'albumine sérique bovine 1% (PBS-BSA, 1%). L'anticorps de capture anti-N-ter dans 100µL d'une solution PBS-BSA 0.5% est fixé dans les puits pendant 1h30 à température ambiante. Les fragments recombinants, digérés ou non, sont incubés pendant 2h à température ambiante. L'anticorps de détection anti-His tag dans 100µL d'une solution PBS-BSA 0.5% est incubé pendant 1h à température ambiante. Le couplage de cet anticorps à la peroxydase permet de révéler le test ELISA par colorimétrie. Le substrat de la peroxydase, l'o-phénylènediamine (OPD, DakoCytomation) génère un produit coloré dont l'absorbance se lit à 490 nm. Entre chaque étape, il est nécessaire de procéder à trois lavages avec du PBS-Tween 20 0,05%.

3.4 Résultats

Les premiers objectifs ont été de tester différentes conditions expérimentales pour obtenir une détection optimale du fragment VE-EC 1-4-His avec une consommation minimale du fragment, le criblage de la chimiothèque s'effectuant dans plus de 22 000 puits. Les tests ont révèlé que l'anticorps anti-N-ter doit être utilisé à une dilution égale au 1/400e, l'anticorps anti-His tag à une dilution égale au 1/50 000e et le fragment VE-EC1-4-His à une concentration voisine de 10 µg/mL (**figure 33**).

En parallèle, je me suis attachée à optimiser la digestion du fragment VE-EC1-4-His par les protéases, le but étant d'obtenir une digestion quasi totale du fragment avec un minimum d'enzyme. Les meilleurs résultats ont été obtenus avec une concentration de VE-EC1-4-His égale à 5 µg/mL, soumis à 0,1 unité d'élastase et 0,05 unité de cathepsine G (**figure 31**).

Les résultats des tests préliminaires ont montré une action protéolytique des enzymes sur les anticorps. En conséquence, la digestion des fragments par les protéases a été réalisée séparément de l'ELISA. Les produits de dégradation et les fragments intacts servant de témoins ont été ensuite incubés sur la plaque de test.

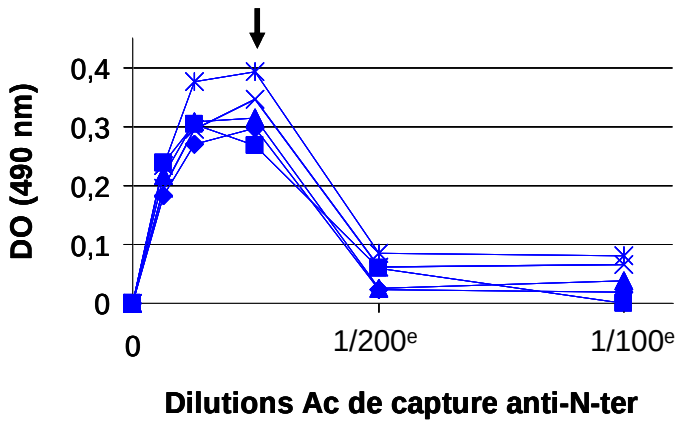


Figure 33 : Mise au point du test ELISA pour le criblage de la chimiothèque.
L'anticorps anti-N-ter est adsorbé au support à différentes dilutions (1/100e, 1/200e, 1/400e, 1/800e, 1/1600e). Le fragment recombinant VE-EC1-4-His est ensuite incubé à 10 (*) ; 15 (x) ; 25 (▲) ; 50 (■) ; 100 (♦) µg/mL. L'anticorps anti-His tag couplé à la peroxydase (HRP) permet la révélation avec un substrat coloré dont l'absorbance se mesure à 490 nm. Le graphe montre que l'ELISA est optimal pour une concentration en fragment VE-EC1-4-His de 10 µg/mL et une dilution de l'anticorps anti-N-ter au 1/400e (flèche).

Aujourd'hui, le test ELISA décrit dans la **figure 31**, est optimisé et disponible au laboratoire. Le fragment VE-EC1-4-His est utilisé à une concentration de 10µg/mL et l'élastase et la cathepsine G à 0,2 et 0,1 unité par puits respectivement.

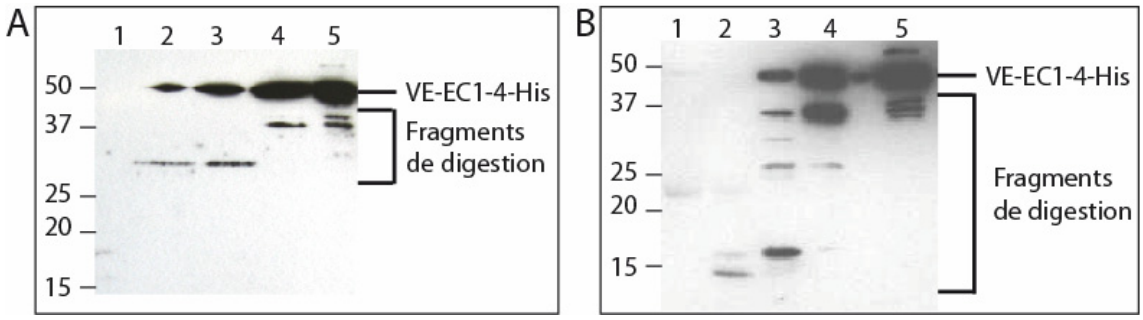


Figure 34 : Digestion du fragment Cad 1-4-His par l'élastase et la cathepsine G
Le fragment VE-EC1-4-His, à 5 µg/mL, a été mis en présence d'élastase (**A**) ou de cathepsine G (**B**) à des concentrations de : 0,1 unité (*piste 1*) ; 5.10^{-2} unité (*piste 2*) ; 5.10^{-3} unité (*piste 3*) ; 5.10^{-4} unité (*piste 4*) ou aucune enzyme (*piste 5*) 2 heures à 37°C. Un western Blot révélé avec un anticorps anti-VE-cadhérine montre une disparition du fragment VE-EC1-4-His suite aux clivages par les deux enzymes. Une digestion quasi-totale du fragment est obtenue avec 0,1 et 0,05 unité d'élastase et de cathepsine G respectivement.

Bien que la mise au point du test ELISA qui nous est nécessaire ait abouti, un écueil est apparu au cours du développement. Le fragment VE-EC1-4-His utilisé s'est avéré instable, et impossible à conserver plus d'une semaine. Cette impossibilité à conserver durablement le

fragment est incompatible avec le criblage de la chimiothèque qui peut durer plusieurs semaines, puisqu'on ne peut admettre une variabilité des produits au cours du criblage. En conséquence, l'équipe explore désormais de nouvelles méthodes de purification et de conservation du fragment VE-EC1-4-His afin de remédier à cet inconvénient.

3.5 Poursuite du développement

Le test ELISA reste à finaliser. Le fait qu'il sera effectué sur le robot de la plate-forme du CMBA impose des contraintes inhérentes aux installations. Le test doit notamment pouvoir être révélé par chimioluminescence. Il s'agit désormais de transposer le test en remplaçant les plaques transparentes par des plaques opaques adaptées à l'émission de photons.

Une fois la technique mise au point, il sera certainement possible d'élargir la recherche à une autre chimiothèque appartenant au National Cancer Institute (Etats-Unis) qui comprend 140 000 composés synthétiques et naturels, tous parfaitement caractérisés. Outre cette chimiothèque, d'autres molécules pourraient nous être fournies par Mme Michèle Reboud-Ravaux (Laboratoire d'Enzymologie Moléculaire et Fonctionnelle, Institut J. Monod, Université Pierre et Marie Curie, Paris).

Par la suite, le potentiel thérapeutique des molécules sélectionnées suite aux criblages des chimiothèques sera évalué et nous poursuivrons les pistes les plus prometteuses. Ainsi, il sera nécessaire de s'assurer que les substances choisies sont bien solubles en milieu physiologique ou qu'elles peuvent être chimiquement modifiées afin de le devenir. Il faudra ensuite vérifier l'innocuité de ces molécules vis-à-vis des cellules endothéliales dans un test de perméabilité cellulaire utilisant des unités Transwell (**figure 35**).

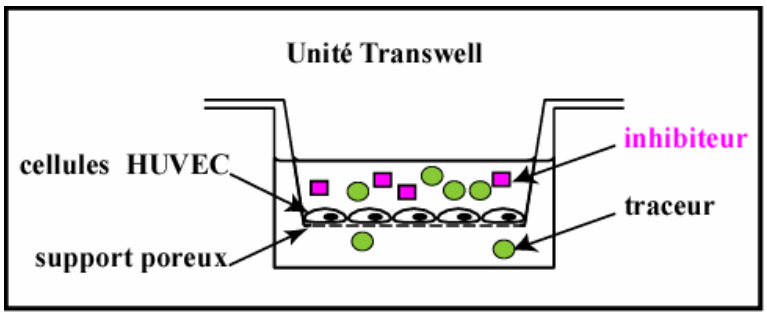


Figure 35 : Test de perméabilité cellulaire
Ce test permettra de déterminer si les molécules sélectionnées dans la chimiothèque présentent une toxicité éventuelle pour les cellules endothéliales. Ce test consiste à mesurer la perméabilité de monocouches de cellules HUVEC en suivant la diffusion d'un traceur du compartiment supérieur vers le compartiment inférieur des unités Transwell.

Un premier test de toxicité des molécules sélectionnées sera entrepris sur les monocouches de cellules endothéliales en suivant la diffusion d'un traceur du compartiment supérieur vers le compartiment inférieur. Si une molécule s'avère toxique, l'organisation des cellules endothéliales s'en trouvera modifiée et leur capacité à réguler la perméabilité para-cellulaire compromise **(figure 35)**.

En outre, un test similaire pourra être mis en œuvre pour vérifier le potentiel inhibiteur des substances sélectionnées au cours des criblages sur la diapédèse des neutrophiles (**figure 36**). Pratiquement, il faudra s'assurer, qu'en présence des molécules sélectionnées, la transmigration est belle et bien inhibée en quantifiant le nombre de neutrophiles ayant migré au travers des monocouches du compartiment supérieur vers le compartiment inférieur des unités Transwells.

Enfin, en vue d'un développement sur le long terme, une étude du blocage de l'infiltration leucocytaire dans des animaux s'imposera afin de valider les résultats obtenus avec les tests *in vitro*.

L'objectif final de cette étude de longue haleine initiée durant cette thèse est la mise au point de traitements capables d'inhiber l'infiltration leucocytaire et ainsi d'enrayer l'installation d'une réaction inflammatoire chronique.

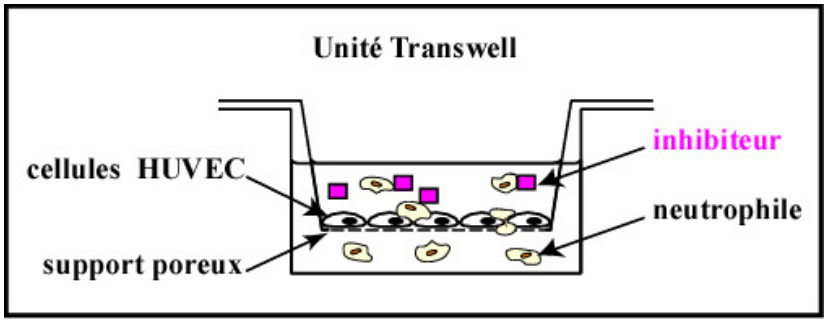


Figure 36 : Test fonctionnel des inhibiteurs sélectionnés dans la chimiothèque
Les neutrophiles, placés dans le compartiment supérieur d'unités Transwell, sont capables de traverser les monocouches endothéliales après activation par les cytokines inflammatoires. En présence d'un inhibiteur potentiel du clivage de la VE-cadhérine, la transmigration des neutrophiles devrait être freinée. Le test proprement dit consiste à quantifier le nombre de neutrophiles ayant transmigré en mesurant la quantité de protéines contenue dans les compartiments inférieurs après la lyse des leucocytes.

DISCUSSION ET CONCLUSIONS GENERALES

DISCUSSION ET CONCLUSIONS GENERALES

Les études réalisées au cours de cette thèse ont mis en exergue la complexité de la jonction adhérente endothéliale mature et ont fourni de précieux éléments de compréhension de leur biologie et de leur architecture.

1 CONNEXION AU CYTOSQUELETTE D'ACTINE

Nous avons découvert grâce à l'analyse protéomique que de nombreuses protéines liant l'actine étaient associées au complexe jonctionnel à base de VE-cadhérine (**article 1, table1**). Leur présence au sein du complexe laisse entrevoir que la connexion au cytosquelette d'actine n'est pas constituée d'un unique et simple lien protéique.

Depuis la divulgation d'études réfutant la capacité de l'α-caténine à participer à l'élaboration des jonctions adhérentes épithéliales et à y connecter les filaments d'actine, la polémique a enflé et des théories variées ont émergé **(Drees et al., 2005; Yamada et al., 2005b)**. Certaines d'entre elles proposent que des protéines telles que le complexe Arp2/3 ou les formines fassent le lien entre les complexes cadhérines/caténines et le cytosquelette d'actine. Ces protéines seraient remplacées par des protéines telles que les nectines ou la moésine au cours de la maturation des jonctions **(Gates and Peifer, 2005; Weis and Nelson, 2006)**. L'implication du complexe Arp2/3 dans cette connexion reste à vérifier. En effet, nous avons détecté, dans les jonctions adhérentes immatures, la présence de la cortactine. Cette protéine, qui interagit avec le complexe Arp2/3, catalyse son activité de nucléation et de polymérisation de l'actine **(Uruno et al., 2001)**. Nos résultats indiquent que cette protéine (et donc le complexe Arp2/3) n'est pas directement associée au complexe jonctionnel puisque la dépolymérisation des filaments d'actine abolit l'interaction de la cortactine avec le reste du complexe jonctionnel (**article 1, figure 3, pistes 1 et 2**). Nous en déduisons que, bien qu'impliqué dans la formation des jonctions adhérentes, le complexe Arp2/3/cortactine est lié à la jonction par l'intermédiaire de filaments d'actine et ne peut donc pas établir la connexion entre le cytosquelette d'actine et le complexe protéique de la jonction adhérente endothéliale, immature comme mature (**article 1, figure 3**). Quant aux formines, l'analyse protéomique ne nous a pas permis de détecter leur présence dans le complexe jonctionnel et aucune immunoprécipitation de ces protéines n'a pu être réalisée faute d'anticorps disponible.

Dans les jonctions adhérentes matures, comme nous l'avons démontré, l'annexine 2 interagit directement avec le complexe jonctionnel à base de VE-cadhérine. L'annexine 2 a la capacité de se lier aux filaments d'actine par son domaine C-terminal **(Filipenko and**

Waisman, 2001). Nous considérons donc l'annexine 2 comme l'une des protéines capables d'associer le complexe jonctionnel mature au cytosquelette d'actine. Etant donné qu'il existe une corrélation entre l'accumulation de l'annexine 2 sous la membrane plasmique et la maturation de la jonction adhérente, il est envisageable que l'annexine 2 participe à cette maturation en arrimant le complexe jonctionnel aux radeaux de cholestérol (**figure 23**). Nous pensons que les filaments d'actine connectés à l'annexine 2 pourraient servir d'ancrage et rigidifier l'ensemble, conférant ainsi la stabilité aux jonctions adhérentes.

L'analyse protéomique complétée par des résultats d'immunofluorescence suggère que la moésine fait partie intégrante du complexe jonctionnel à base de VE-cadhérine des cellules sub-confluentes. Cette protéine, qui agit sur le remodelage du réseau d'actine cortical, joue certainement un rôle dans la morphologie des jonctions en formation **(Fievet et al., 2007)**.

Par ailleurs nous avons détecté d'autres protéines capables de lier l'actine dans le complexe jonctionnel à base de VE-cadhérine, notamment la myosine 9 (**article 1, table 1**). Ce résultat est cohérent avec les études de l'équipe de A. Yap concernant la myosine 2 qui montrent que cette protéine est nécessaire à la concentration de la E-cadhérine au niveau des jonctions intercellulaires **(Shewan et al., 2005)**. En fait, la myosine 2 est liée au cytosquelette d'actine et à la vinculine, elle-même connectée au complexe jonctionnel à base de E-cadhérine. Ainsi s'établit une connexion entre la E-cadhérine et le réseau d'actine **(Maddugoda et al., 2007)**.

Chacun de ces résultats met en lumière la complexité de la liaison entre les complexes cadhérine/caténines et le cytosquelette d'actine. On peut penser que ces différentes connexions mettent en œuvre une combinaison protéique variable en fonction de l'état de la cellule endothéliale. La connexion impliquant les myosines et/ou la moésine pourrait être mise en jeu lors de la formation des contacts intercellulaires précoces, tandis que celle faisant intervenir l'annexine 2 pourrait servir à stabiliser les jonctions intercellulaires déjà bien établies.

L'enjeu pour l'équipe est désormais de déterminer avec précision le rôle des différentes protéines liant l'actine découvertes au cours de nos analyses. En effet, le cytosquelette d'actine est impliqué dans toutes les étapes de formation et de maturation des jonctions adhérentes. Un réseau d'actine intact et dynamique est nécessaire à l'établissement des jonctions (voir annexe 2). Les filaments d'actine permettent la mise en contact de deux cellules adjacentes et serviraient de guide au complexe cadhérine/caténines jusqu'à la zone d'interaction cellulaire. Il reste à savoir quelles protéines sont responsables du transport des complexes le long des filaments d'actine. Dans les cellules sub-confluentes, qui possèdent des

jonctions immatures, une colocalisation entre la moésine et la VE-cadhérine apparaît, ce qui n'est plus le cas dans les jonctions matures des cellules confluentes. La moésine pourrait donc jouer un rôle particulier dans l'établissement des jonctions adhérentes, en permettant peut-être l'extension des premiers contacts intercellulaires. Puis l'arrimage du complexe jonctionnel aux filaments d'actine, par l'intermédiaire du domaine ABD de l'annexine 2 permettrait la stabilisation et la maturation des jonctions adhérentes. Dans chacune de ces étapes de formation des jonctions, au moins une protéine liant l'actine intervient. Il serait intéressant d'évaluer l'importance des domaines de liaison à l'actine dans la localisation sub-cellulaire de ces protéines d'intérêt. Interagiraient-elles toujours avec le complexe jonctionnel bien qu'incapables de s'associer au cytosquelette d'actine ? On peut s'interroger également sur l'existence d'autres intermédiaires potentiels entre le complexe et le réseau d'actine, qui n'ont peut-être pas encore pu être identifiés. L'ensemble des protéines proposées ici ne constitue certainement pas une liste exhaustive.

2 SIGNALISATION INTRACELLULAIRE ET STABILITE JONCTIONNELLE

La stimulation des cellules endothéliales le VEGF s'accompagne d'un accroissement de la perméabilité vasculaire **(Esser et al., 1998)**. Ces traitements réalisés sur nos monocouches d'HUVEC, entraînent une délocalisation de l'annexine 2 de la membrane plasmique vers le cytoplasme (**article 2, figure 8**). Ceci suggère que la déstabilisation des jonctions observée suite à ces traitements résulterait de la déconnexion de l'annexine 2 du complexe jonctionnel à base de VE-cadhérine. Si cette hypothèse était vérifiée, cela permettrait d'expliquer comment les cellules endothéliales passent d'un état quiescent à un état migratoire, phénomène observé au cours de l'angiogenèse, sous l'influence du VEGF. Pour l'heure, les mécanismes permettant le découplage entre le complexe jonctionnel et l'annexine 2 nous sont encore inconnus. Il n'est pas impossible que la signalisation intracellulaire provoquée par la fixation de nos cytokines d'intérêt sur leurs récepteurs engendre des modifications de phosphorylation de la VE-cadhérine et de ces partenaires. Se faisant, les jonctions se déstabiliseraient, et la dissociation de l'annexine 2 pourrait avoir lieu.

L'inhibition de l'expression de l'annexine 2 par siRNA (~50%) provoque une délocalisation de la VE-cadhérine des jonctions (**article 2, figure 4**). On peut s'interroger sur le devenir de cette cadhérine : est-elle accumulée dans un compartiment intracellulaire ou dégradée ? Si l'on admet que la stabilisation des jonctions à base de VE-cadhérine se fait grâce à l'annexine 2, l'absence de cette dernière pourrait empêcher la maturation la jonction et

peut-être induire une ré-internalisation de la VE-cadhérine après son export à la membrane. Nous avons observé que bien que l'inhibition de l'expression de l'annexine 2 provoque une délocalisation massive de la VE-cadhérine, les cellules endothéliales restent jointives On peut se demander s'il existe une augmentation de la perméabilité para-cellulaire consécutive à la disparition de la VE-cadhérine des jonctions et enfin quelles sont les protéines jonctionnelles qui se substituent à la VE-cadhérine pour maintenir la cohésion cellulaire.

En outre, la VE-cadhérine est une molécule qui transmet des signaux anti-apoptotiques pour les cellules endothéliales **(Carmeliet et al., 1999; Grazia Lampugnani et al., 2003)**. Ainsi on peut invisager qu'il existe un impact de la perte de la VE-cadhérine aux jonctions en réponse à l'extinction de l'annexine 2 par siRNA. Ce traitement conduit-il à la mise en place d'une signalisation pro-apoptotique ? Des analyses plus poussées du phénotype provoqué par la transfection des siRNA anti-annexine 2 mérite d'être réalisée. La technique de transfection de siRNA par Magnetofection^{TM} introduite au laboratoire induit plus de 50% d'inhibition, et autorise donc de nouvelles expérimentations.

3 POTENTIALITES DE L'OUTIL PROTEOMIQUE

L'analyse protéomique constitue une technique puissante qui permet d'appréhender globalement différents protéomes. Nous avons initié son utilisation au laboratoire en l'appliquant à l'étude des jonctions adhérentes matures, avec succès. Aujourd'hui, l'équipe souhaite établir une comparaison de la composition des jonctions adhérentes en fonction des stimuli que subissent les cellules endothéliales (angiogéniques ou inflammatoires) à l'aide d'une méthode de marquage métabolique par des isotopes stables (Stable isotope labeling with amino acids in cell culture (SILAC)). Cette méthode permet de quantifier à grande échelle les changements d'abondance protéique issus de cellules traitées dans des conditions différentes. Elle repose sur l'incorporation d'un acide aminé essentiel marqué au ^{13}C (ou ^{2}H) dans le milieu de culture cellulaire **(Ong et al., 2003)**. Les monocouches endothéliales cultivées en présence ou non d'isotope seront soumises à différents stimuli. Elle peut être utilisée pour suivre d'éventuelles modifications post-traductionnelles intervenant sur certaines protéines du complexe à base de VE cadhérine telles les phosphorylations sur tyrosine, sérine ou thréonine **(Amanchy et al., 2005; Zhang et al., 2006)**. Au regard de l'importance des régulations par phosphorylation de la jonction adhérente, l'obtention d'une vue globale des phosphorylations des protéines jonctionnelles en fonction des différents états que peuvent adopter des cellules endothéliales serait pertinente.

Cette étude qui fait suite à l'analyse protéomique réalisée sur le complexe des jonctions adhérentes matures sera également réalisée en collaboration avec M. Jaquinod (EDyP, iRTSV, CEA, Grenoble). Les travaux se poursuivront par l'étude du rôle des protéines ainsi identifiées sur la formation ou la déstabilisation des jonctions adhérentes endothéliales.

4 INHIBITION DE LA TRANSMIGRATION LEUCOCYTAIRE

En se basant sur les données fondamentales acquises par l'équipe démontrant l'implication de deux protéases de neutrophile dans la transmigration leucocytaire au travers des jonctions adhérentes **(Hermant et al., 2003)**, nous avons développé un projet global de criblage de chimiothèques. Aujourd'hui nous disposons d'un test ELISA fiable permettant de tester la capacité des molécules de la chimiothèque à inhiber l'élastase et la cathepsine G exprimées par les neutrophiles lors de la diapédèse. Le but dans ce cas serait de fournir de nouvelles pistes de recherche appliquée pour contribuer au développement de nouvelles molécules curatives des maladies inflammatoires en enrayant l'infiltration leucocytaire.

En outre, d'autres pathologies comme l'invasion tumorale semblent faire intervenir des protéases au cours des phénomènes de transmigration au travers de la barrière endothéliale **(Kim et al., 1998)**. De ce fait, notre méthode de criblage pourrait être transposable et fournir de nouveaux éléments pour le développement de thérapies pour contrer ces pathologies.

1 Annexe 1 : *VE-cadhérin and neutrophil transmigration*

CHAPTER 48

Vascular Endothelial Cadherin and Neutrophil Transmigration

Bastien Hermant, Marianne Weidenhaupt, Stéphanie Heyraud, and Danielle Gulino-Debrac

Laboratoire d'Ingénierie des Macromolécules, Institut de Biologie Structurale Jean-Pierre Ebel, Grenoble, F-38027 and UMR-CNRS-CEA-UJF 5075, France

This review focuses on the major proteins involved in the various stages of the transmigration of leukocytes across the endothelium and on the molecular mechanisms underlying this process.

Introduction

He Endothelium

The endothelium is a monolayer of cells covering the inside of the entire vascular tree. It is also a semipermeable barrier that, by modulating its intercellular junctions, allows the transmigration of various blood constituents (Figure 1). Morphologically, three types of organelles constitute endothelial cell junctions. At the apical side of the cells, tight junctions seal the cells. Gap junctions, which are sometimes intercalated with tight junctions, allow the exchange of ions and small molecules between adjacent cells. Adherens junctions, located at a more basal position, mediate the physical contacts between cells and are anchored in the actin cytoskeleton.

The endothelium is also the point of entry of circulating leukocytes into inflamed tissue. The mechanism of leukocyte entrance into tissues is a complex, multistep event involving leukocyte adhesion to the endothelium and subsequent migration across the blood vessel wall [1]. Whereas the early steps leading to leukocyte adhesion are well understood, it is still unclear how leukocytes actually crawl through the endothelial wall. A recent study suggested that leukocytes could pass across the body of endothelial cells using a transcellular route, but it is generally accepted that most leukocyte transendothelial migration occurs via paracellular rather than transcellular routes.

Neutrophils

Leukocytes are circulating blood cells involved in defending the body against infective organisms and foreign substances. During normal immunosurveillance, leukocytes circulate in search of foreign antigens. Injury or infections cause inflammatory responses that lead to the recruitment of granulocytes, monocytes, and T cells to the sites of inflammation. Responding to the signals induced by infections or tissue damages, sentinel cells stationed in the tissues, mast cells and macrophages, release histamine, eicosanoids, and chemokines, which cause vasodilatation of blood vessels and consequently a decrease of the blood flow. This facilitates the capture of leukocytes on the surface of the endothelium. In parallel, inflammatory cytokines such as TNFα stimulate the endothelium to express adhesion receptors on its apical surface with which leukocytes can interact.

Following transmigration into the tissue, leukocytes undergo directed migration through a concentration gradient of chemotactic cytokines to the site of inflammation. According to their type and their specialized function, leukocytes release different inflammatory cytokines that, in turn, activate other white blood cells and enhance leukocyte recruitment to the inflammatory site.

Neutrophils form the primary defense against bacterial infections. Similarly to the other cells of the immune

*Current address: European Molecalar Biology Laboratory (EMBL), Grenoble, France

Copyright © 2006, Elsevier Science (USA).
All rights reserved.

Ch048 8/23/05 2:04 PM Page 310

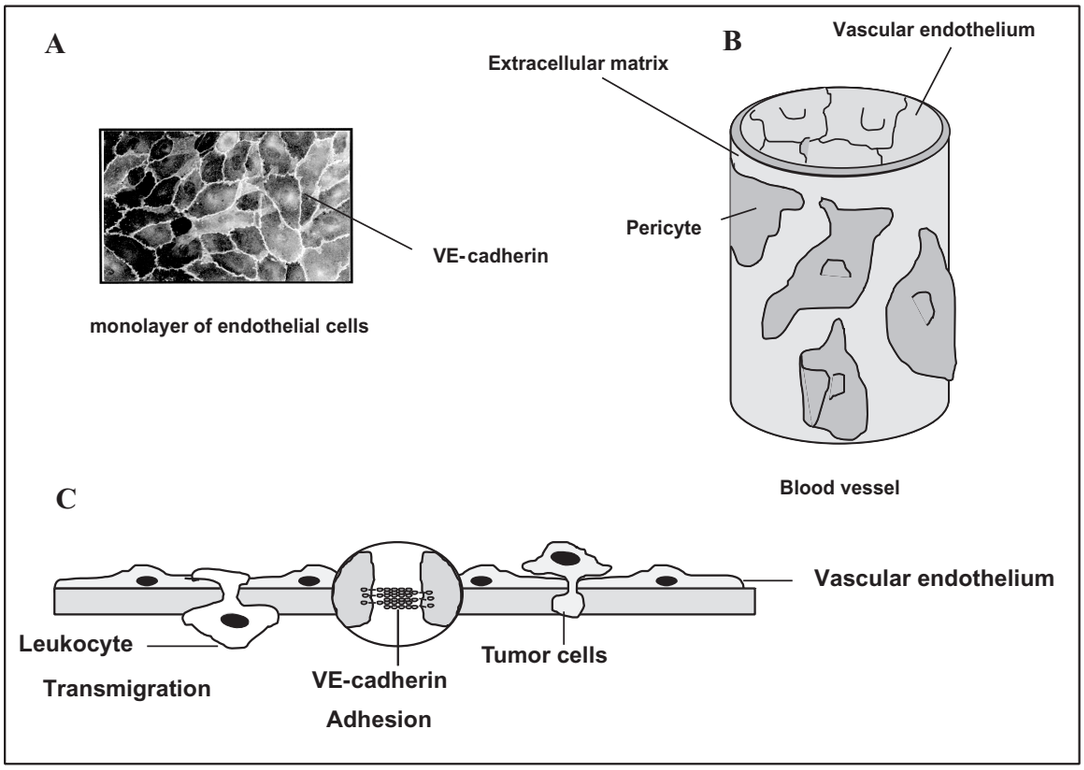


Figure 1 VE-cadherin is involved in the maintenance and restoration of the endothelium integrity. The endothelium is made up of a monolayer of endothelial cells **(A)** that separates blood components from underlying tissues **(B)**. VE-cadherin is expressed at the lateral junctions between endothelial cells **(C)**. Different types of leukocytes and tumor cells transmigrate at the intercellular junctions where VE-cadherin is expressed **(C)**.

system, they are produced in the bone marrow and circulate in the bloodstream. However, they can move out of blood vessels into infected tissue where they attack the foreign substances mainly through phagocytosis which allows them to "eat" other cells and foreign substances. Both the transmigration of neutrophils across the endothelium and the intracellular degradation of antigens are at least in part mediated by proteases, of which there are four classes: serine proteases, metalloproteases (MMPs), thiol proteases, and aspartate proteases. The first two classes play a critical role in the degradation of extracellular components, whereas the two others are involved in the intracellular degradation of antigens. Serine proteases, characterized by the presence of a catalytic triad made of histidine, aspartic acid, and serine, are packed into the azurophil granules of neutrophils. They include elastase, cathepsin G, proteinase 3, and Cap37, the last being enzymatically inactive. Upon stimulation of neutrophils by proinflammatory mediators, the content of the azurophil granules is translocated toward the external membrane of neutrophils. These surface-bound proteases are catalytically active and remarkably resistant to naturally occurring protease inhibitors [2].

Markers Expressed at Endothelial Cell–Cell Junctions

In addition to proteins that are encountered at interepithelial cell contacts, such as JAMs and CD99, the endothelial junctions express specific marker proteins such as PECAM-1 and VE-cadherin (vascular endothelial cadherin, also known as cadherin 5). All these adhesive receptors, being localized at the endothelial cell–cell junctions, are on the path of leukocyte emigration.

Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1 (PECAM-1)

PECAM-1 is a transmembrane glycoprotein of the immunoglobulin gene superfamily expressed at the surface of monocytes, neutrophils, and naive T lymphocytes and also concentrated at endothelial cell–cell junctions. It possesses an extracellular region consisting of six Ig-like domains and a cytoplasmic tail exhibiting a variable size due to differential splicing [3] (Figure 2).

Ch048 8/23/05 2:04 PM Page 311

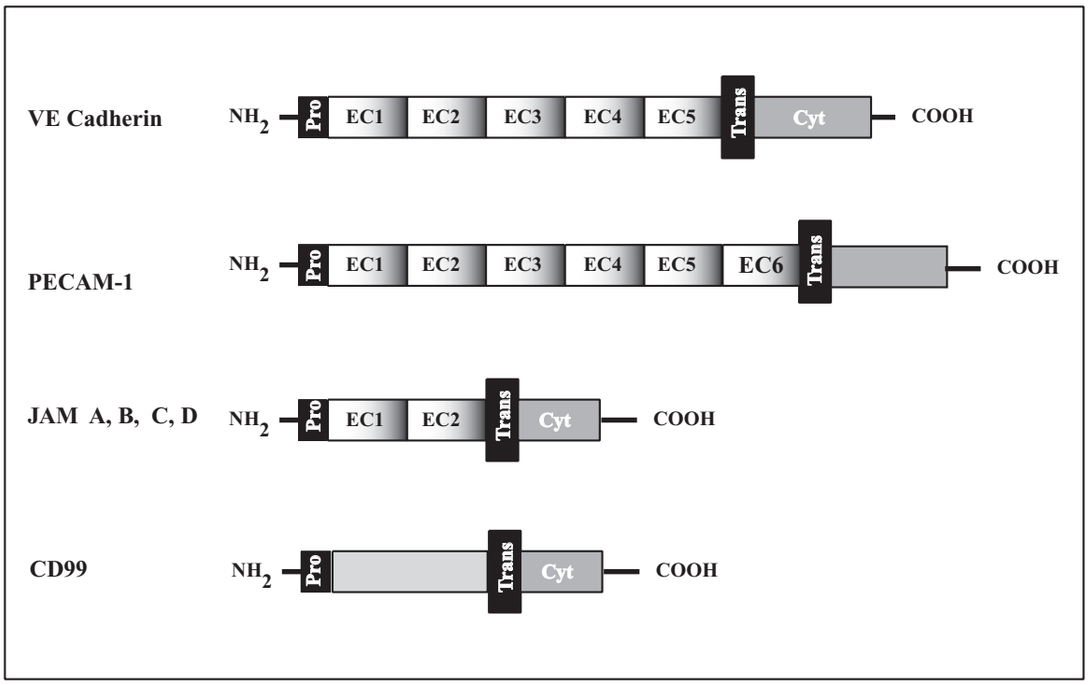


Figure 2 Schematic structures of the adhesion receptors expressed at endothelial cell–cell junctions. VE-cadherin belongs to the cadherin superfamily and PECAM-1 and JAM A, B, C, D to the immunoglobulin family, whereas CD99 is a unique molecule. ECi: Ig domains. Pro and Trans correspond to the propeptide and the transmembrane domain of each molecule. Cyt designates their cytoplasmic parts.

The extracellular domain of PECAM-1 binds very weakly to PECAM-1-expressing cells because of its low affinity for its cellular target. Once expressed at the surface of liposomes, however, PECAM-1 is able to promote the association of these vesicles. It can be deduced that PECAM-1 is able to interact homophilically when it is highly concentrated at the surface of the membrane. To define the immunoglobulin domains responsible for mediating homophilic binding, several chimeric proteins with one, two, three, four, or five Ig domains deleted were elaborated. Using an adhesion assay, these studies establish that the two N-terminal Ig domains EC1 and EC2 of PECAM-1 (Figure 2) are both necessary and sufficient to mediate homophilic interactions, but maximal stable binding requires all six extracellular Ig domains of PECAM-1. These homophilic interactions occur at the junctions between endothelial cells and may be involved in the diapedesis of leukocytes by creating heterotypic links between leukocytes and endothelial PECAM-1 molecules. However, PECAM-1-deficient mice suffer from only limited effects on the transendothelial migration of leukocytes. This probably results from an existing redundancy between adhesion molecules involved in leukocyte transmigration.

Similarly to other adhesive receptors of the immunoglobulin superfamily, PECAM-1 is also able to establish heterophilic interactions with integrins, particularly with $\alpha V\beta 3$ expressed at endothelial cell–cell junctions (Figure 4).

Cadherins

Endothelial cells express both N-cadherin and VE-cadherin at their surface. Despite similar expression levels, only VE-cadherin is expressed at cell–cell junctions, whereas N-cadherin is spread over the cell membrane. In fact, whereas VE-cadherin mediates homotypic interactions resulting in endothelial cell–cell attachment, N-cadherin seems to essentially participate in the anchorage of other N-cadherin-expressing cells, such as pericytes, to the endothelium. These N-cadherin-mediated interactions may allow the formation of the cellular multilayer structure required for the elaboration of shear stress–resistant vessels. This review will focus mainly on VE-cadherin as this is the major cadherin molecule of endothelial cell junctions.

VE-cadherin belongs to the superfamily of cadherins which are Ca^{2+}-dependent cell–cell adhesion receptors. Cadherin molecules consist of five extracellular modules designated as EC1 to EC5, a single transmembrane domain, and a cytoplasmic tail (Figure 2). The major property of cadherins is to mediate, via their extracellular parts, homophilic interactions. This means that cadherin X selectively interacts with cadherin X. Based on these homophilic interactions, cells expressing identical cadherins interact together by means of homotypic interactions. In contrast, cells expressing various cadherins segregate into like groups when mixed. To generate strong cell–cell adhesion,

Ch048 8/23/05 2:04 PM Page 312

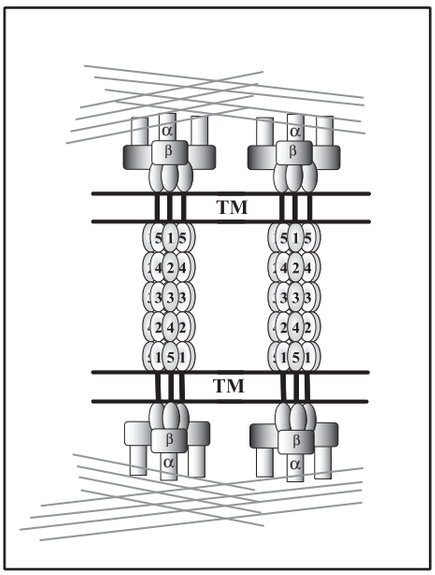


Figure 3 VE-cadherin and its intracellular partners elaborate the adherens junctions between endothelial cells. VE-cadherin molecules elaborate homophilic interactions that are able to link neighboring endothelial cells. Their extracellular domains self-associate to form a hexameric structure at the endothelium surface while their cytoplasmic tails bind proteins such as β catenin. VE-cadherin is anchored to the actin cytoskeleton (—) by the fixation of α catenin on VE-cadherin-bound β catenin.

homophilic and homotypic interactions between the cadherin ectodomains must be strengthened by intracellular interactions involving the cytoplasmic tails of cadherins. This domain exhibits two highly conserved regions: the first one, located at the C terminus of the cytoplasmic domain, binds β-catenin. The second one, close to the membrane, interacts with another catenin protein named p120. The anchorage of cadherins to the actin cytoskeleton is indispensable for the development of strong cell–cell adhesion. This connection is mediated by α-catenin, which interacts on one hand with cadherin–bound β-catenin and on the other with the actin cytoskeleton (Figure 3).

We demonstrated that VE-cadherin participates in the maintenance and restoration of the endothelium integrity. Moreover, we also proved that VE-cadherin elaborated hexameric probably antiparallel structures absolutely required for the elaboration of stable endothelial adherens junctions [4] (Figure 3).

The existence of an unknown cadherin at the surface of T cells was discovered in 1996. Similarly to classical cadherins, this new cadherin is able to bind α, β, and γ catenins and may interact with VE-cadherin, thus facilitating the homing of T cells.

CD99

CD99 is a 32-kDa glycoprotein, discovered in 1988 and expressed at the surface of all human T cells and many other hematopoietic cell types such as platelets, neutrophils, and red blood cells. It is also found at the lateral borders of confluent monolayers of human endothelial cells similarly to PECAM-1 and VE-cadherin. CD99 shares no structural homology with any known family of proteins.

Recent studies established that CD99 is involved in the control of the transport of newly synthesized MHC class I molecules to the plasma membrane in B lymphocytes, suggesting that it may be associated with the post-Golgi trafficking machinery.

In T cells, CD99 exists under two different isoforms, 32 kDa and 28 kDa, respectively, generated by alternative splicing. The 32-kDa form corresponds to the full-length protein, whereas the 28-kDa form exhibits a deletion within its cytoplasmic domain. These two CD99 forms can elaborate homophilic associations, leading to the formation of homodimers and heterodimers. Recently, it was established that the heterodimeric form, created via the formation of a covalent disulfide bridge between the cysteines 155, is able to induce T-cell apoptosis. It can be deduced that the elaboration of these dimers modulates the fate of T cells via the transduction of a proapoptotic signal.

Analysis of the cytoplasmic tail of CD99 reveals a lysine triplet (K151K152K153) that may function as a putative binding site for ezrin/radixin/moesin. These proteins are known to link surface proteins, such as E selectin and ICAM-2, to the actin cytoskeleton.

Junctional Adhesion Molecules (JAMs)

JAMs form a new Ig-like superfamily of adhesion receptors whose first member, called JAM A, was only discovered in 1998. Since that time, three other members have been described as JAM B, C, and D [5]. (JAM D is also named as JAM 4 in the literature.) They contain two extracellular immunoglobulin-like domains, a transmembrane domain and a relatively short cytoplasmic tail (Figure 2). Although all JAMs localize at endothelial cell–cell junctions and more precisely at tight junctions, they display different cellular distributions. Thus, the expression of JAM B is restricted to some endothelial subpopulations including high endothelial venules or lymphatic cells, whereas JAM A is expressed in platelets and in endothelial and epithelial cells. Following their transfection into CHO or MDCK cells, JAM A and B molecules are specifically enriched at cell–cell contact sites at the level of tight junctions, suggesting that they are capable of promoting cell–cell adhesion. In vitro studies indicate that the extracellular part of JAM-A self-associates as a dimer and this homodimerization seems to be required for its adhesive function and the organization of the junctional endothelial structure.

JAMs are also able to mediate heterophilic interactions. For instance, although JAM C is unable to interact with JAM A, it binds firmly to JAM B. Moreover, JAMs can interact with some integrins generally expressed at the surface of leukocytes. Thus, whereas JAM-A is a ligand of the β2 integrin LFA-1, JAM-B is the counterreceptor for the leukocyte β1 integrin α4β1, and JAM C interacts with the

Ch048 8/23/05 2:04 PM Page 313

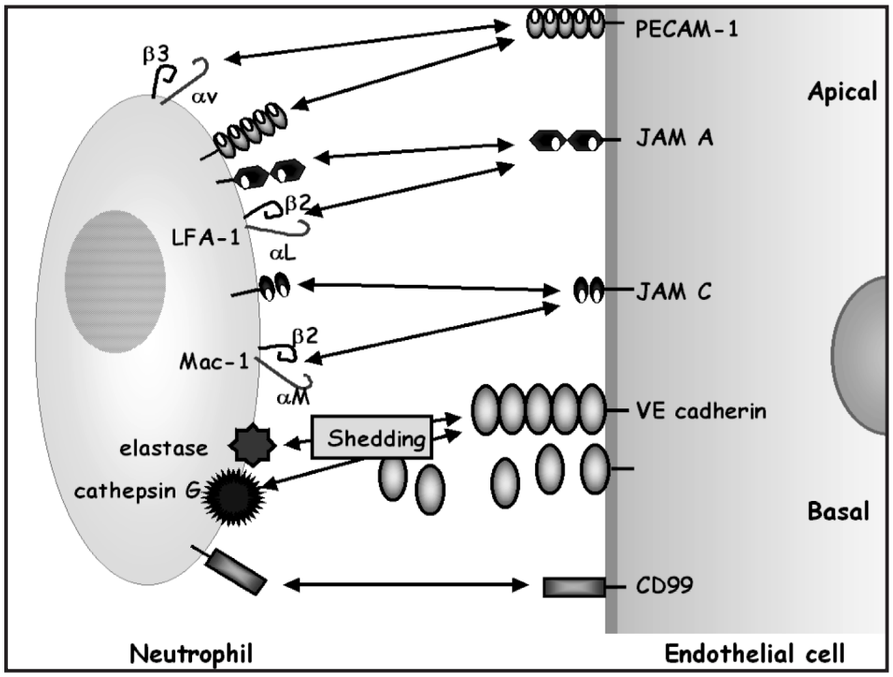


Figure 4 Adhesive interactions between endothelial cells and transmigrating neutrophils. The transmigration process involves several adhesive receptor pairs. By means of homophilic and heterophilic interactions, neutrophils progress through the endothelial junctions. The first transmigration step implicates homophilic and heterophilic PECAM-1 interactions. These homophilic interactions are elaborated between PECAM-1 molecules expressed at the surface of both endothelial cells and neutrophils, whereas the heterophilic ones involve the leukocyte integrin αVβ3. These PECAM-1 interactions are relayed by homophilic CD99-mediated interactions. Several interactions mediated by different JAMs receptors also participate in the transmigration, but their time course is still not known. When migrating neutrophils reach the adherens junctions where VE-cadherin is expressed, elastase and cathepsin G bound to the neutrophil cell surface can cleave its extracellular domain, thus opening their way through the adherens junctions.

β2 integrin Mac-1. These interactions significantly expend the repertoire of contacts between endothelial cells and leukocytes.

Mechanism of Leukocyte Diapedesis

The mechanism of leukocyte entrance into tissues requires, first, leukocyte adhesion to the endothelium and, subsequently, migration across the blood-vessel wall.

Leukocyte Adhesion

The leukocyte adhesion cascade is a sequence of adhesion and activation events that precede the extravasation of leukocytes. This multistep event is mediated by the engagement of adhesion receptors on leukocytes and their counter-receptors on endothelial cells. First, leukocytes escape from the bloodstream by capture or tethering to the endothelium. Indeed, during inflammation, endothelial cells are activated by signals emanating from inflammatory mediators such as TNFα, nitric oxide, and complement factors. Within minutes of stimulation, P- and E-selectins are expressed at the surface of endothelial cells and interact with their primary ligand PSGL-1 (P-selectin glycoprotein ligand-1), constitutively found on all leukocytes. This allows the capture of leukocytes on the surface of endothelial cells and permits neutrophil celerity to be slowed. Following a rolling phase, neutrophils are arrested on the endothelial cell surface. This adhesion step is mostly mediated by interactions involving β2-integrins on the leukocyte surface and immunoglobulins such as ICAM-1 and VCAM-1 on the endothelium. Subsequently, neutrophils migrate on the endothelial surface by amoeboid movement toward the borders of endothelial cells where transmigration occurs.

For more details on the coordinated interplay between the adhesion and signaling proteins involved in the process of firm adhesion of leukocytes on the endothelium, the reader is referred to an excellent recent review [6].

Leukocyte Transmigration

The multiple steps implicated in the transmigration process require the formation and destruction of homophilic and heterotypic interactions between receptors expressed at

the surface of leukocytes and endothelial cells. To investigate the role of each adhesion receptor described earlier, attempts were made to block transendothelial migration of leukocytes using specific antibodies.

ROLE OF PECAM-1 AND CD99

Pretreating monocytes or neutrophils with antibodies specific for PECAM-1 inhibited their emigration across endothelial cell monolayers in in vitro assays. Reciprocally, blockage of endothelial cell PECAM-1 results in an effective inhibition of leukocyte transmigration. It was also found that PECAM-1 is required for in vivo leukocyte recruitment, because antibodies against PECAM-1 were able to block the accumulation of neutrophils in the peritoneal cavity in a rat model system. This means that homophilic interactions of PECAM-1 on leukocytes with PECAM-1 on endothelial junctions are involved in transmigration. In fact, PECAM-1 is constitutively recycled along the endothelial cell borders. During the transendothelial migration process, recycling is targeted to the part of the junction across which monocytes are squeezing. Indeed, anti-PECAM-1 antibodies block the recruitment of PECAM-1 to the zones of leukocyte migration and thereby the leukocyte transmigration process.

The role of CD99 in leukocyte transendothelial migration was more recently established by a similar method using anti-CD99 antibodies. Thus, whereas anti-CD99 antibodies have no effect on monocyte adhesion, they are able to block their transmigration significantly. Inhibition of either leukocyte or endothelial cell CD99 blocked leukocyte transmigration with equal efficiency, suggesting that homophilic interactions between CD99 expressed on both monocytes and endothelial cells are required for transmigration [7]. This effect is more drastic than the inhibition induced by anti-PECAM-1 antibodies. Simultaneous use of anti-PECAM-1 and anti-CD99 antibodies completely blocks the ability of monocytes to transmigrate. This additive effect suggests that PECAM-1 and CD99 possess distinct roles in the transmigration process. In fact, leukocytes arrested by anti-PECAM-1 antibodies adhere to the apical surface of the endothelium, whereas those arrested by anti-CD99 antibodies are trapped inside the endothelial cell–cell junctions. This indicates that PECAM-1 and CD99 are differentially located along the interendothelial junction and are sequentially involved in the transmigration process. PECAM-1-mediated homotypic interactions are probably relayed by CD99-mediated ones during leukocyte migration. To date, it is difficult to ascertain whether such a sequential process can be extended to the other leukocyte subfamilies, the surface expression of CD99 of the various types of leukocytes being only partially known.

ROLE OF JAMS

Concerning the role of JAMs on the transendothelial migration of leukocytes, several antibodies directed against JAM A were described to have the capability to inhibit the transmigration of monocytes, T cells, and neutrophils in vitro and in vivo. Thus, in a model of meningitis in mice, it was demonstrated that the addition of anti-JAM A antibodies strongly reduced monocyte and neutrophil infiltration into the cerebrospinal fluid and brain parenchyma. Moreover, anti-JAM B or a soluble fragment of JAM B were also able to block chemokine-induced lymphocyte transmigration.

In fact, JAM A plays a critical role in the diapedesis of leukocytes. After stimulation of endothelial cells with both TNFα and IFNγ, JAM-A is redistributed from the junctions to the endothelial surface. Subsequently, it becomes available to interact with the activated form of the β2-integrin LFA-1 ($\beta 2\alpha L$), thus contributing to the adhesion of leukocytes on the activated endothelium. At this stage, homophilic interactions involving JAM A expressed both on leukocytes and on endothelial cells are not crucial to firm adhesion of leukocytes. This is particularly true for monocytes and neutrophils that express very low amounts of JAM A at their surfaces. The interaction of JAM A with LFA-1 contributes first to the chemokine-triggered adhesion and second to the transmigration of memory T cells, neutrophils, and lymphocytes.

The binding of endothelial JAM A to LFA-1 on leukocytes may disrupt junctional homophilic JAM A interactions, thereby unlocking interendothelial junctions. Complementary data are needed to understand the interplay between the homophilic and heterophilic JAM A–mediated interactions occurring during leukocyte transmigration.

Moreover, according to the subpopulation of leukocytes, the transmigration step involving the JAM family implicates different couples of adhesion receptors. For example, JAM B expressed at the surface of high endothelial venules interacts with JAM C of T cells and NK and dendritic cells. This molecular pair seems to play a critical role in the trafficking of T, NK, and dendritic cells into and out of high endothelial venules.

ROLE OF VE-CADHERIN

In contrast to antibodies specific for PECAM-1, JAMs, or CD99, antibodies directed against the extracellular domain of VE-cadherin increase the recruitment of leukocytes to the infection sites. In fact, the anti-VE-cadherin antibodies have the ability to disrupt the VE-cadherin homophilic interactions. This results in the formation of gaps between endothelial cells through which leukocytes can easily squeeze. In physiological conditions, alterations of VE-cadherin-mediated adhesion also occur at endothelial junctions during leukocyte transmigration. Indeed, immunofluorescence experiments reveal that VE-cadherin and α-, β-, and γ- catenins disappear from cell-to-cell contacts following adhesion of neutrophils to endothelial monolayers. This effect appears only where neutrophils firmly adhere while VE-cadherin-based complexes remain intact in areas devoid of adherent neutrophils. By contrast, PECAM-1 distribution remains unaffected.

The mechanism leading to the formation of gaps at cell–cell junctions during leukocyte transmigration is still controversial. To cast some light on this mechanism, move-

Ch048 8/23/05 2:04 PM Page 315

ments of VE-cadherin occurring during leukocyte transmigration were observed using real-time microscopy. Thus, transmigration of fluorescently labeled leukocytes was followed in real time by two-color fluorescence microscopy using HUVECs expressing endogenous VE-cadherin and a VE-cadherin protein fused with its C-terminal part to Green Fluorescent Protein (VE Cad-GFP) [8]. This study showed that transmigration occurs both through preexisting gaps and through de novo gap formation. Gap widening accommodates to the size of the transmigrating leukocyte, allowing a narrow contact between the endothelial cell and the leukocyte. The widening of the gaps seems to be accompanied by a clustering of the VE Cad-GFP molecules on the edge of the forming clefts. After transmigration, the displaced molecules diffuse back to reconstitute the junctions. This leads to a rapid resealing of the junctions within 5 minutes after leukocyte transmigration. These results were confirmed by a real-time study following the differential movements of VE-cadherin in living endothelial cells during transmigration of neutrophils with anti-VE-cadherin antibodies that do not interfere with transendothelial migration. The lateral movement of VE-cadherin was hypothesized to be a consequence of its decoupling from the cytoskeleton, probably initiated by an intracellular signal due to leukocyte adhesion to the endothelium. In both of the studies, only the movement of the cytoplasmic tail of VE-cadherin was followed in real time. It is not known whether the extracellular domain of VE-cadherin remains intact during the lateral movement.

Real-time fluorescent imaging shows that neutrophils only move laterally underneath the vascular endothelium instead of deeply into the vascular tissue. Thus, the question as to how neutrophils go across the endothelium before penetrating into the surrounding tissues remains unanswered. The curtain effect that moves VE-cadherin is necessary but not sufficient to completely support leukocyte transmigration.

The event initiating the lateral movement of VE-cadherin may correspond to the cleavage of this adhesive receptor by proteases expressed at the surface of transmigrating neutrophils. This hypothesis is based on the fact that elastase, at the surface of transmigrating neutrophils, mainly localizes to the migration front [9]. Thus, after the adhesion to the endothelial cell surface, elastase is expressed on the apical face of neutrophils, avoiding contact between proteases and the endothelial cell surface. When neutrophils reach endothelial cell–cell junctions, elastase moves from the apical face to the basal face where it comes in close proximity with junctional components. An in vivo study suggested that elastase may contribute to lung neutrophil accumulation and microvascular injury during intestinal ischemia-reperfusion (IR). Moreover, following IR, elastase and VE-cadherin fragments were found in the bronchoalveolar fluid.

Despite results obtained in vitro and in vivo, the participation of proteases in the transmigration of leukocytes is still controversial. Indeed, a study published in 2002 suggested that elastase and MMP9 are not essential for neutrophil transmigration. This assumption is based on the use of neutrophils depleted in both elastase and MMP9 that show no defect in their transmigration capacity. These results contradict our own study as we assessed that VE-cadherin is cleaved following adhesion of neutrophils to endothelial cell monolayers [10]. Using specific inhibitors of neutrophil proteases, we were able to identify elastase and cathepsin G bound to the neutrophil surface as the major proteases involved in the cleavage of VE-cadherin. Furthermore, inhibition of both membrane-bound proteases inhibited neutrophil transmigration in in vitro assays. In vivo, the surface-bound elastase and cathepsin G may cleave VE-cadherin on very restricted areas close to the sites of neutrophil adhesion. On the endothelium, the redundancy between these two proteases can explain why neutrophils still transmigrate across endothelial monolayers in the presence of specific inhibitors of elastase and also why neutrophils from elastase-deficient mice show no defect in transendothelial migration. Indeed, cathepsin G can replace elastase, thus allowing the neutrophil transmigration to occur despite elastase inhibition or deficiency.

The involvement of a paracrine mechanism in neutrophil-mediated alteration of the endothelial barrier function was suggested by Gautam and coworkers. Upon neutrophil adhesion to the endothelium, leukocyte β2-integrin signaling triggered the release of the neutrophil CAP37, a serine protease without catalytic activity that induced a cytoskeletal rearrangement and the formation of gaps in the endothelium in vitro. Alteration of the endothelium may result from the interaction between CAP37 on the surface of neutrophils and proteoglycans present at the endothelial cell surface. This interaction could stimulate endothelial cell contraction by a yet unidentified mechanism.

Conclusions

During the past 5 years, it has been established that new receptors such as JAMs and their integrin counterreceptors play major roles in leukocyte transmigration. Also, the fate of VE-cadherin during leukocyte transmigration is now better understood. In particular, it has been shown that membrane-bound neutrophil elastase and cathepsin G facilitate neutrophil transmigration by cleaving the extracellular part of VE-cadherin.

These adhesive receptors are definitely more than just a molecular glue, because it is suspected that they mediate intracellular signaling. Thus, some data from our laboratory suggest the existence of VE-cadherin-mediated signaling pathways triggered by the destabilization of cadherin junctions. This pathway leads eventually to the restoration of endothelium integrity by a neosynthesis of VE-cadherin molecules. The molecules involved in this pathway remain to be determined. Nevertheless, several elements suggest that β-catenin and possibly the Wnt signaling pathway might play a role in the restoration of endothelium integrity.

Ch048 8/23/05 2:04 PM Page 316

A better understanding of the sequential events occurring during transendothelial migration of leukocytes may lead to the discovery of new classes of target molecules for the design of novel drugs that are able to interfere with the transmigration process. Such drugs could have major applications in several important human illnesses such as polyarthritis or cancer.

Glossary

Endothelium: Monolayer of endothelial cells that line the inside of vascular tree.

Neutrophils: A subtype of white cells.

Transmigration: Cellular process allowing white cells to migrate across the endothelial barrier.

VE cadherin: Ca++-dependent adhesive receptor exclusively expressed in endothelium.

References

1. Worthylake, R. A., and Burridge, K. (2001). Leukocyte transendothelial migration orchestrating the underlying molecular machinery. *Curr. Opin. Cell Biol.* **13**, 569–577.
2. Owen, C. A., Campbell, M. A., Sannes, P. L., Boukedes, S. S., and Campbell, E. J. (1995). Cell surface-bound elastase and cathepsin G on human neutrophils: A novel, non-oxidative mechanism by which neutrophils focus and preserve catalytic activity of serine proteinases. *J. Cell. Biol.* **131**, 775–789. *This paper describes the translocation of serine proteases such as elastase and cathepsin G from azurophil granules to the cell surface after stimulation of neutrophils by chemokines. These cell surface–bound proteases are catalytically active and resistant to proteinase inhibitors.*
3. Newman, P. J. (1997). The biology of PECAM-1. *J. Clin. Invest.* **99**, 3–8.
4. Bibert, S., Jaquinod, M., Concord, E., Ebel, C., Hewat, E., Vanbelle, C., Legrand, P., Weidenhaupt, M., Vernet, T., and Gulino-Debrac, D. (2002). Synergy between extracellular modules of vascular endothelial cadherin promotes homotypic hexameric interactions. *J. Biol. Chem.* **277**, 12790–12801.
5. Muller, W. A. (2003). Leukocyte–endothelial-cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response. *Trends Immunol*. **24**, 327–334.
6. Weber, C. (2003). Novel mechanistic concepts for the control of leukocyte transmigration: Specialization of integrins, chemokines, and junctional molecules. *J. Mol. Med.* **81**, 4–19.
7. Schenkel, A. R., Mamdouh, Z., Chen, X., Liebman, R. M., and Muller, W. A. (2002). CD99 plays a major role in the migration of monocytes through endothelial junctions. *Nat. Immunol.* 143–150.
8. Shaw, S. K., Bamba, P. S., Perkins, B. N., and Luscinskas, F. W. (2001). Real-time imaging of vascular endothelial-cadherin during leukocyte transmigration across endothelium. *J. Immunol.* **167**, 2323–2330. *Using a VE-cadherin/green fluorescent protein fusion construct (VEcadGFP), Shaw et al. visualized alterations in endothelial junctional structures in real time during transmigration of human neutrophils and monocytes in an in vitro flow model. They show that migrating leukocytes appeared to push aside VEcadGFP in the plane of the junction, and this displaced material subsequently diffused back to refill the junction.*
9. Cepinskas, G., Sandig, M., and Kvietys, P. R. (1999). PAF-induced elastase-dependent neutrophil transendothelial migration is associated with the mobilization of elastase to the neutrophil surface and localization to the migrating front. *J. Cell Sci.* **112**, 1937–1945.
10. Hermant, B., Bibert, S., Concord, E., Dublet, B., Weidenhaupt, M., Vernet, T., and Gulino-Debrac D. (2003). Identification of proteases involved in the proteolysis of VE cadherin during neutrophil transmigration. *J Biol Chem* **278**, 14002–14012. *This paper established that neutrophil elastase and cathepsin G, bound at the surface of transmigrating neutrophils, are able to cleave VE-cadherin at endothelial cell–cell junctions, thus facilitating neutrophil diapedesis.*

Capsule Biography

Dr. Gulino-Debrac is a senior scientist from the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS). Since 1996 she has been in charge of a group working on VE-cadherin in Institut de Biologie Structurale Jean-Pierre Ebel (Grenoble, France). Her work is supported by grants from the CNRS, the Commissariat à l'Energie Atomique (CEA), and the Ligue contre le Cancer.

2 ANNEXE 2 : *FORMATION OF ENDOTHELIAL ADHERENS JUNCTIONS VISUALIZED IN REAL TIME*

Formation of endothelial adherens junctions visualized in real time

[1*] Claire Durmort, [1,2*] Sébastien Almagro, [1,2] Stephanie Heyraud, [1] Camille Maillefaud, [5] Didier Grunwald, [1,2] Evelyne Concord, [3] Jean Patrick Schaal, [4] Elizabeth Hewat, [2] Philippe Huber, and [1,2] Danielle Gulino-Debrac [§]

[1] Laboratoire d'Ingénierie des Macromolécules, [4] Laboratoire de Microscopie Electronique Structurale. Institut de Biologie Structurale Jean-Pierre Ebel (UMR 5075 CNRS/ CEA/ Université Joseph Fourier), 41 rue Jules Horowitz, 38027 Grenoble Cedex 01, France

[2] Laboratoire de Physiopathologie Vasculaire, [5] Plate-forme de Cytométrie et Imagerie, Institut de Recherches en Technologies et Sciences pour le Vivant – iRTSV, CEA-Grenoble

17, rue des Martyrs, 38054 Grenoble Cedex 09, France

[3] Département de Gynécologie Obstétrique, Centre Hospitalier Universitaire Michallon, BP 217, 38043 Grenoble Cedex 09, France

*: equally contribute to the work

keywords: HUVEC, VE-cadherin, actin cytoskeleton, actin polymerization, adherens junction

§ to whom correspondence should be addressed : Fax: 33 - (0)4 38 78 49 64,

E-mail: danielle.gulino@cea.fr

Abréviations utilisées: VE-Cad, fiber et non fibre

Abstract

In the vascular endothelium, adherens junctions are dynamic structures that mediate cell-cell adhesion and regulate tissue permeability. They consist essentially of an endothelial-specific cadherin, VE-cadherin. We have examined the role of the actin cytoskeleton in the formation of new adherens junctions. Endothelial cells were treated with latrunculin B to disrupt adherens junctions and visualized as the junctions reformed spontaneously upon drug removal. VE-cadherin molecules and actin-GFP filaments were observed simultaneously using dual colour time-lapse confocal microscopy. Patches of VE-cadherin are transported on the tips of filapodia. As the filapodia elongate and retract radially from the cell, the VE-cadherin patches are carried back and forth prior to be deposed at the edge of adjoining cells. Then, VE-cadherin patches dislocate into puncta that are transported along cortical actin fibers to extend the cell-cell contacts. We propose that actin filament-mediated transport of VE-cadherin provides a mechanism at the basis of adherens junction remodelling.

Vascular endothelium is a semi permeable barrier that regulates the flux of solutes and leukocyte transmigration from the blood vessel to sites of inflammation. This barrier function is mediated by adherens junctions which are multiprotein complexes composed essentially of VE-cadherin (VE-Cad), a cadherin specifically expressed in endothelial cells. VE-Cad initiates cell-cell adhesion by forming calcium-dependent homophilic interactions via its extracellular domains. It is also able, through its cytoplasmic tail, to recruit partners such as catenins (α, β, γ and p120) which in turn interact with the actin cytoskeleton [1]. These intracellular interactions between the cadherin complex and the actin cytoskeleton strengthen cell-cell adhesion thus promoting formation of mature adherens junctions.

Although there is a general agreement about the critical role played by actin in the maintenance of mature cell-cell junctions [2,3], its precise role in the elaboration of premature adherens junctions is poorly understood. Some studies indicated that cells form intercellular junctions by a dynamic process driven by actin polymerization [4]. It was proposed that this involves the production of filopodia emanating from neighbouring cells. However, the relative importance of filopodia and lamellipodia is still under controversy [5,4]. In the present study, we chose to destabilize the actin cytoskeleton in HUVEC by the actin monomer sequestering drug latrunculin B [6] to investigate the mechanism leading to the establishment of the early VE-Cad-mediated cell-cell contacts. This system constitutes a convenient method since the re-assembly of adherens junctions, after drug removal, mimics the early steps in the formation of endothelial cell-cell contacts (**Fig 1a and b**). Moreover, this method allows the reassembly of endothelial cell-cell junctions over a course of two hours, a time compatible with the fluorescence stability required for time-lapse videomicroscopy experiments. Using this latrunculin B-induced actin cytoskeleton destabilization method, we have re-examined the role played by filipodia in the elaboration of early cell-cell junctions in living endothelial cells by

confocal video-microscopy and find a remarkable correlation between the movements of VE-Cad and the dynamics of actin fiber formation.

At sub-confluency, primary cultures of Human Umbilical Vascular Endothelial Cells (HUVEC) exhibit residual randomly distributed intercellular gaps and some preliminary cell-cell contacts, characterized by VE-Cad zigzag staining **(Fig1a)**. These newly formed intercellular contacts are composed of multiple filopodium protrusions where VE-Cad perfectly co-localizes with radially oriented actin fibers (**Fig1a**). By contrast, pre-mature junctions exhibited a VE-Cad thin continuous fluorescent signal close to the circumferential actin filaments which highlighted the cell-cell junctions (**Fig1a,** continuous box).

In confluent HUVEC the actin cytoskeleton was depolymerized with latrunculin B**.** Then, using confocal videomicroscopy, we observed that HUVEC reconstruct their adherens junctions following drug removal (see **Supplementary Information, Movie 1**). The localization of actin and VE-Cad was also analyzed in detail by immunostaining at different times after the elimination of the drug (**Fig1b)**. Prior to latrunculin B treatment, the actin appeared as strong FITC-stained cortical fibers localized at the periphery of the cell close to the intense rhodamine-labelled VE-Cad linear intercellular staining (**Fig1b,** Ctl). Following a five minute latrunculin B treatment (T0), actin filaments disappeared, VE-Cad formed fluorescent patches and cell-cell junctions were disrupted. Following drug removal, actin re-polymerized and VE-Cad staining still persisted as disseminated patches for a period of 20 minutes. Then, cells developed multiple membrane filopodial protrusions containing actin cables (T40). During this time, VE-Cad started to re-organize and was located at the tips and along the totality of these newly formed actin cables. Then, immature zig-zag VE-Cad-based intercellular junctions formed (T60). At 120 min post latrunculin B treatment (T120), the actin cytoskeleton partially disengaged from VE-Cad and formed networks parallel to the cell membrane, a pattern undistinguishable from that of control cells (**Fig1b,** T120 versus Ctl**).**

To elucidate the molecular interactions involved in the reconstruction of the inter-endothelial junctions, we first established by immunofluorescence and immunoprecipitation experiments that, after actin cytoskeleton depolymerization by latrunculin B, most VE-Cad remains still associated with catenins at the plasma membrane (**Fig1c** and see **Supplementary Information, Fig. S1 and S2**). Consequently, the VE-Cad-catenin complex keeps the ability to interact with actin fibers via its intracellular partners. This assumption was verified since actin was effectively immunoprecipitated with the VE-Cad-based complex (**Fig1d**). Immediately after latrunculin B treatment, the level of actin co-immunoprecipitated with the VE-Cad-based complex decreased to 60% of that observed for untreated cells (**Fig1d**). Then, for 40 minutes after drug removal, the level of actin co-immunoprecipitated with VE-Cad exhibited a dramatic 4-fold increase**.** In fact, the length of actin filaments bound to VE-Cad complexes increased since, during the same period, the amount of immunoprecipitated VE-Cad remained constant (**Fig1d**). This most probably corresponded to the phase of filopodium growth observed in **Fig1b (T20 to T40**) (See **Supplementary Information, Movie 1)**. For post latrunculin B treatment times greater than 40 min, the amount of actin co-immunoprecipitated with VE-Cad returned to the basal level (**Fig1d**). This confirmed the partial disengagement of actin from VE-Cad when cell-cell junctions matured as shown in **Fig1b (T60 to T120)**. These results are in good agreement with the idea that the growing actin filaments in the filapodia propel the attached VE-Cad complex towards neighbouring endothelial cells to form early intercellular contacts.

The coordinated movements of actin filaments and VE-Cad molecules were then followed in real time by fluorescent microscopy. HUVEC cells were transiently transfected with the plasmid expressing actin-GFP, then pre-stained with antibodies to fluorescently label the extracellular part of VE-Cad and finally treated with latrunculin B. Although the totality of VE-Cad molecules were not labelled, it was nevertheless possible to follow the re-assembly of

cell-cell junctions after drug removal by collecting images in phase contrast and in both two-colour fluorescence channels (**See Supplementary Information, Fig. S3 and S4**). As illustrated in **Fig2a**, this method allowed us to follow, in real time, the elongation of individual filopodia by phase contrast (**Ph.Ctrst),** the linear extension of actin-GFP fibers within these filopodia (**Actin**) and, in parallel, the movements of VE-Cad molecules (**VE-cad**, see **Supplemental Information, Movie 2**). Strikingly, some VE-Cad patches moved synchronously with the tips of intrafilopodial actin fibers (**Fig2a,** empty and full arrow heads**).** This indicates that they are attached to the tips of newly forming intrafilopodial actin fibers and remain linked to them during their extension. This is intriguing because fiber tips correspond to sites of actin polymerization [7]. After being dragged over lengths reaching 15 µm and during periods of time, sometimes exceeding one hour, these patches were often deposited by the filopodia at the edge of a neighbouring cell and more particularly at the intersection of several cells (**Fig2a, t= 55 min, See supplementary Information, Movie 2, full arrow**). These observations demonstrate that an important role of filopodia is to push VE-Cad patches to the cell edges and so concentrate VE-cad there.

Filopodia not only push but they are also able to pull VE-Cad patches as illustrated in **Fig2b** (**See supplementary Information, Movie 3)**. VE-Cad patches on filapodium tips are seen to move away from and towards the centre of the cell **(Fig 2b -1, 2**, 3, full arrow heads). These to-and-fro movements for VE-Cad patches at the filopodium tips are most probably correlated with the polymerization and de-polymerization of actin in the filapodia.

Also, as shown in **Fig2b,** some of the large immunofluorescent clusters of VE-Cad eventually split into several smaller patches (**Fig2b,** empty arrow heads**)**. These patches slide along pre-formed filopodial actin fibers prior to being re-concentratied at the cell edges. Altogether, these results highlight the dynamic role played by actin polymerization/ de-polymerization within filopodia to transport VE-Cad at the cell boundary.

Confocal time-lapse microscopy was used on VE-Cad-GFP expressing HUVEC, pre-treated with latrunculin B, to observe how VE-Cad can navigate between adjoining cells using actin fiber-based filopodia as bridges (**Fig 3a**, **See supplementary Information, Movie 5)**. The relatively low cell transfection rate allowed us to observe how VE-Cad patches from transfected cells are transferred to un-transfected cells. In **Fig 3a**, transport of an individual VE-Cad-GFP patch along a filopodium to the surface of untransfected cells can be seen. After the retraction of the carrier actin fiber, the VE-Cad-GFP patch was seen to move at the surface of the untransfected cell. Then, following its capture by a cortical actin fiber, it adopted a trajectory tangential to the forming cell-cell contact before being probably inserted within. Although it is difficult to affirm whether the exchange of VE-Cad molecules between adjacent cells constitutes an essential or a subsidiary event in the construction of these adherens junctions, this observation allowed us to understand how VE-Cad patches can be inserted into nascent cell-cell contacts.

Once positioned at the cell edge under the action of filopodial actin fibers, VE-Cad patches split into puncta to constitute characteristic strings of pearls of cadherin molecules at the cell periphery. Their sliding along cortical actin fibers promoted the lateral extension of cell-cell contacts until their immobilization as illustrated in **Fig3b** (**Supplementary data, Movie M6)**. Thus, these puncta constituted the first anchor points that locally sealed membranes between adjacent cells leading to the elaboration of pre-mature cell-cell junctions.

Confocal imaging of live cells allowed us to depict the different movements of VE-Cad patches towards or along the edge of the cells. Thus, VE-Cad could move radially at the tips of elongating - retracting intrafilipodial actin fibers or run along pre-existing intrafilopodial or cortical actin fibers. To analyse the motility of the different kinds of VE-Cad patches quantitatively, we evaluated the mean rates of VE-Cad motions from individual distance plots (**Fig 4**)**.** Comparison of the trajectories of VE-Cad patches with those of filipodium tips

definitively established that VE-Cad patches remained attached at the tips of both extending and retracting filopodia **(Fig 4a-b)**. The mean rates of VE-Cad molecules transported at the tips of elongating (**Fig 4a**) or retracting filopodia (**Fig 4b**) are very similar ranging between 6 and 10 nm/ second. In contrast, patches of VE-Cad moving along the pre-formed intrafilopodial actin fibers move at 2-3 nm/s (**Fig 4c**). Similarly, VE-Cad patches moving along cortical actin fibers exhibited a rate of 2-3 nm/ s prior their splitting into puncta. These particles became less and less mobile possibly as they interacte with their partners present in the counter membrane of adjacent cells as illustrated in **Fig 4d** (**Supplementary Information, Movie 6**).

Thus, even though actin polymerization occurs in both lamellipodia and filopodia, the most mobile molecules of VE-Cad are mainly concentrated on filopodia and not at lamellipodium edges This relatively rapid reconstitution results from the fact that, after latrunculin treatment, most of VE-Cad molecules stay at the surface of endothelial cells and remain intracellularly associated with their direct catenin partners. Consequently, they are immediately available to form new cell-cell junctions (**Supplementary Information, Fig S1 and S2**).

Thus using time-lapse microscopy we have illustrated how actin cytoskeleton remodelling modifies the distribution of VE-Cad during the elaboration of early cell-cell contacts. We observed the different phases leading to the reconstitution of the interendothelial adherens junctions. As previously described for epithelial cells [4, 8-10], the first stage of the construction of adherens junction between endothelial cells involved the elaboration of filopodia. In our experiments, the growth rate of filopodia is slow compared to published values (100-170 nm/second) [11, 12]. This is probably so because in our experiments the actin polymerization must displace transmembrane VE-Cad complexes extracellularly coupled to primary and secondary antibodies. In a second stage, after resorption of filopodia, puncta are formed.

We have demonstrated that filopodia are able to transport VE-Cad patches at their tips and concentrate them at the cell edge (**Fig 2a and b**). This indicates that, underneath the filopodium membrane, the tips of intrafilopodial actin filaments are linked to either the cytoplasmic part of VE-Cad or to its intracellular partners. Presumably, this connection is supported either directly or indirectly by the formin/ VASP complex that was shown to be present at filopodium tips [13] and required for the formation and the maintenance of filopodia [14]**.** Moreover, formin were shown to be permanently associated with the barbed ends of intrafilopodial actin filaments during both their growth and retraction [15]. It is presumably the combination of the filament elongation capacity of formin [13,16] associated with the rapid actin filament bundling ability of VASP [13] that generates the strong propulsive force able to push both the filopodium membrane and the VE-Cad patches. This propulsive force was clearly observed by Romero and al. who used an *in vitro* biomimetic motility assay in which formin-coated beads were displaced under the action of actin polymerization [17].

Some patches of VE-Cad were detected moving along pre-formed actin fibers, always moving towards the tip of the fiber. Statistically, whereas the mean rates of VE-Cad movements at the tips of elongating and retracting filopodia are very similar, ranging from 6 to 10 nm / second, this kind of patch moves less rapidly with a mean rate of 2-3 mn / second (**Fig4**). This suggests the existence of one or more protein motors. One such motor must be able to carry VE-Cad patches along filopodia. Another may be involved at the filopodium tip. These protein motors probably belong to the myosin family. Among them, one potential candidate that may mediate the connection between the VE-Cad based complex and the filopodium tip might be myosin X. This unconventional myosin was described as localized at the tips of filopodia and able to transport cargoes such as the integrins involved in the formation of adhesive structures [18-20].

Occasionally, VE-Cad patches dissociate from the intrafilopodial actin fibers often during their resorption. It is remarkable that, VE-Cad patches can change their trajectories by jumping from a radial to a cortical actin fiber running along forming cell-cell junctions **(Fig 3a).** This jumping event allows endothelial cells to exchange their molecules of VE-Cad (**Fig 3a**). This is presumably facilitated by cell membrane tearing at the filopodium tips as previously described by Sherer and al [21]**.**

Filopodia are transient structures. Their formation is correlated with the amount of actin bound to the VE-Cad complex as observed in our immunoprecipitation experiments (**Fig1c)**. During their resorption, the amount of VE-Cad complex- anchored actin decreases and returns to a basal level (**Fig1c**) suggesting that a partial shrinkage and / or a dissociation of actin filaments from the VE-Cad complex occurs. In fact, this last event correlates with the formation of puncta. Once positioned at the cell edge, these VE-Cad patches can be dislocated into small puncta that move possibly along cortical actin fibers thus assisting the lateral extension of cell-cell contacts (**Fig3b**).

It is tempting to postulate that the transport of cadherin via filopodia is a universal mechanism for formation of junctions between two migrating cellular fronts. This mechanism may also be used by endothelial cells to reseal gaps formed during the transmigration of leukocytes across the endothelium [22]. Indeed, these gaps result from the movements of VE-Cad molecules probably pushed away by the squeezing forces generated by the transmigrating leukocytes. After leukocyte transmigration, the displaced molecules of VE-Cad diffuse back to refill the junctions. It is possible that this retrograde movement of VE-Cad molecules may be directed by a local polymerization of the actin.

Materials and methods

Drugs and antibodies

Fibronectin was from Boerhinger. Latrunculin B, FITC- or rhodamine- phalloidin and monoclonal antibodies against α catenin and β actin (clone AC-15) were purchased from Sigma. The monoclonal antibodies raised against the extracellular domain of human VE-Cad BV9 [23] or TEA1/31 (Immunotech) were used for Western blot analysis and immunofluorescence respectively. The polyclonal antibody anti-Cad3, elaborated against the amino acid stretch F259-K439 within the extracellular part of VE-Cad [24], was used to immunoprecipitated the junctional VE-Cad-based complex. The polyclonal antibody against the Early Endosomal Antigen 1 (EEA1) was from Affinity BioReagents while the monoclonal antibodies against β, γ catenins and p120 were from Transduction laboratories. The Cy2- or Cy3- conjugated anti-rabbit antibodies were from Jackson Immunoresearch Laboratories whereas the Cy5- conjugated- anti-mouse and - anti-rabbit antibodies were purchased from GE Healthcare (UK).

Cell culture

Human endothelial cells (HUVEC) were isolated from fresh umbilical cords and cultured on fibronectin coated plates (7µg/mL) in M199 medium (Invitrogen) supplemented with 20% Foetal Calf Serum (FCS, Biowest) and low serum growth supplement (LSGS, Cascade Biologics). Second passage cells were always used.

Cell treatments

Following treatment with 5 µM latrunculin B for 5 min, endothelial monolayers were washed with phosphate-buffered saline (PBS) and either immediately fixed (T0) or incubated in fresh medium for periods of time varying from 0 to 120 min.

For quantifying the total and the intracellular pools of VE-Cad, confluent endothelial cell monolayers were first treated or not with latrunculin B for 5 min. Then cells were incubated with PBS (total cell protein fraction) or with trypsin-EDTA 0.5 g/L in PBS (intracellular cell protein fraction) for 2 min. Monolayers were scrapped and centrifuged at 15 000 g for 5 min. Pellets were immediately re-suspended in boiling cell lysis buffer and submitted to Western blot analysis.

Actin-GFP plasmid and transfection

The vectors encoding actin-GFP and VE-Cad-GFP were kindly provided by Henderson A.J. [25] and D. Riveline [26] respectively. Sub-confluent HUVEC, seeded on glass coverslips, were transiently transfected using 1.5 µg of DNA and polyethylenimine (PEI, Sigma-Aldrich) at a 200 nM final concentration.

Immunofluorescence labelling of HUVEC after fixation

After treatment, cells were fixed for 20 min with 3% paraformaldehyde, permeabilized using 0.5% Triton X-100 for 3 min and blocked with 0.5% BSA in PBS. Cells were incubated with primary antibodies for 1h and subsequently incubated with FITC- or rhodamine-phalloidin and either Cy2-or TRITC-labelled goat-anti-rabbit antibody or either TRITC- or Cy5-labelled goat-anti-mouse antibody (Amersham Biosciences). After mounting the coverslips onto slides with DAPI-containing mowiol 40-88 (Aldrich), images were acquired with an Axioplan 2 microscope (Zeiss) and an AxioCam MR camera using Axiovision software.

Immunofluorescent labelling of living HUVEC

Living HUVEC were pre-labelled with the not disruptive anti-VE-Cad monoclonal antibody TEA (1/1000) during 30 min, rinsed in PBS at 37°C prior to be incubated with the

Cy2- or Cy5-conjugated anti-mouse antibody during 45 min. After two washings in PBS, pre-labelled cells were incubated in fresh medium for periods of time varying from 0 to 120 min before fixation in cold methanol (85%)/15 mM PIPES (15%) buffer containing 2 mM MgCl2.

Time lapse confocal microscopy

Cells were seeded on Lab-Tek I chambers (Nunc, Rochester, NY). Following the VE-cad pre-labelling step, cells were treated with 2 µM latrunculin B during 3 min. To diminish fluorescence background, cells were incubated in fresh medium 199 deprived of phenol red (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) supplemented with LSGS, FCS and antibiotics. Images were collected using a Zeiss LSM510 confocal microscope equipped of a × 63 PlanApochromat objective (oil, 1.45 NA) or a × 40 Planneofluar objective (oil, 1.30 NA) (Photonic microscopy/ Cellular Imaging platform of Institut Albert Bonniot, Grenoble, France). Time between images varies from 45 s to 150 s to improve the quality of the images. Each image is always an average of 4 acquisitions. GFP, Cy5 and phase contrast images were always co-acquired in order to reduce the delay between frames. Cells were imaged over a period of 50- 120 min at 37°C.

Particle velocity measurements

Positions of the particles were determined using the Pointpicker plugin in ImageJ software. Then, distance plots were generated by analyzing 10 filopodia from 8 different endothelial cells. The distal extent of a filopodium (tip) was estimated using the GFP-actin fluorescence channel. Patches of VE-cadherin were tracked by estimating the centre of the fluorescent spot in red channel. Curves are representative of multiple experiments performed on HUVEC extracted from different umbilical cords. Accurate kymographs could not be obtained due to the extensive relocation of cells during drug recovery.

Image processing

Each time lapse confocal image corresponds to the projection of nine 200 nm optical sections after having verified that co-localization between VE-cad and actin filaments is effective. Images were cropped with ImageJ. Brightness, contrast, movie montage, arrow animation and movie exporting were realized with Adobe After Effects 6.5. Brightness and contrast for images obtained on fixed cells were adjusted using Adobe Photoshop CS 2. Figure montages were assembled with Adobe Illustrator CS 2.

Immunoprecipitation

Following exposure to latrunculin B , endothelial cell monolayers were washed with PBS and lysed in 1ml of extraction buffer (10 mM Pipes pH 7.7, 100 mM NaCl, 300 mM sucrose, 3 mM $MgCl_2$, 0.5% NP40, 2 mM PMSF, 5 mg/mL leupeptin, 2 mg/mL aprotinin, 1 mM EDTA and 1 mM ortho-vanadate) for 20 min at 4°C [27]. Cell lysates were collected and centrifuged at 15 000g for 10 min at 4°C. NP-40 soluble fractions were incubated overnight at 4°C under continuous mixing with 100 µL protein-A sepharose (Sigma) pre-treated with 60 µg anti-Cad3 for 2h at 4°C. Sepharose beads were washed 3 times with the extraction buffer and once with PBS then boiled in 50 µL 2X Laemmli buffer to elute the immunoprecipitated proteins.

Western blot analysis

Proteins from immunoprecipitates or from total cell extracts were separated by SDS-PAGE under reducing conditions and electro-transferred onto a pure nitrocellulose membrane (BioRad). After blocking with 5% non-fat dry milk, proteins were detected by specific primary antibodies as specified followed by horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse or goat anti-rabbit immunoglobulins (Sigma). The immunoreactive bands were revealed using ECL western blot detection kit (Amersham). The signal was recorded onto autoradiography films

(Amersham) and quantified using a Gel Doc EQ apparatus with the “Quantity One” software (BioRad).

Acknowledgments :

We are indebted to staff of the maternity hospital from Hôpital Nord (Grenoble, France) for kindly collecting umbilical cords for these experiments. This work was supported by grants N° 4447 and 3775 from the Association pour la Recherche sur le Cancer and from la Ligue régionale contre le cancer (73). S. H. is a recipient of a fellowship from Association de Recherche sur la Polyarthrite (ARP). The Plate-form 'Optical microscopy - cell imaging' and the Institute Albert Bonniot are acknowledged for granting access to the confocal and 2P microscopy facilities, help in image acquisition and analysis.

Author contributions

S.A. conceived, performed and interpreted data from experiments shown in figures 2, 3, 4, S3, S4 and all movies; C.D. conceived, performed and interpreted data from experiments shown in figure 1, S1 and S2; S.H. helped in cell culture and transfection; C.M. performed experiments shown in figures S3 and S4; D.G helps in co-localization analysis; J.P.S. provides human umbilical cords; E.C., P.H. and E,H. help in biochemistry and article writing respectively; D.G.D. conceived experiments, interpret data and wrote the article.

Figure legends

Fig 1: Formation of premature interendothelial adherens junctions in HUVEC

Panel a: Localization of actin and VE-Cad in sub-confluent endothelial cells

Following fixation with cold methanol, sub-confluent HUVEC were double labelled for VE-Cad and actin. Merging are seen at the right. VE-Cad and actin were respectively detected with both the polyclonal antibody anti-Cad3 and Cy3-labelled goat-anti-rabbit antibody and FITC-labelled phalloidin. In each panel, nuclei were stained with DAPI (blue). Selected enlargements of the images are shown below. Arrows indicate some radial actin fibers where VE-Cad colocalized. The plain framed area corresponded to pre-mature cell-cell junctions characterized by a circumferential actin fiber orientation. Bar, 20 µm.

Panel b: Localization of actin and VE-Cad during cell-cell junction reassembly

HUVEC monolayers were treated or not (Ctl.) with 5 µM latrunculin B and then incubated on fresh medium for the times indicated (T0 = 0 min; T40= 40 min; T60 = 60 min and T120 = 120 min post latrunculin B treatment) before fixation with paraformaldehyde. To analyze cell-cell junction reassembly, VE-Cad (top) was stained with anti-Cad3 and Cy3-labelled goat-anti-rabbit antibody, actin (middle) with FITC-phalloidin and nuclei with DAPI (blue, merge / bottom). Bar, 20 µm.

Panel c: Localization of β catenin during junction reassembly

HUVEC were treated or not (Ctl.) with 5 µM latrunculin B and fixed at different times following the latrunculin B removal as indicated (T0 = 0 min; T40= 40 min; T60 = 60 min and T120 = 120 min post latrunculin B treatment). VE-Cad and β catenin were detected by immunofluorescence with the polyclonal anti-VE-Cad anti-Cad3 and the monoclonal anti-β catenin antibodies and with the Cy5-labelled goat-anti-rabbit and the Cy3-labelled goat-anti-

mouse antibodies. This experiment showed that during the reconstruction of adherens junctions, VE-Cad and β-catenin are perfectly co-localized. Bar, 20 µm.

Panel d: Quantification of the amounts of actin bound to the VE-Cad complex during the cell-cell junction reassembly

5 µM latrunculin B- treated or untreated (Ctl.) HUVEC were incubated on fresh medium for the indicated times (0, 20, 40, 60 and 120 min) post latrunculin B treatment before lysis. Afterwards, the VE-Cad-based complex was isolated by immunoprecipitation with the polyclonal anti-VE-Cad anti-Cad3 [24]. Following SDS PAGE and electro-transfer onto a nitrocellulose membrane of equal amounts of immunoprecipitates, actin connected to VE-Cad-based complex was detected using a specific antibody. **Lower:** representative Western blots; **Upper**: quantification of the corresponding immunoreactive bands (n=3 ± standard error). Values were expressed as percentage of control cells after normalization to VE-Cad.

Fig 2: Pushing/pulling of VE-Cad by actin fibers

Panel a: VE-Cad patch pushing by extending intrafilopodial actin fibers

Prior to latrunculin B treatment, cells were transiently transfected with the plasmid expressing actin-GFP and VE-Cad was successively labelled with the monoclonal anti-VE-Cad antibody TEA and then with the Cy5-conjugated anti-mouse antibody. Double labelled living cells were then treated with latrunculin B. After drug removal, confocal videomicroscopy was used to image the simultaneous movements of actin filaments and VE-Cad molecules. Time-lapse images corresponding to phase contrast (**Ph. Ctrst**), Cy5-labelled VE-Cad (**VE-Cad**), actin-GFP (**Actin**), Cy5-labelled VE-Cad and actin-GFP merging (**Actin+ VE-cad**), Cy5-labelled VE-Cad and phase contrast merging (**Ph. Ctrst+ VE-Cad**) are shown at different periods of time after latrunculin B removal as indicated. Full arrow heads point out the tip of an

elongating actin-GFP fiber polymerizing inside a filopodium. Empty arrow heads indicate an individual patch of Cy5-labelled VE-Cad that synchronously moves at the filopodium tip. 55 min after the drug removal, the filopodium deposits the VE-cadherin patch at the boundary of three cells as pointed out by arrows and dotted lines that delimitate the edges of the three adjoining cells. Scale bar represents 20 µm. The corresponding movie designated as M2 is available in **Supplementary Information**.

Panel b: VE-Cad patch pulling by retracting intrafilopodial actin fibers

HUVEC were labelled and treated as previously described in **Fig 2a**. Time-lapse images corresponding to Cy5-labelled VE-Cad (**VE-Cad**), actin-GFP (**Actin**), Cy5-labelled VE-Cad and actin-GFP merging (**Actin+VE-Cad**) are shown at different periods of time after latrunculin B removal as indicated. Full arrow heads point out a retracting actin fiber that drags at its tip a VE-Cad patch. On the same actin-GFP–expressing cell, empty arrow heads follow a large cluster of VE-Cad (time: 11 min) that partially dislocates into patches that constitute a string of moving VE-Cad pearls (time: 19 min). Then they re-concentrate at the cell edge (time 28 min) before being dragged along a forming protrusion (time 36 min). Dotted lines delimitate the edges of the adjoining cells. Scale bar represents 20 µm. The corresponding movie designated as M3 is available in Supplementary Information.

Fig 3: Modes of VE-Cad recruitment at pre-mature cell-cell junctions

Panel a: Exchange of VE-Cad patches between adjoining endothelial cells

Cells were transiently transfected with the plasmid expressing VE-Cad-GFP prior latrunculin B treatment. Following the drug removal, confocal videomicroscopy was used to image phase contrast (**Ph. Ctrst**), VE-Cad-GFP (**VE-Cad**) and merging (**Ph. Ctrst+ VE-Cad**) at different periods of time after latrunculin B removal as indicated. An intercellular junction was forming

between a single VE-Cad-GFP expressing cell (coloured in red to facilitate visualization) and an untransfected one. 3 min after the drug removal, a VE-Cad-GFP patch (full arrow head) dragged by an actin fiber issued from the transfected cell (empty arrow head), appears at the surface of the adjoining untransfected cell. At 14 min post drug removal time, this VE-Cad-GFP patch detached from the carrier actin fiber. At 71 min post drug removal time, this VE-Cad-GFP patch was re-captured by a cortical actin fiber belonging to the untransfected cell (full arrow). Once attached to this actin fiber, the VE-Cad-GFP patch adopted a tangential trajectory. Scale bar represents 20 µm. The corresponding movie designated as **M5** is available in **Supplementary Information**.

Panel b: Radial and lateral movements of VE-Cad patches during the formation of premature junctions

HUVEC were treated as described in **Fig 2a**. Time-lapse images corresponding to actin-GFP (**Actin**), Cy5-labelled VE-Cad (**VE-Cad**), Cy5-labelled VE-Cad and actin-GFP merging (**Actin+VE-Cad**) are shown at different periods of time after latrunculin B removal as indicated. Among the three cells visualized in this figure, only two expressed actin-GFP. Consequently, due to the colour contrast, the forming cell-cell contacts can be clearly distinguished. The arrow heads point out several individual patches of Cy5-labelled VE-Cad that progressively moves towards the forming cell-cell contacts, split into puncta before aligning along them. Scale bar represents 20 µm. The corresponding movie designated as **M6** is available in Supplementary Information.

Fig 4: Distance plots showing the movements of several selected VE-Cad patches (▲) compared to those of the corresponding filopodium tips (■)

This figure compares the relative movements of filopodium tips to those of VE-Cad patches attached to them. The extending (a) and the retracting (b) filopodia grow at a rate of 7 and 10 $nm.s^{-1}$ respectively. Due to the lack of fluorescence intensity at actin fiber tips, their positions are not accurately defined and shifts are observed between the distance plots of VE-Cad patch and filopodium tip in panels (a) and (b). **Panels c and d** corresponded to individual patches of VE-Cad moving along intrafilopodia and cortical actin fibers respectively both at a speed rate ranging 2-3 $nm.s^{-1}$. Time zero corresponded to the latrunculin B removal. Dotted line in **panel d** illustrated how an individual patch moved before being stabilized at cell-cell contact points.

Supplementary information

Fig S1: Maintenance of the association of VE-Cad with α–, β–, γ-catenins and p120 after latrunculin B treatment

After the arrest of latrunculin B treatment (5 µM), HUVEC were incubated on fresh medium for various periods of time (1 = untreated cells; 2 = 0 min; 3 = 20 min; 4= 40 min; 5 = 60 min and 6 = 120 min post latrunculin B treatment) before cell lysis. Then, the VE-Cad-based complex was isolated by immunoprecipitation using the polyclonal anti-VE-Cad antibody anti-Cad3. Following SDS PAGE and electro-transfer on nitrocellulose membrane of equal amounts of immunoprecipitates, VE-Cad, α–, β– and γ– catenins or p120 were detected with specific antibodies. Quantification of the amounts of the immunoprecipitated proteins was obtained as described in materials and methods. Lower: representative western blots; Upper: quantification of the corresponding immunoreactive bands (n = 4 ± standard error). For each immunoprecipitated protein, values were expressed as percentage of control cells (Lane 1). This figure indicated that, following latrunculin B treatment, VE-Cad remains still associated with catenins and p120. The graphs are representative of four different experiments.

Fig S2: Maintenance of VE-Cad at the plasma membrane after latrunculin B treatment

HUVEC monolayers were treated with 5 µM latrunculin B or not (Ctl.) and then incubated on fresh medium for indicated times (0, 5 and 20 min post latrunculin B treatment). To determine whether VE-Cad internalization took place subsequently to latrunculin B treatment, HUVECs were trypsinized prior to be lysed. This trypsinization treatment was used to remove cell surface-expressed proteins while leaving intact internalized ones. Practically, cells were incubated or not with trypsin for 2 min and cell lysates were submitted to SDS PAGE and immunoblotted with either the VE-Cad monoclonal antibody BV-9 or γ catenin antibodies (**Lower)**. Quantification of the total amount (T: total) or the intracellular pool (IC: intracellular) of VE-Cad was obtained from the density of the immunoreactive bands after normalization to γ catenin (n = 3 ± standard error) (**Upper)**. These experiments revealed that, in untreated control cells, the amount of intracellular VE-Cad was estimated to 15% of the total VE-Cad pool indicating that this protein was mainly located at the plasma membrane (**Ctl.)** Immediately after latrunculin B treatment (T0) and at different times after the removal of the drug (T5-T20), the total amount of VE-Cad remained nearly unchanged but, in parallel, the intracellular pool increased from 15% to 38% of the total. It could be concluded that, after actin cytoskeleton depolymerization, only 22% of the initial pool of VE-Cad were internalized.

Fig S3: Expression of actin-GFP in living HUVEC

Living HUVEC were transiently transfected with the plasmid expressing actin-GFP. 24 h later, cells were fixed and labelled with rhodamine-conjugated phalloidin. Actin-GFP expressing cells were clearly distinguishable from not transfected ones. Selective enlargements of the images are seen below. They revealed that the fluorescence of actin-GFP and rhodamine-labelled phalloidin generally overlapped. But a few phalloidin-stained actin filaments did not exhibit GFP signal (arrow heads). Bar, 20 µm.

Fig S4: Extracellular labelling of VE-Cad on living HUVEC did not impede the re-construction of cell-cell junctions

VE-Cad expressed at the surface of living HUVEC monolayers was successively pre-labelled with the monoclonal anti-VE-Cad antibody TEA during 30 min and then with the Cy2-conjugated anti-mouse antibody during 45 min. After a washing step to remove excess of antibodies, cells were treated with 2 µM latrunculin B during 3 min. Cells were then fixed at 30 min (column 2) and 90 min (column 3) after the removal of the drug. Nuclei were then labelled with DAPI and actin with rhodamine-conjugated phalloidin. In control, living cells were fixed prior to latrunculin B treatment (Ctl). At the right, panels which corresponded to enlargements of boxed areas exhibited patches of VE-Cad present on phalloidin-stained actin filament protrusions as pointed out by arrows. Arrow heads indicated newly elaborated cell-cell junctions. Bars, 20 µm. This experiment established that labelling of VE-Cad on its extracellular part at the surface of living HUVEC did not hinder the reconstruction of cell-cell junctions after latrunculin B removal (90 min postdrug removal time).

Supplementary movie legends

Movie 1: Restoration of HUVEC monolayer integrity after latruncullin B treatment

This phase contrast movie shows several adjoining cells within an HUVEC confluent monolayer pre-treated with latruncullin B. Each cell is differentially coloured to clearly delimitate cell edge at the beginning and the end of the movie. The images were acquired during a period extending from 3 min to 1h 29 min after the drug removal. Note that cells emit a lot of filopodia and spread until they touch and anchored to each others.

Movie 2: VE-Cad patch pushing by extending intrafilopodial actin fibers

The same images are presented in **Fig 2a**.

Movie 3: VE-Cad patch pulling by retracting intrafilopodial actin fibers

The same images are presented in **Fig 2b**.

Movie 5: VE-Cad patch swapping

The same images are presented in **Fig 3a.**

Movie 6: VE-Cad recruitment to a forming cell-cell junction

The same images are presented in **Fig 3b**.

References (26 references)

1. Lampugnani, M.G. & Dejana, E. Interendothelial junctions: structure, signalling and functional roles. *Curr Opin Cell Biol* **9**, 674-82 (1997).
2. Waschke, J., Curry, F.E., Adamson, R.H. & Drenckhahn, D. Regulation of actin dynamics is critical for endothelial barrier functions. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **288**, H1296-305 (2005).
3. Mege, R.M., Gavard, J. & Lambert, M. Regulation of cell-cell junctions by the cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol* **18**, 541-8 (2006).
4. Vasioukhin, V., Bauer, C., Yin, M. & Fuchs, E. Directed actin polymerization is the driving force for epithelial cell-cell adhesion. *Cell* **100**, 209-19 (2000).
5. Ehrlich, J.S., Hansen, M.D. & Nelson, W.J. Spatio-temporal regulation of Rac1 localization and lamellipodia dynamics during epithelial cell-cell adhesion. *Dev Cell* **3**, 259-70 (2002).
6. Coue, M., Brenner, S.L., Spector, I. & Korn, E.D. Inhibition of actin polymerization by latrunculin A. *FEBS Lett* **213**, 316-8 (1987).
7. Maly, I.V. & Borisy, G.G. Self-organization of a propulsive actin network as an evolutionary process. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 11324-9 (2001).
8. Adams, C.L., Nelson, W.J. & Smith, S.J. Quantitative analysis of cadherin-catenin-actin reorganization during development of cell-cell adhesion. *J Cell Biol* **135**, 1899-911. (1996).
9. Adams, C.L. & Nelson, W.J. Cytomechanics of cadherin-mediated cell-cell adhesion. *Curr Opin Cell Biol* **10**, 572-7. (1998).
10. Adams, C.L., Chen, Y.T., Smith, S.J. & Nelson, W.J. Mechanisms of epithelial cell-cell adhesion and cell compaction revealed by high-resolution tracking of E-cadherin-green fluorescent protein. *J Cell Biol* **142**, 1105-19. (1998).
11. Mogilner, A. & Rubinstein, B. The physics of filopodial protrusion. *Biophys J* **89**, 782-95 (2005).
12. Wood, W. & Martin, P. Structures in focus--filopodia. *Int J Biochem Cell Biol* **34**, 726-30 (2002).
13. Schirenbeck, A. et al. The bundling activity of vasodilator-stimulated phosphoprotein is required for filopodium formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 7694-9 (2006).
14. Schirenbeck, A., Bretschneider, T., Arasada, R., Schleicher, M. & Faix, J. The Diaphanous-related formin dDia2 is required for the formation and maintenance of filopodia. *Nat Cell Biol* **7**, 619-25 (2005).
15. Schirenbeck, A., Arasada, R., Bretschneider, T., Schleicher, M. & Faix, J. Formins and VASPs may co-operate in the formation of filopodia. *Biochem Soc Trans* **33**, 1256-9 (2005).
16. Kobielak, A., Pasolli, H.A. & Fuchs, E. Mammalian formin-1 participates in adherens junctions and polymerization of linear actin cables. *Nat Cell Biol* **6**, 21-30 (2004).
17. Romero, S. et al. Formin Is a Processive Motor that Requires Profilin to Accelerate Actin Assembly and Associated ATP Hydrolysis. *Cell* **119**, 419-429 (2004).
18. Zhang, H. et al. Myosin-X provides a motor-based link between integrins and the cytoskeleton. *Nat Cell Biol* **6**, 523-31 (2004).
19. Bohil, A.B., Robertson, B.W. & Cheney, R.E. Myosin-X is a molecular motor that functions in filopodia formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 12411-6 (2006).
20. Berg, J.S. & Cheney, R.E. Myosin-X is an unconventional myosin that undergoes intrafilopodial motility. *Nat Cell Biol* **4**, 246-50 (2002).
21. Sherer, N.M. et al. Retroviruses can establish filopodial bridges for efficient cell-to-cell transmission. *Nat Cell Biol* **9**, 310-5 (2007).

22. Shaw, S.K., Bamba, P.S., Perkins, B.N. & Luscinskas, F.W. Real-time imaging of vascular endothelial-cadherin during leukocyte transmigration across endothelium. *J Immunol* **167**, 2323-30. (2001).
23. Breviario, F. et al. Functional properties of human vascular endothelial cadherin (7B4/cadherin-5), an endothelium-specific cadherin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **15**, 1229-39 (1995).
24. Hermant, B. et al. Identification of proteases involved in the proteolysis of vascular endothelium cadherin during neutrophil transmigration. *J Biol Chem* **278**, 14002-12 (2003).
25. Hodgson, L., Qiu, W., Dong, C. & Henderson, A.J. Use of green fluorescent protein-conjugated beta-actin as a novel molecular marker for in vitro tumor cell chemotaxis assay. *Biotechnol Prog* **16**, 1106-14 (2000).
26. Delanoe-Ayari, H., Al Kurdi, R., Vallade, M., Gulino-Debrac, D. & Riveline, D. Membrane and acto-myosin tension promote clustering of adhesion proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2004).
27. Iyer, S., Ferreri, D.M., DeCocco, N.C., Minnear, F.L. & Vincent, P.A. VE-cadherin-p120 interaction is required for maintenance of endothelial barrier function. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **286**, L1143-53 (2004).

Fig 1a

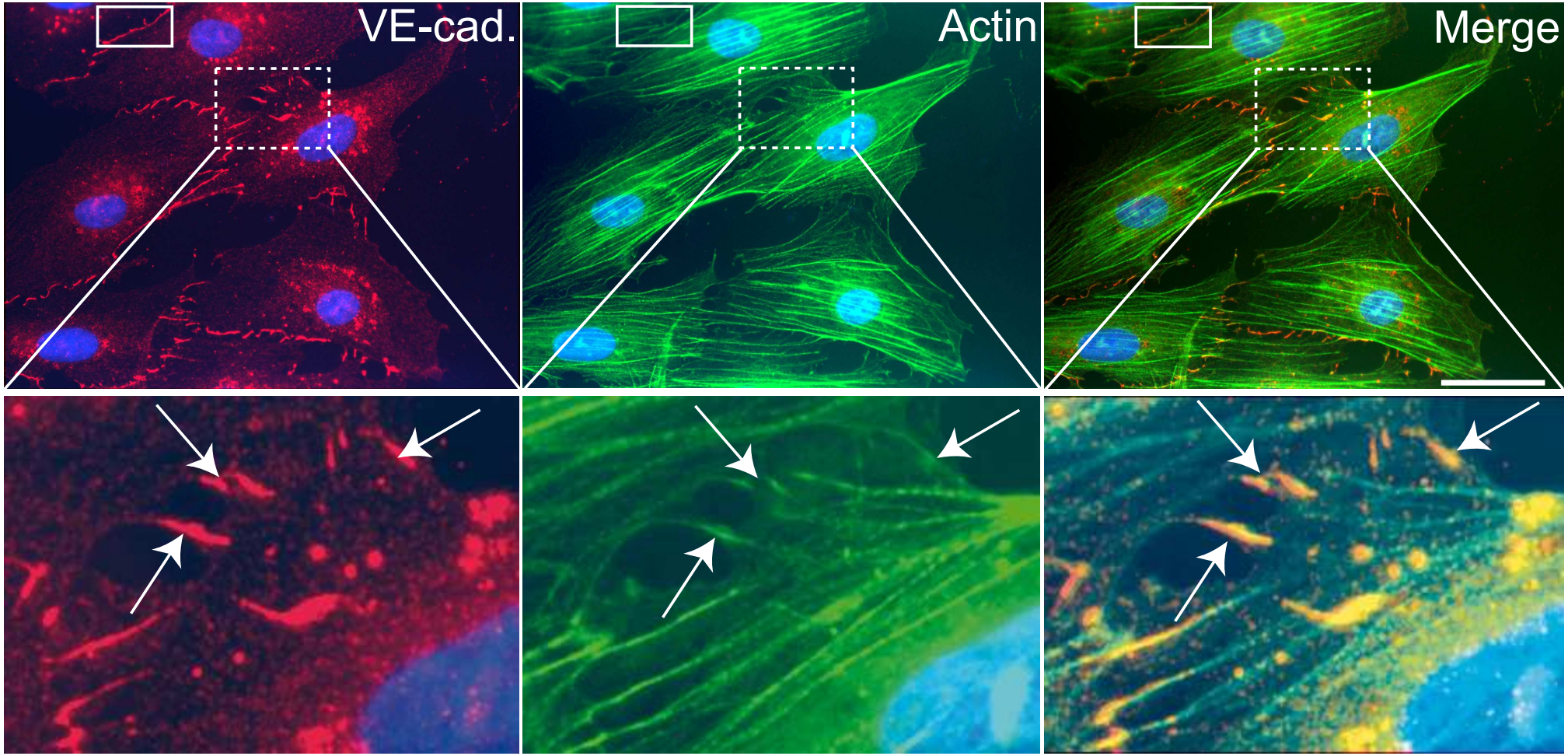


Fig 1b

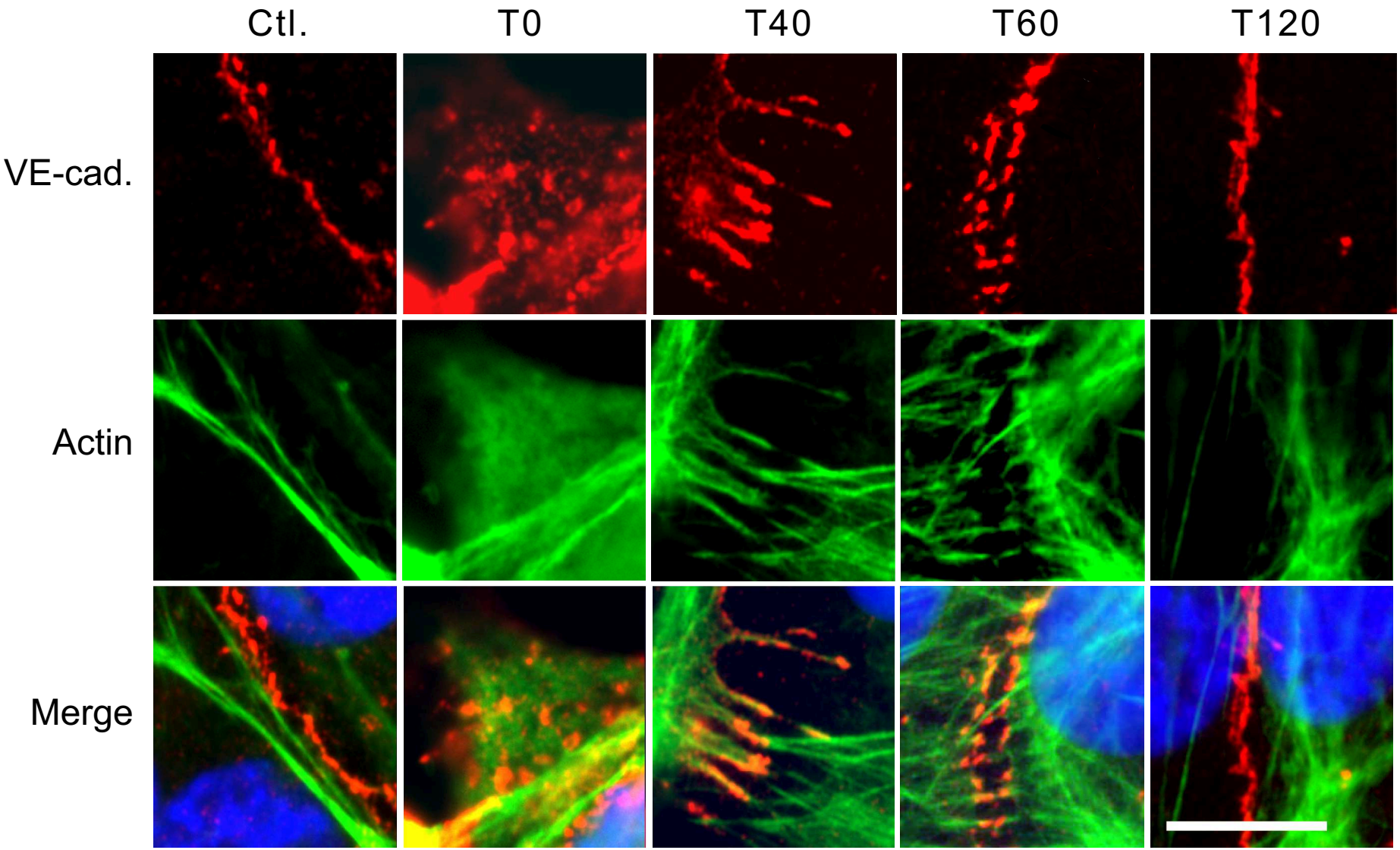


Fig 1c

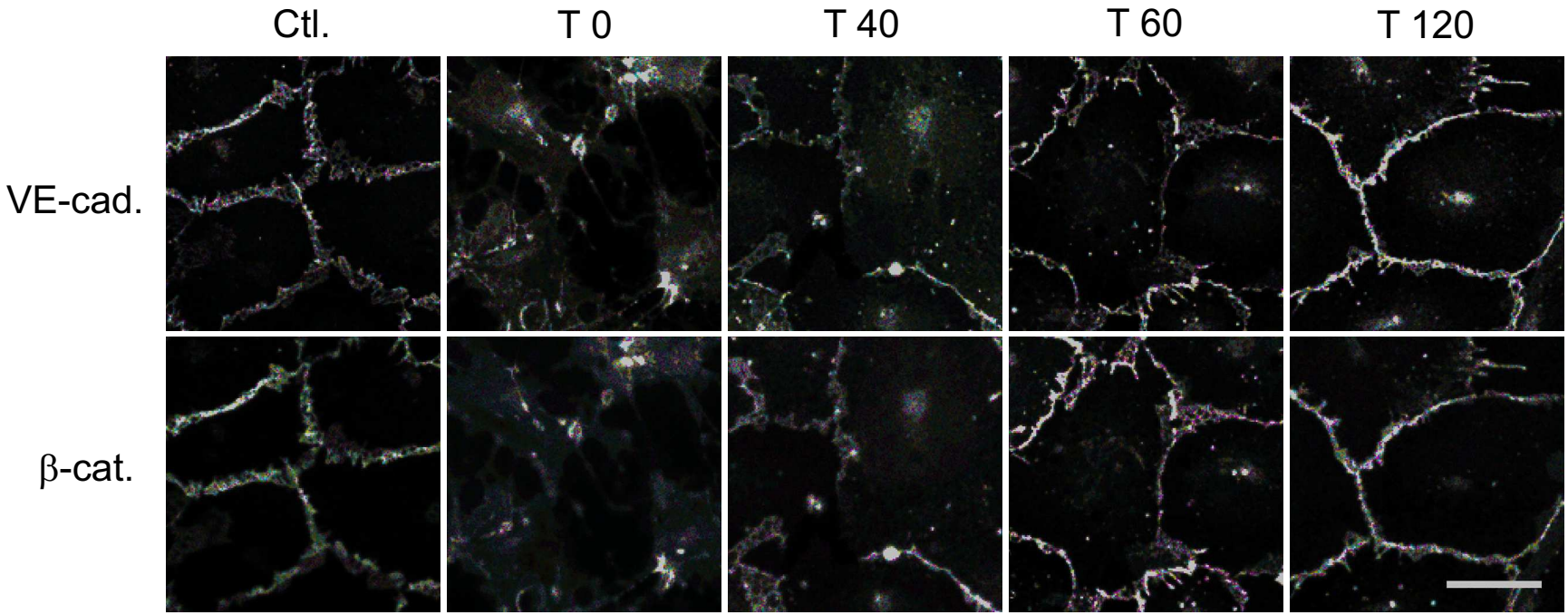


Fig 1d

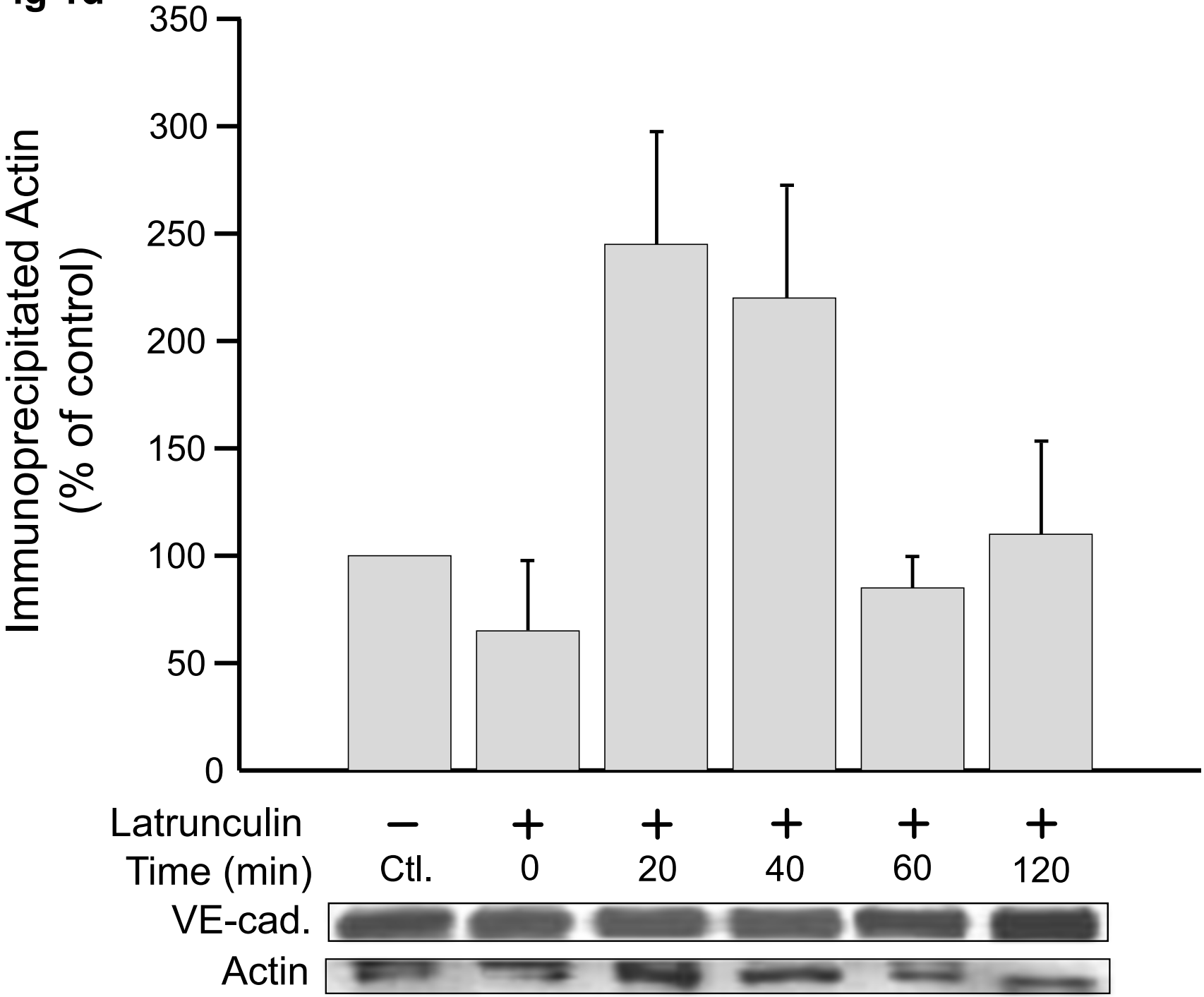

Immunoprecipitated Actin
(% of control)
350
300
250
200
150
100
50
0
Latrunculin
−
+
+
+
+
+
Time (min)
Ctl.
0
20
40
60
120
VE-cad.
Actin

Fig 2a:

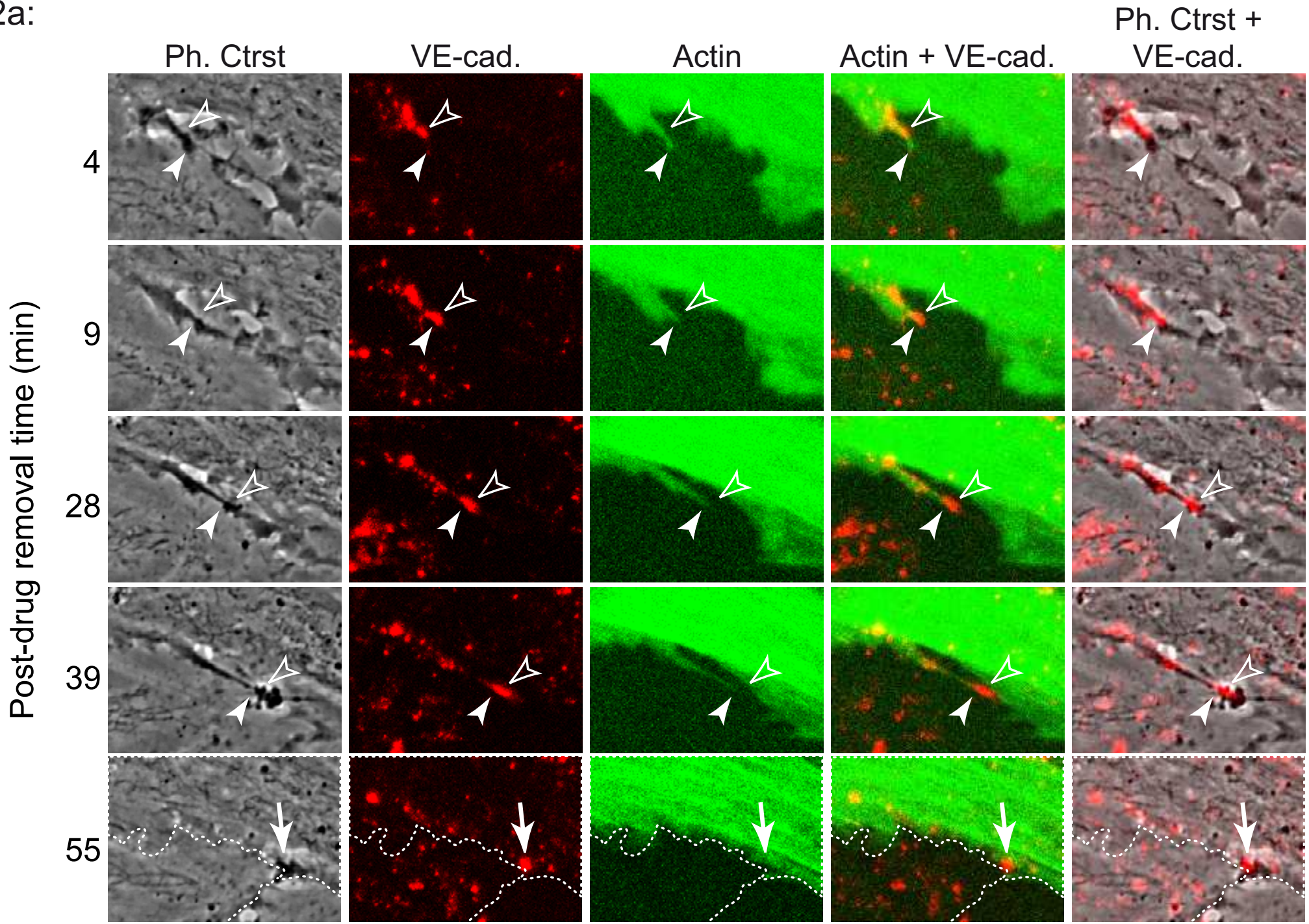

Ph. Ctrst
VE-cad.
Actin
Actin + VE-cad.
Ph. Ctrst + VE-cad.
Post-drug removal time (min)
4
9
28
39
55

Fig 2b:

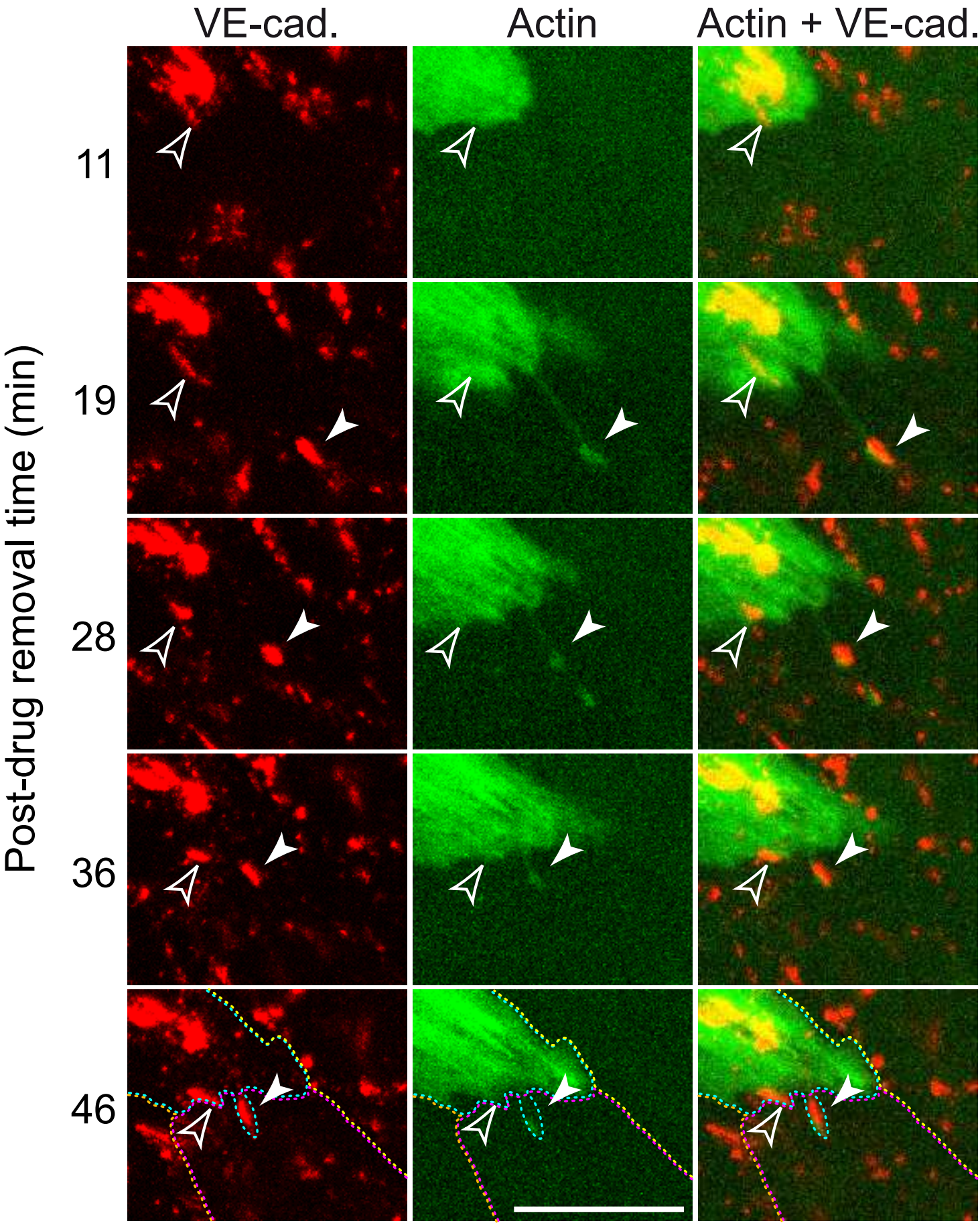

VE-cad.
Actin
Actin + VE-cad.
Post-drug removal time (min)
11
19
28
36
46

Fig 3a:

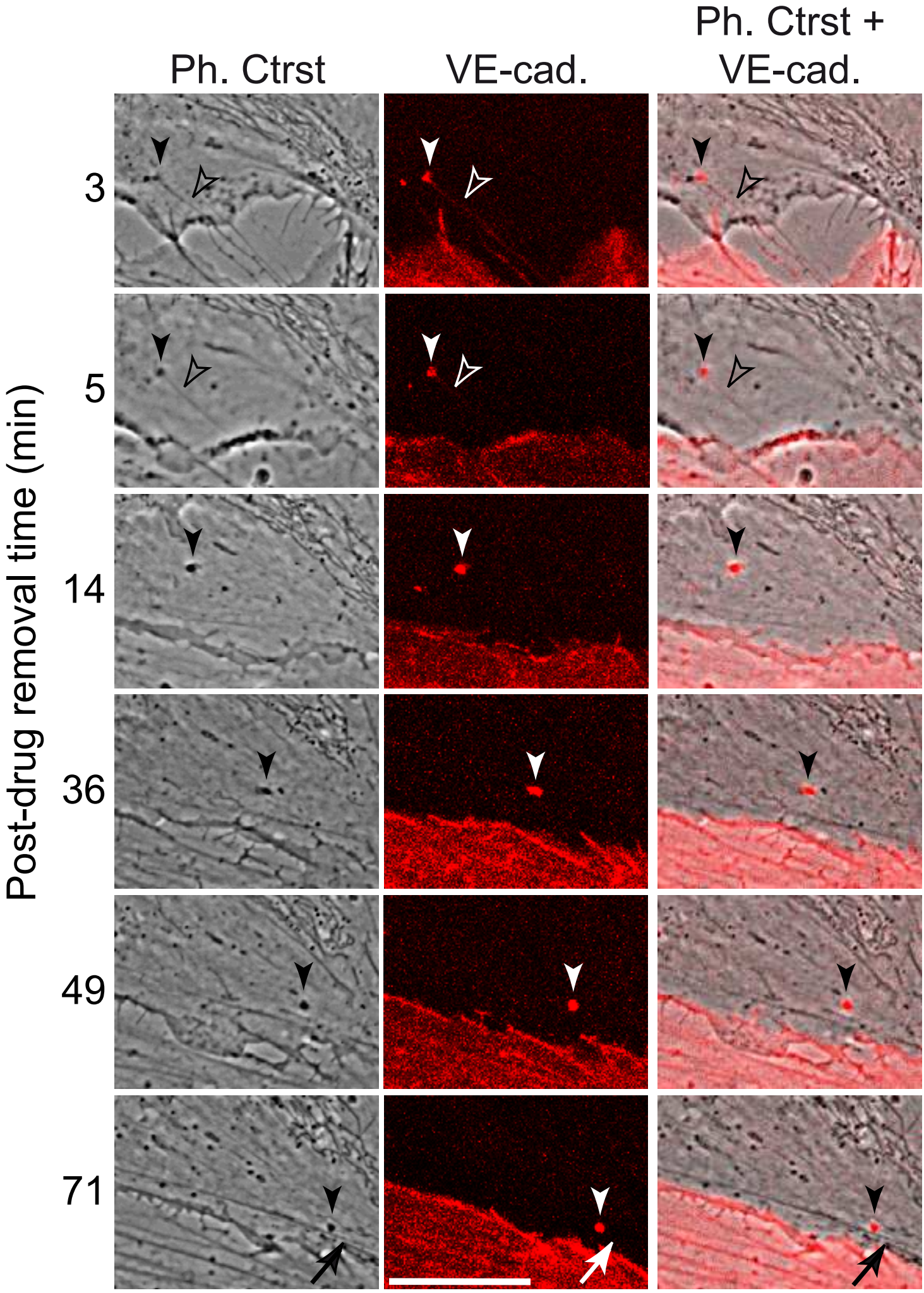

Ph. Ctrst
VE-cad.
Ph. Ctrst +
VE-cad.
Post-drug removal time (min)
3
5
14
36
49
71

Fig 3b:

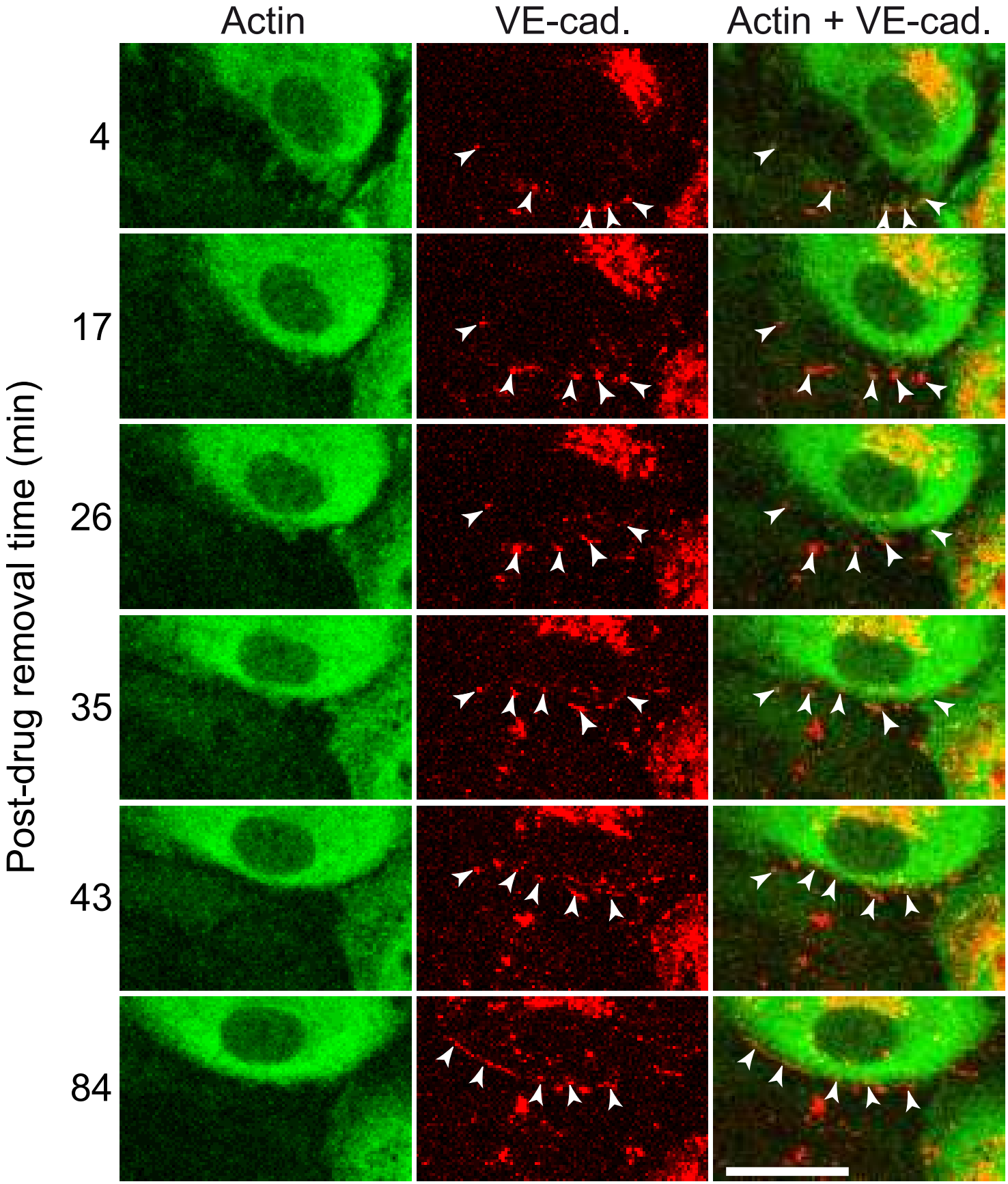

Actin
VE-cad.
Actin + VE-cad.
Post-drug removal time (min)
4
17
26
35
43
84

Fig. 4 :

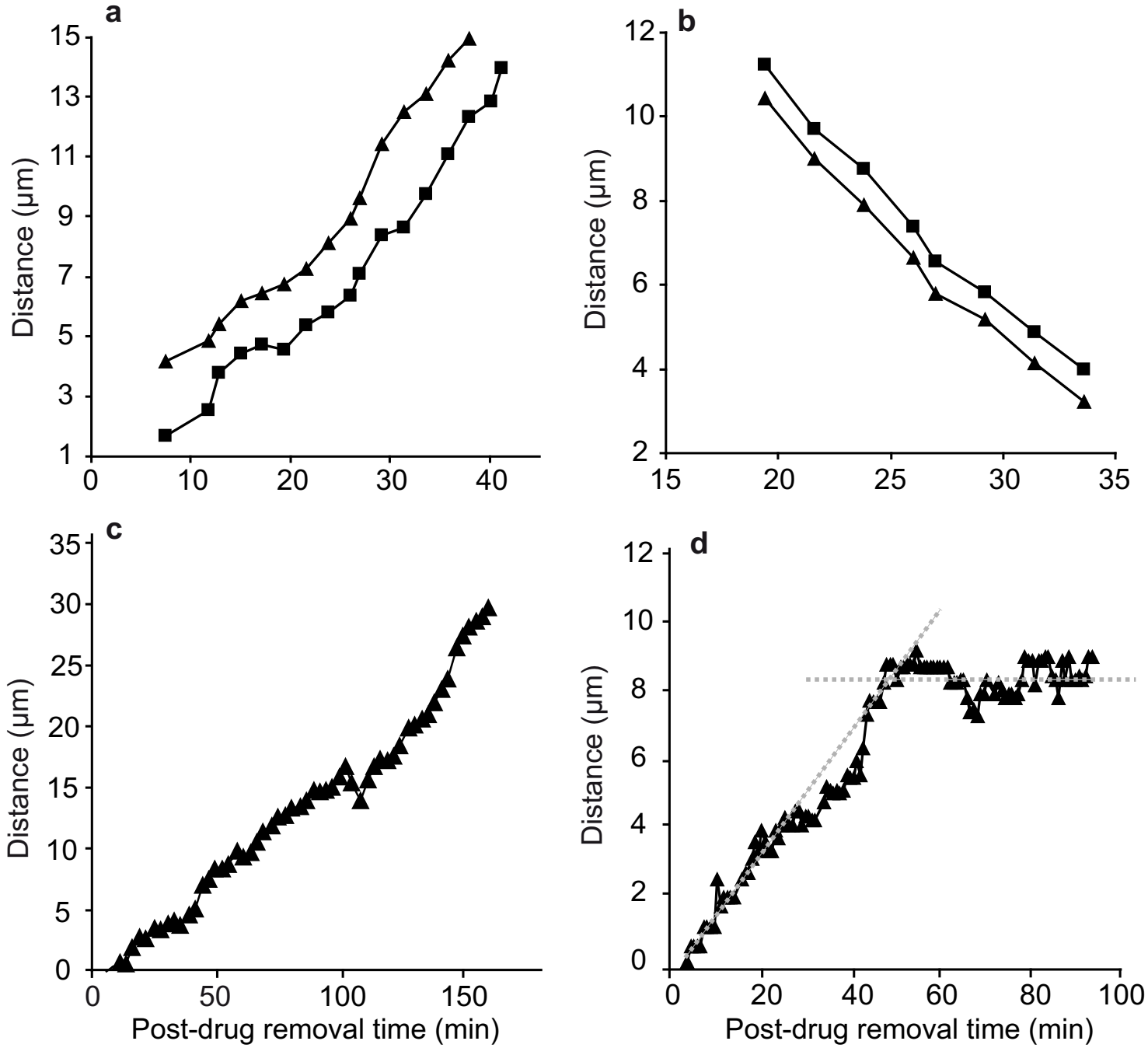


Fig. S1 :

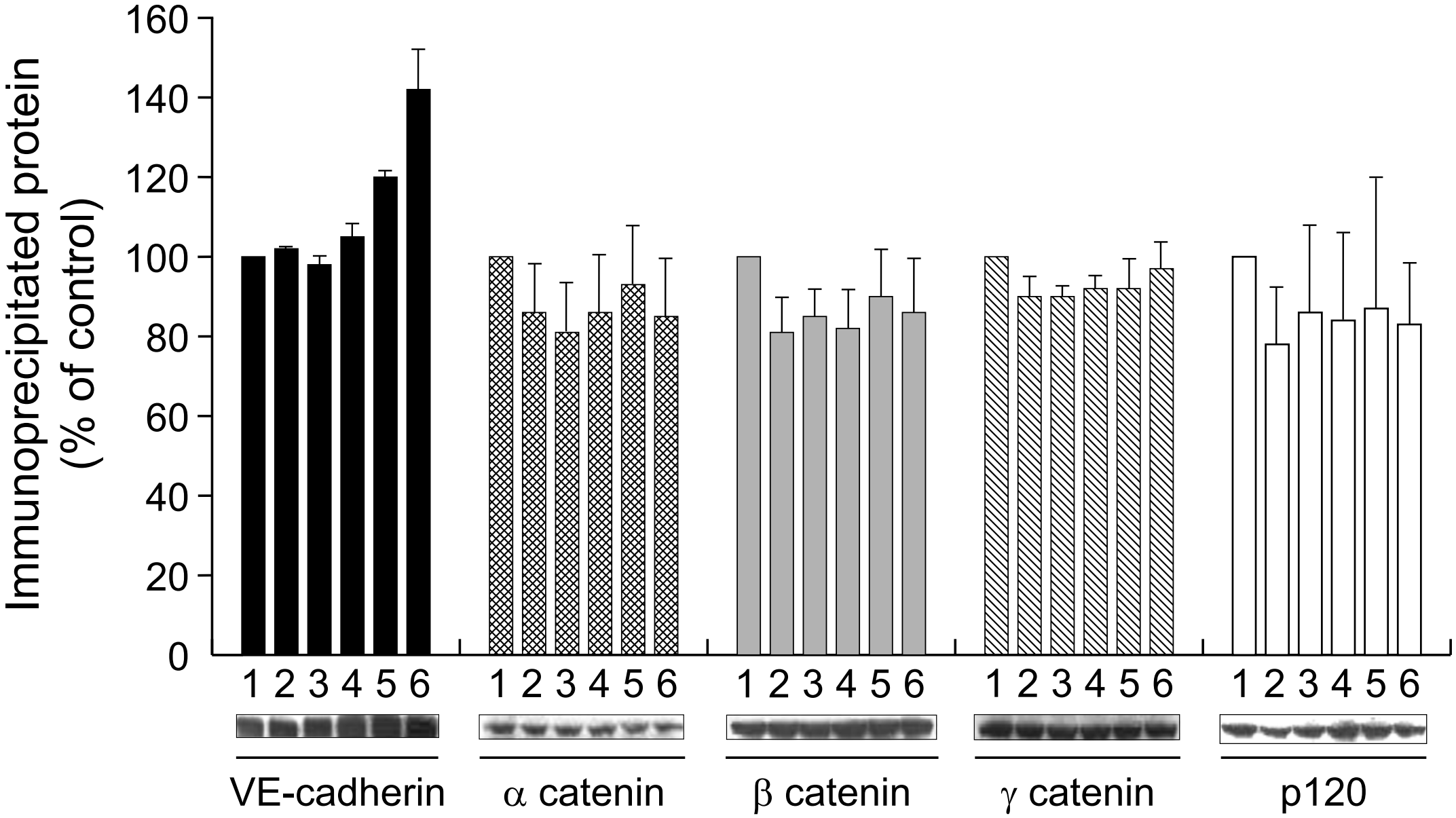

Immunoprecipitated protein
(% of control)
160
140
120
100
80
60
40
20
0
1 2 3 4 5 6
1 2 3 4 5 6
1 2 3 4 5 6
1 2 3 4 5 6
1 2 3 4 5 6
VE-cadherin
α catenin
β catenin
γ catenin
p120

Fig. S2:

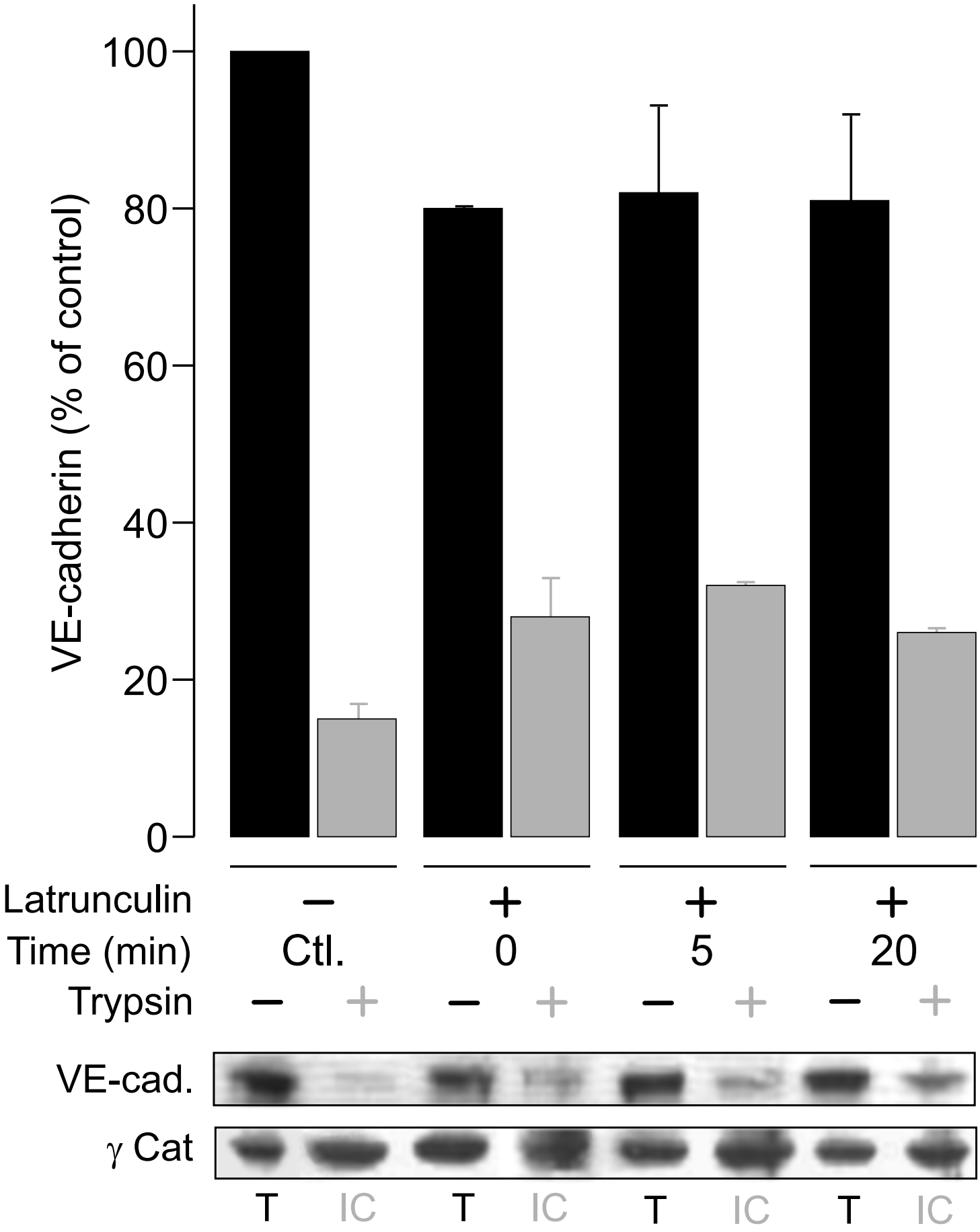

VE-cadherin (% of control)
100
80
60
40
20
0
Latrunculin
−
+
+
+
Time (min)
Ctl.
0
5
20
Trypsin
−
+
−
+
−
+
−
+
VE-cad.
γ Cat
T
IC
T
IC
T
IC
T
IC

Fig. S3:

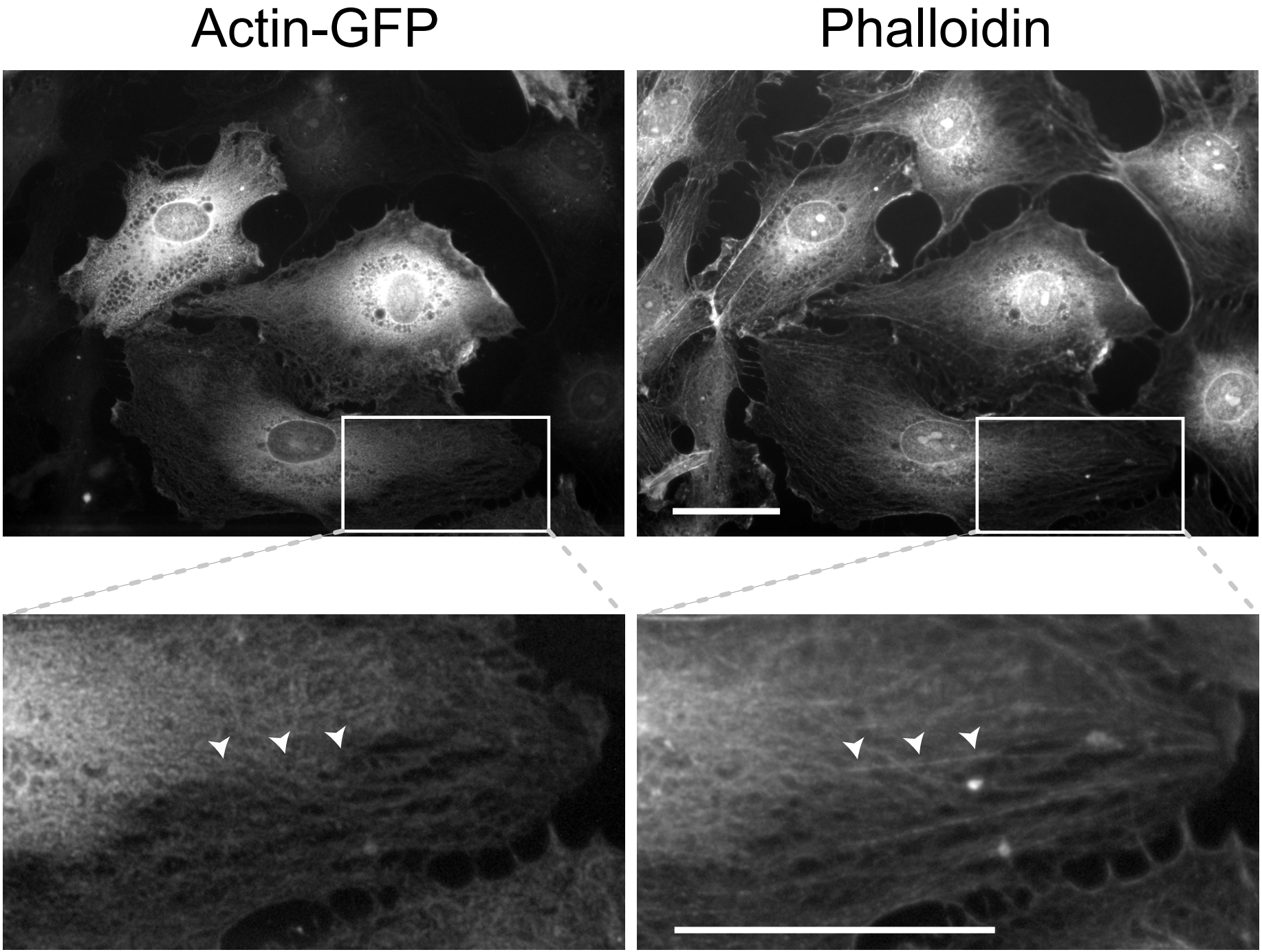
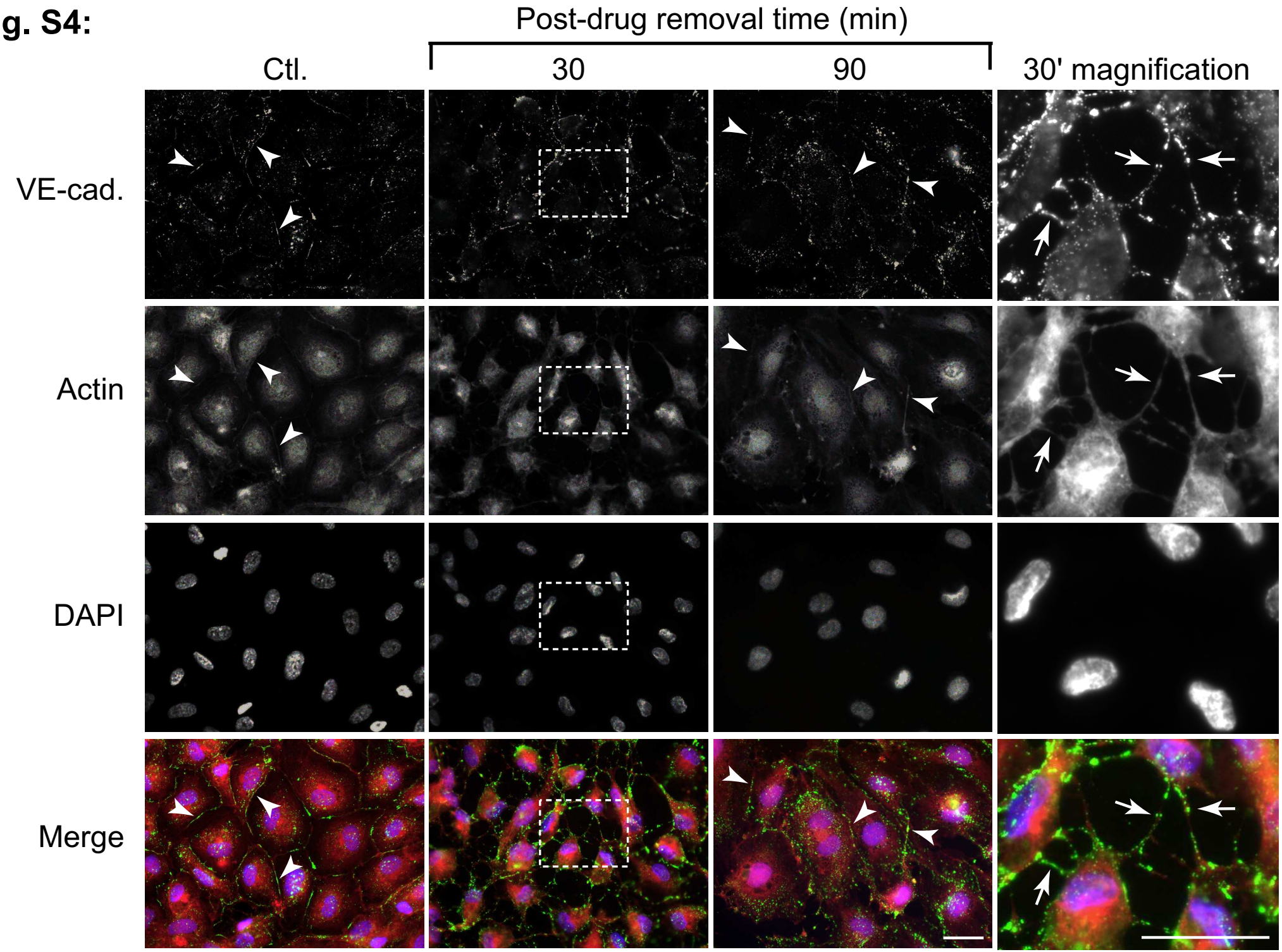


Fig. S4:


Post-drug removal time (min)
Ctl.
30
90
30' magnification
VE-cad.
Actin
DAPI
Merge

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

Aberle, H., S. Butz, J. Stappert, H. Weissig, R. Kemler, and H. Hoschuetzky. 1994. Assembly of the cadherin-catenin complex in vitro with recombinant proteins. *J Cell Sci*. 107 (Pt 12):3655-63.

Ahrens, T., M. Lambert, O. Pertz, T. Sasaki, T. Schulthess, R.M. Mege, R. Timpl, and J. Engel. 2003. Homoassociation of VE-cadherin follows a mechanism common to "classical" cadherins. *J Mol Biol*. 325:733-42.

Al-Amoudi, A., J. Dubochet, and L. Norlen. 2005. Nanostructure of the epidermal extracellular space as observed by cryo-electron microscopy of vitreous sections of human skin. *J Invest Dermatol*. 124:764-77.

Al-Kurdi, R., D. Gulino-Debrac, L. Martel, J.F. Legrand, A. Renault, E. Hewat, and C. Venien-Bryan. 2004. A soluble VE-cadherin fragment forms 2D arrays of dimers upon binding to a lipid monolayer. *J Mol Biol*. 337:881-92.

Amanchy, R., D.E. Kalume, and A. Pandey. 2005. Stable isotope labeling with amino acids in cell culture (SILAC) for studying dynamics of protein abundance and posttranslational modifications. *Sci STKE*. 2005:pl2.

Amano, M., M. Ito, K. Kimura, Y. Fukata, K. Chihara, T. Nakano, Y. Matsuura, and K. Kaibuchi. 1996. Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase). *J Biol Chem*. 271:20246-9.

Amieva, M.R., and H. Furthmayr. 1995. Subcellular localization of moesin in dynamic filopodia, retraction fibers, and other structures involved in substrate exploration, attachment, and cell-cell contacts. *Exp Cell Res*. 219:180-96.

Anastasiadis, P.Z. 2007. p120-ctn: A nexus for contextual signaling via Rho GTPases. *Biochim Biophys Acta*. 1773:34-46.

Angelini, D.J., S.W. Hyun, D.N. Grigoryev, P. Garg, P. Gong, I.S. Singh, A. Passaniti, J.D. Hasday, and S.E. Goldblum. 2006. TNF-alpha increases tyrosine phosphorylation of vascular endothelial cadherin and opens the paracellular pathway through fyn activation in human lung endothelia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 291:L1232-45.

Babiychuk, E.B., and A. Draeger. 2000. Annexins in cell membrane dynamics. Ca(2+)-regulated association of lipid microdomains. *J Cell Biol*. 150:1113-24.

Babiychuk, E.B., K. Monastyrskaya, F.C. Burkhard, S. Wray, and A. Draeger. 2002. Modulating signaling events in smooth muscle: cleavage of annexin 2 abolishes its binding to lipid rafts. *Faseb J*. 16:1177-84.

Bakolitsa, C., D.M. Cohen, L.A. Bankston, A.A. Bobkov, G.W. Cadwell, L. Jennings, D.R. Critchley, S.W. Craig, and R.C. Liddington. 2004. Structural basis for vinculin activation at sites of cell adhesion. *Nature*. 430:583-6.

Balda, M.S., M.D. Garrett, and K. Matter. 2003. The ZO-1-associated Y-box factor ZONAB regulates epithelial cell proliferation and cell density. *J Cell Biol*. 160:423-32.

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*. 24:1686-95.

Bazzoni, G., and E. Dejana. 2004. Endothelial cell-to-cell junctions: molecular organization and role in vascular homeostasis. *Physiol Rev*. 84:869-901.

Behrens, J., W. Birchmeier, S.L. Goodman, and B.A. Imhof. 1985. Dissociation of Madin-Darby canine kidney epithelial cells by the monoclonal antibody anti-arc-1: mechanistic aspects and identification of the antigen as a component related to uvomorulin. *J Cell Biol*. 101:1307-15.

Benaud, C., B.J. Gentil, N. Assard, M. Court, J. Garin, C. Delphin, and J. Baudier. 2004. AHNAK interaction with the annexin 2/S100A10 complex regulates cell membrane cytoarchitecture. *J Cell Biol*. 164:133-44.

Bibert, S., M. Jaquinod, E. Concord, C. Ebel, E. Hewat, C. Vanbelle, P. Legrand, M. Weidenhaupt, T. Vernet, and D. Gulino-Debrac. 2002. Synergy between extracellular modules of vascular endothelial cadherin promotes homotypic hexameric interactions. *J Biol Chem*. 277:12790-801.

Bienz, M. 2005. beta-Catenin: a pivot between cell adhesion and Wnt signalling. *Curr Biol*. 15:R64-7.

Bishop, A.L., and A. Hall. 2000. Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem J*. 348 Pt 2:241-55.

Biswas, P., J. Zhang, J.D. Schoenfeld, D. Schoenfeld, D. Gratzinger, S. Canosa, and J.A. Madri. 2005. Identification of the regions of PECAM-1 involved in beta- and gamma-catenin associations. *Biochem Biophys Res Commun*. 329:1225-33.

Boggon, T.J., J. Murray, S. Chappuis-Flament, E. Wong, B.M. Gumbiner, and L. Shapiro. 2002. C-cadherin ectodomain structure and implications for cell adhesion mechanisms. *Science*. 296:1308-13.

Braga, V.M. 1999. Small GTPases and regulation of cadherin dependent cell-cell adhesion. *Mol Pathol*. 52:197-202.

Braga, V.M., A. Del Maschio, L. Machesky, and E. Dejana. 1999. Regulation of cadherin function by Rho and Rac: modulation by junction maturation and cellular context. *Mol Biol Cell*. 10:9-22.

Braga, V.M., L.M. Machesky, A. Hall, and N.A. Hotchin. 1997. The small GTPases Rho and Rac are required for the establishment of cadherin-dependent cell-cell contacts. *J Cell Biol*. 137:1421-31.

Breviario, F., L. Caveda, M. Corada, I. Martin-Padura, P. Navarro, J. Golay, M. Introna, D. Gulino, M.G. Lampugnani, and E. Dejana. 1995. Functional properties of human

vascular endothelial cadherin (7B4/cadherin-5), an endothelium-specific cadherin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 15:1229-39.

Brieher, W.M., A.S. Yap, and B.M. Gumbiner. 1996. Lateral dimerization is required for the homophilic binding activity of C-cadherin. *J Cell Biol*. 135:487-96.

Briggs, M.W., and D.B. Sacks. 2003a. IQGAP1 as signal integrator: Ca2+, calmodulin, Cdc42 and the cytoskeleton. *FEBS Lett*. 542:7-11.

Briggs, M.W., and D.B. Sacks. 2003b. IQGAP proteins are integral components of cytoskeletal regulation. *EMBO Rep*. 4:571-4.

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*. 98:73-80.

Broman, M.T., D. Mehta, and A.B. Malik. 2007. Cdc42 regulates the restoration of endothelial adherens junctions and permeability. *Trends Cardiovasc Med*. 17:151-6.

Brown, M.D., and D.B. Sacks. 2006. IQGAP1 in cellular signaling: bridging the GAP. *Trends Cell Biol*. 16:242-9.

Burkart, A., B. Samii, S. Corvera, and H.S. Shpetner. 2003. Regulation of the SHP-2 tyrosine phosphatase by a novel cholesterol- and cell confluence-dependent mechanism. *J Biol Chem*. 278:18360-7.

Byrne, A.M., D.J. Bouchier-Hayes, and J.H. Harmey. 2005. Angiogenic and cell survival functions of vascular endothelial growth factor (VEGF). *J Cell Mol Med*. 9:777-94.

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*. 278:1774-83.

Carbajal, J.M., and R.C. Schaeffer, Jr. 1999. RhoA inactivation enhances endothelial barrier function. *Am J Physiol*. 277:C955-64.

Carden, D., F. Xiao, C. Moak, B.H. Willis, S. Robinson-Jackson, and S. Alexander. 1998. Neutrophil elastase promotes lung microvascular injury and proteolysis of endothelial cadherins. *Am J Physiol*. 275:H385-92.

Carmeliet, P. 2003. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med*. 9:653-60.

Carmeliet, P., M.G. Lampugnani, L. Moons, F. Breviario, V. Compernolle, F. Bono, G. Balconi, R. Spagnuolo, B. Oostuyse, M. Dewerchin, A. Zanetti, A. Angellilo, V. Mattot, D. Nuyens, E. Lutgens, F. Clotman, M.C. de Ruiter, A. Gittenberger-de Groot, R. Poelmann, F. Lupu, J.M. Herbert, D. Collen, and E. Dejana. 1999. Targeted deficiency or cytosolic truncation of the VE-cadherin gene in mice impairs VEGF-mediated endothelial survival and angiogenesis. *Cell*. 98:147-57.

Castano, J., G. Solanas, D. Casagolda, I. Raurell, P. Villagrasa, X.R. Bustelo, A. Garcia de Herreros, and M. Dunach. 2007. Specific phosphorylation of p120-catenin regulatory domain differently modulates its binding to RhoA. *Mol Cell Biol*. 27:1745-57.

Cattelino, A., S. Liebner, R. Gallini, A. Zanetti, G. Balconi, A. Corsi, P. Bianco, H. Wolburg, R. Moore, B. Oreda, R. Kemler, and E. Dejana. 2003. The conditional inactivation of the beta-catenin gene in endothelial cells causes a defective vascular pattern and increased vascular fragility. *J Cell Biol*. 162:1111-22.

Cavallaro, U., S. Liebner, and E. Dejana. 2006. Endothelial cadherins and tumor angiogenesis. *Exp Cell Res*. 312:659-67.

Cepinskas, G., M. Sandig, and P.R. Kvietys. 1999. PAF-induced elastase-dependent neutrophil transendothelial migration is associated with the mobilization of elastase to the neutrophil surface and localization to the migrating front. *J Cell Sci*. 112 (Pt 12):1937-45.

Chausovsky, A., A.D. Bershadsky, and G.G. Borisy. 2000. Cadherin-mediated regulation of microtubule dynamics. *Nat Cell Biol*. 2:797-804.

Chen, X., S. Kojima, G.G. Borisy, and K.J. Green. 2003. p120 catenin associates with kinesin and facilitates the transport of cadherin-catenin complexes to intercellular junctions. *J Cell Biol*. 163:547-57.

Chu, Y.S., W.A. Thomas, O. Eder, F. Pincet, E. Perez, J.P. Thiery, and S. Dufour. 2004. Force measurements in E-cadherin-mediated cell doublets reveal rapid adhesion strengthened by actin cytoskeleton remodeling through Rac and Cdc42. *J Cell Biol*. 167:1183-94.

Comunale, F., M. Causeret, C. Favard, J. Cau, N. Taulet, S. Charrasse, and C. Gauthier-Rouviere. 2007. Rac1 and RhoA GTPases have antagonistic functions during N-cadherin-dependent cell-cell contact formation in C2C12 myoblasts. *Biol Cell*. 99:503-17.

Corada, M., M. Mariotti, G. Thurston, K. Smith, R. Kunkel, M. Brockhaus, M.G. Lampugnani, I. Martin-Padura, A. Stoppacciaro, L. Ruco, D.M. McDonald, P.A. Ward, and E. Dejana. 1999. Vascular endothelial-cadherin is an important determinant of microvascular integrity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96:9815-20.

Corvera, S., C. DiBonaventura, and H.S. Shpetner. 2000. Cell confluence-dependent remodeling of endothelial membranes mediated by cholesterol. *J Biol Chem*. 275:31414-21.

Coue, M., S.L. Brenner, I. Spector, and E.D. Korn. 1987. Inhibition of actin polymerization by latrunculin A. *FEBS Lett*. 213:316-8.

Cullere, X., S.K. Shaw, L. Andersson, J. Hirahashi, F.W. Luscinskas, and T.N. Mayadas. 2005. Regulation of vascular endothelial barrier function by Epac, a cAMP-activated exchange factor for Rap GTPase. *Blood*. 105:1950-5.

Daly, R.J. 2004. Cortactin signalling and dynamic actin networks. *Biochem J*. 382:13-25.

Daniel, J.M. 2007. Dancing in and out of the nucleus: p120(ctn) and the transcription factor Kaiso. *Biochim Biophys Acta*. 1773:59-68.

Daniel, J.M., and A.B. Reynolds. 1999. The catenin p120(ctn) interacts with Kaiso, a novel BTB/POZ domain zinc finger transcription factor. *Mol Cell Biol*. 19:3614-23.

Davis, M.A., R.C. Ireton, and A.B. Reynolds. 2003. A core function for p120-catenin in cadherin turnover. *J Cell Biol*. 163:525-34.

De Seranno, S., C. Benaud, N. Assard, S. Khediri, V. Gerke, J. Baudier, and C. Delphin. 2006. Identification of an AHNAK binding motif specific for the Annexin2/S100A10 tetramer. *J Biol Chem*. 281:35030-8.

Dejana, E. 2004. Endothelial cell-cell junctions: happy together. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 5:261-70.

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*. 135:497-510.

Drees, F., S. Pokutta, S. Yamada, W.J. Nelson, and W.I. Weis. 2005. Alpha-catenin is a molecular switch that binds E-cadherin-beta-catenin and regulates actin-filament assembly. *Cell*. 123:903-15.

Ehrlich, J.S., M.D. Hansen, and W.J. Nelson. 2002. Spatio-temporal regulation of Rac1 localization and lamellipodia dynamics during epithelial cell-cell adhesion. *Dev Cell*. 3:259-70.

Engelhardt, B., and H. Wolburg. 2004. Mini-review: Transendothelial migration of leukocytes: through the front door or around the side of the house? *Eur J Immunol*. 34:2955-63.

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.

Faix, J., and R. Grosse. 2006. Staying in shape with formins. *Dev Cell*. 10:693-706.

Fang, X., H. Ji, S.W. Kim, J.I. Park, T.G. Vaught, P.Z. Anastasiadis, M. Ciesiolka, and P.D. McCrea. 2004. Vertebrate development requires ARVCF and p120 catenins and their interplay with RhoA and Rac. *J Cell Biol*. 165:87-98.

Ferguson, J.E., 3rd, R.W. Kelley, and C. Patterson. 2005. Mechanisms of endothelial differentiation in embryonic vasculogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 25:2246-54.

Ferrara, N., K. Carver-Moore, H. Chen, M. Dowd, L. Lu, K.S. O'Shea, L. Powell-Braxton, K.J. Hillan, and M.W. Moore. 1996. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature*. 380:439-42.

Fievet, B., D. Louvard, and M. Arpin. 2007. ERM proteins in epithelial cell organization and functions. *Biochim Biophys Acta*. 1773:653-60.

Figueroa, X.F., B.E. Isakson, and B.R. Duling. 2006. Vascular gap junctions in hypertension. *Hypertension*. 48:804-11.

Filipenko, N.R., and D.M. Waisman. 2001. The C terminus of annexin II mediates binding to F-actin. *J Biol Chem*. 276:5310-5.

Filler, S.G., and D.C. Sheppard. 2006. Fungal invasion of normally non-phagocytic host cells. *PLoS Pathog*. 2:e129.

Firestein, G.S. 2003. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature*. 423:356-61.

Foster, L.J., C.L. De Hoog, and M. Mann. 2003. Unbiased quantitative proteomics of lipid rafts reveals high specificity for signaling factors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100:5813-8.

Frank, M., and R. Kemler. 2002. Protocadherins. *Curr Opin Cell Biol*. 14:557-62.

Fredette, B.J., J. Miller, and B. Ranscht. 1996. Inhibition of motor axon growth by T-cadherin substrata. *Development*. 122:3163-71.

Fukata, M., S. Kuroda, M. Nakagawa, A. Kawajiri, N. Itoh, I. Shoji, Y. Matsuura, S. Yonehara, H. Fujisawa, A. Kikuchi, and K. Kaibuchi. 1999. Cdc42 and Rac1 regulate the interaction of IQGAP1 with beta-catenin. *J Biol Chem*. 274:26044-50.

Fukuhara, A., K. Irie, H. Nakanishi, K. Takekuni, T. Kawakatsu, W. Ikeda, A. Yamada, T. Katata, T. Honda, T. Sato, K. Shimizu, H. Ozaki, H. Horiuchi, T. Kita, and Y. Takai. 2002. Involvement of nectin in the localization of junctional adhesion molecule at tight junctions. *Oncogene*. 21:7642-55.

Fukuhra, 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*. 39:132-9.

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*. 128:929-41.

Garcia, J.G., H.W. Davis, and C.E. Patterson. 1995. Regulation of endothelial cell gap formation and barrier dysfunction: role of myosin light chain phosphorylation. *J Cell Physiol*. 163:510-22.

Gates, J., and M. Peifer. 2005. Can 1000 reviews be wrong? Actin, alpha-Catenin, and adherens junctions. *Cell*. 123:769-72.

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*. 8:1223-34.

Gavard, J., M. Lambert, I. Grosheva, V. Marthiens, T. Irinopoulou, J.F. Riou, A. Bershadsky, and R.M. Mege. 2004. Lamellipodium extension and cadherin adhesion: two cell responses to cadherin activation relying on distinct signalling pathways. *J Cell Sci*. 117:257-70.

Gerke, V., C.E. Creutz, and S.E. Moss. 2005. Annexins: linking Ca2+ signalling to membrane dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 6:449-61.

Gerke, V., and S.E. Moss. 2002. Annexins: from structure to function. *Physiol Rev*. 82:331-71.

Goley, E.D., and M.D. Welch. 2006. The ARP2/3 complex: an actin nucleator comes of age. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 7:713-26.

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*. 126:2093-102.

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.

Gottardi, C.J., and B.M. Gumbiner. 2001. Adhesion signaling: how beta-catenin interacts with its partners. *Curr Biol*. 11:R792-4.

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. 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.

Gulino, D., E. Delachanal, E. Concord, Y. Genoux, B. Morand, M.O. Valiron, E. Sulpice, R. Scaife, M. Alemany, and T. Vernet. 1998. Alteration of endothelial cell monolayer integrity triggers resynthesis of vascular endothelium cadherin. *J Biol Chem*. 273:29786-93.

Gumbiner, B.M. 2005. Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 6:622-34.

Guo, R., H. Sakamoto, S. Sugiura, and M. Ogawa. 2007. Endothelial cell motility is compatible with junctional integrity. *J Cell Physiol*. 211:327-35.

Halbleib, J.M., and W.J. Nelson. 2006. Cadherins in development: cell adhesion, sorting, and tissue morphogenesis. *Genes Dev*. 20:3199-214.

Hansen, M.D., J.S. Ehrlich, and W.J. Nelson. 2002. Molecular mechanism for orienting membrane and actin dynamics to nascent cell-cell contacts in epithelial cells. *J Biol Chem*. 277:45371-6.

Harder, T., and V. Gerke. 1993. The subcellular distribution of early endosomes is affected by the annexin II2p11(2) complex. *J Cell Biol*. 123:1119-32.

Harder, T., R. Kellner, R.G. Parton, and J. Gruenberg. 1997. Specific release of membrane-bound annexin II and cortical cytoskeletal elements by sequestration of membrane cholesterol. *Mol Biol Cell*. 8:533-45.

Hatzfeld, M. 2007. Plakophilins: Multifunctional proteins or just regulators of desmosomal adhesion? *Biochim Biophys Acta*. 1773:69-77.

Hayes, M.J., C.J. Merrifield, D. Shao, J. Ayala-Sanmartin, C.D. Schorey, T.P. Levine, J. Proust, J. Curran, M. Bailly, and S.E. Moss. 2004a. Annexin 2 binding to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate on endocytic vesicles is regulated by the stress response pathway. *J Biol Chem*. 279:14157-64.

Hayes, M.J., U. Rescher, V. Gerke, and S.E. Moss. 2004b. Annexin-actin interactions. *Traffic*. 5:571-6.

Hayes, M.J., D. Shao, M. Bailly, and S.E. Moss. 2006. Regulation of actin dynamics by annexin 2. *Embo J*.

Helwani, F.M., E.M. Kovacs, A.D. Paterson, S. Verma, R.G. Ali, A.S. Fanning, S.A. Weed, and A.S. Yap. 2004. Cortactin is necessary for E-cadherin-mediated contact formation and actin reorganization. *J Cell Biol*. 164:899-910.

Hermant, B., S. Bibert, E. Concord, B. Dublet, M. Weidenhaupt, T. Vernet, and D. Gulino-Debrac. 2003. Identification of proteases involved in the proteolysis of vascular endothelium cadherin during neutrophil transmigration. *J Biol Chem*. 278:14002-12.

Hermant, B., Weidenhaupt, M., Heyraud, S., Gulino-Debrac, D. 2006. Vascular Endothelial Cadherin and Neutrophil Transmigration. *In* Microvascular Research: Biology and Pathology. D. Shepro, editor, Boston, Massachusetts. 309-316.

Hewat, E.A., C. Durmort, L. Jacquamet, E. Concord, and D. Gulino-Debrac. 2007. Architecture of the VE-cadherin Hexamer. *J Mol Biol*. 365:744-51.

Hordijk, P.L., E. Anthony, F.P. Mul, R. Rientsma, L.C. Oomen, and D. Roos. 1999. Vascular-endothelial-cadherin modulates endothelial monolayer permeability. *J Cell Sci*. 112 (Pt 12):1915-23.

Huber, A.H., D.B. Stewart, D.V. Laurents, W.J. Nelson, and W.I. Weis. 2001. The cadherin cytoplasmic domain is unstructured in the absence of beta-catenin. A possible mechanism for regulating cadherin turnover. *J Biol Chem*. 276:12301-9.

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*. 19:512-20.

Ilan, N., L. Cheung, E. Pinter, and J.A. Madri. 2000. Platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31), a scaffolding molecule for selected catenin family members whose binding is mediated by different tyrosine and serine/threonine phosphorylation. *J Biol Chem*. 275:21435-43.

Ilan, N., and J.A. Madri. 2003. PECAM-1: old friend, new partners. *Curr Opin Cell Biol*. 15:515-24.

Ivetic, A., and A.J. Ridley. 2004. Ezrin/radixin/moesin proteins and Rho GTPase signalling in leucocytes. *Immunology*. 112:165-76.

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:L1143-53.

Izumi, G., T. Sakisaka, T. Baba, S. Tanaka, K. Morimoto, and Y. Takai. 2004. Endocytosis of E-cadherin regulated by Rac and Cdc42 small G proteins through IQGAP1 and actin filaments. *J Cell Biol*. 166:237-48.

Jain, R.K. 2003. Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med*. 9:685-93.

Jain, R.K. 2005. Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science*. 307:58-62.

Jamora, C., and E. Fuchs. 2002. Intercellular adhesion, signalling and the cytoskeleton. *Nat Cell Biol*. 4:E101-8.

Jou, T.S., and W.J. Nelson. 1998. Effects of regulated expression of mutant RhoA and Rac1 small GTPases on the development of epithelial (MDCK) cell polarity. *J Cell Biol*. 142:85-100.

Kametani, Y., and M. Takeichi. 2007. Basal-to-apical cadherin flow at cell junctions. *Nat Cell Biol*. 9:92-8.

Kaufmann, U., C. Zuppinger, Z. Waibler, M. Rudiger, C. Urbich, B. Martin, B.M. Jockusch, H. Eppenberger, and A. Starzinski-Powitz. 2000. The armadillo repeat region targets ARVCF to cadherin-based cellular junctions. *J Cell Sci*. 113 (Pt 22):4121-35.

Kausalya, P.J., D.C. Phua, and W. Hunziker. 2004. Association of ARVCF with zonula occludens (ZO)-1 and ZO-2: binding to PDZ-domain proteins and cell-cell adhesion regulate plasma membrane and nuclear localization of ARVCF. *Mol Biol Cell*. 15:5503-15.

Keil, R., A. Wolf, S. Huttelmaier, and M. Hatzfeld. 2007. Beyond regulation of cell adhesion: local control of RhoA at the cleavage furrow by the p0071 catenin. *Cell Cycle*. 6:122-7.

Kim, J., W. Yu, K. Kovalski, and L. Ossowski. 1998. Requirement for specific proteases in cancer cell intravasation as revealed by a novel semiquantitative PCR-based assay. *Cell*. 94:353-62.

Kim, Y.J., C. Sauer, K. Testa, J.K. Wahl, R.A. Svoboda, K.R. Johnson, M.J. Wheelock, and K.A. Knudsen. 2005. Modulating the strength of cadherin adhesion: evidence for a novel adhesion complex. *J Cell Sci*. 118:3883-94.

Knudsen, K.A., A.P. Soler, K.R. Johnson, and M.J. Wheelock. 1995. Interaction of alpha-actinin with the cadherin/catenin cell-cell adhesion complex via alpha-catenin. *J Cell Biol*. 130:67-77.

Kobielak, A., and E. Fuchs. 2004. Alpha-catenin: at the junction of intercellular adhesion and actin dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 5:614-25.

Kobielak, A., H.A. Pasolli, and E. Fuchs. 2004. Mammalian formin-1 participates in adherens junctions and polymerization of linear actin cables. *Nat Cell Biol*. 6:21-30.

Koss, M., G.R. Pfeiffer, 2nd, Y. Wang, S.T. Thomas, M. Yerukhimovich, W.A. Gaarde, C.M. Doerschuk, and Q. Wang. 2006. Ezrin/radixin/moesin proteins are phosphorylated by

TNF-alpha and modulate permeability increases in human pulmonary microvascular endothelial cells. *J Immunol*. 176:1218-27.

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*. 278:16230-6.

Kouklis, P., M. Konstantoulaki, S. Vogel, M. Broman, and A.B. Malik. 2004. Cdc42 regulates the restoration of endothelial barrier function. *Circ Res*. 94:159-66.

Kovacs, E.M., M. Goodwin, R.G. Ali, A.D. Paterson, and A.S. Yap. 2002. Cadherin-directed actin assembly: E-cadherin physically associates with the Arp2/3 complex to direct actin assembly in nascent adhesive contacts. *Curr Biol*. 12:379-82.

Kovar, D.R., and T.D. Pollard. 2004. Progressing actin: Formin as a processive elongation machine. *Nat Cell Biol*. 6:1158-9.

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.

Kuroda, S., M. Fukata, M. Nakagawa, K. Fujii, T. Nakamura, T. Ookubo, I. Izawa, T. Nagase, N. Nomura, H. Tani, I. Shoji, Y. Matsuura, S. Yonehara, and K. Kaibuchi. 1998. Role of IQGAP1, a target of the small GTPases Cdc42 and Rac1, in regulation of E-cadherin- mediated cell-cell adhesion. *Science*. 281:832-5.

Kwik, J., S. Boyle, D. Fooksman, L. Margolis, M.P. Sheetz, and M. Edidin. 2003. Membrane cholesterol, lateral mobility, and the phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate-dependent organization of cell actin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100:13964-9.

Lambeng, N., Y. Wallez, C. Rampon, F. Cand, G. Christe, D. Gulino-Debrac, I. Vilgrain, and P. Huber. 2005. Vascular endothelial-cadherin tyrosine phosphorylation in angiogenic and quiescent adult tissues. *Circ Res*. 96:384-91.

Lambert, M., D. Choquet, and R.M. Mege. 2002. Dynamics of ligand-induced, Rac1-dependent anchoring of cadherins to the actin cytoskeleton. *J Cell Biol*. 157:469-79.

Lambert, O., V. Gerke, M.F. Bader, F. Porte, and A. Brisson. 1997. Structural analysis of junctions formed between lipid membranes and several annexins by cryo-electron microscopy. *J Mol Biol*. 272:42-55.

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*. 346:1193-6.

Lampugnani, M.G., M. Corada, L. Caveda, F. Breviario, O. Ayalon, B. Geiger, and E. Dejana. 1995. The molecular organization of endothelial cell to cell junctions: differential association of plakoglobin, beta-catenin, and alpha-catenin with vascular endothelial cadherin (VE-cadherin). *J Cell Biol*. 129:203-17.

Lampugnani, M.G., and E. Dejana. 1997. Interendothelial junctions: structure, signalling and functional roles. *Curr Opin Cell Biol*. 9:674-82.

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*. 174:593-604.

Lampugnani, M.G., M. Resnati, M. Raiteri, R. Pigott, A. Pisacane, G. Houen, L.P. Ruco, and E. Dejana. 1992. A novel endothelial-specific membrane protein is a marker of cell-cell contacts. *J Cell Biol*. 118:1511-22.

Lampugnani, M.G., A. Zanetti, F. Breviario, G. Balconi, F. Orsenigo, M. Corada, R. Spagnuolo, M. Betson, V. Braga, and E. Dejana. 2002. VE-cadherin regulates endothelial actin activating Rac and increasing membrane association of Tiam. *Mol Biol Cell*. 13:1175-89.

Lee, D.B., N. Jamgotchian, S.G. Allen, F.W. Kan, and I.L. Hale. 2004. Annexin A2 heterotetramer: role in tight junction assembly. *Am J Physiol Renal Physiol*. 287:F481-91.

Legrand, P., S. Bibert, M. Jaquinod, C. Ebel, E. Hewat, F. Vincent, C. Vanbelle, E. Concord, T. Vernet, and D. Gulino. 2001. Self-assembly of the vascular endothelial cadherin ectodomain in a Ca2+-dependent hexameric structure. *J Biol Chem*. 276:3581-8.

Leung, C.L., R.K. Liem, D.A. Parry, and K.J. Green. 2001. The plakin family. *J Cell Sci*. 114:3409-10.

Lewit-Bentley, A., S. Rety, J. Sopkova-de Oliveira Santos, and V. Gerke. 2000. S100-annexin complexes: some insights from structural studies. *Cell Biol Int*. 24:799-802.

Li, Z., S.H. Kim, J.M. Higgins, M.B. Brenner, and D.B. Sacks. 1999. IQGAP1 and calmodulin modulate E-cadherin function. *J Biol Chem*. 274:37885-92.

Ligon, L.A., S. Karki, M. Tokito, and E.L. Holzbaur. 2001. Dynein binds to beta-catenin and may tether microtubules at adherens junctions. *Nat Cell Biol*. 3:913-7.

Lilien, J., and J. Balsamo. 2005. The regulation of cadherin-mediated adhesion by tyrosine phosphorylation/dephosphorylation of beta-catenin. *Curr Opin Cell Biol*. 17:459-65.

Lopez, M., M. Aoubala, F. Jordier, D. Isnardon, S. Gomez, and P. Dubreuil. 1998. The human poliovirus receptor related 2 protein is a new hematopoietic/endothelial homophilic adhesion molecule. *Blood*. 92:4602-11.

Lua, B.L., and B.C. Low. 2005. Cortactin phosphorylation as a switch for actin cytoskeletal network and cell dynamics control. *FEBS Lett*. 579:577-85.

Luo, Y., and G.L. Radice. 2005. N-cadherin acts upstream of VE-cadherin in controlling vascular morphogenesis. *J Cell Biol*. 169:29-34.

Maddugoda, M.P., M.S. Crampton, A.M. Shewan, and A.S. Yap. 2007. Myosin VI and vinculin cooperate during the morphogenesis of cadherin cell cell contacts in mammalian epithelial cells. *J Cell Biol*. 178:529-40.

Mariner, D.J., J. Wang, and A.B. Reynolds. 2000. ARVCF localizes to the nucleus and adherens junction and is mutually exclusive with p120(ctn) in E-cadherin complexes. *J Cell Sci*. 113 (Pt 8):1481-90.

Matter, K., and M.S. Balda. 2003. Signalling to and from tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 4:225-36.

Mege, R.M., J. Gavard, and M. Lambert. 2006. Regulation of cell-cell junctions by the cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol*. 18:541-8.

Merrifield, C.J., U. Rescher, W. Almers, J. Proust, V. Gerke, A.S. Sechi, and S.E. Moss. 2001. Annexin 2 has an essential role in actin-based macropinocytic rocketing. *Curr Biol*. 11:1136-41.

Miravet, S., J. Piedra, J. Castano, I. Raurell, C. Franci, M. Dunach, and A. Garcia de Herreros. 2003. Tyrosine phosphorylation of plakoglobin causes contrary effects on its association with desmosomes and adherens junction components and modulates beta-catenin-mediated transcription. *Mol Cell Biol*. 23:7391-402.

Nagar, B., M. Overduin, M. Ikura, and J.M. Rini. 1996. Structural basis of calcium-induced E-cadherin rigidification and dimerization. *Nature*. 380:360-4.

Nakamura, F., M.R. Amieva, and H. Furthmayr. 1995. Phosphorylation of threonine 558 in the carboxyl-terminal actin-binding domain of moesin by thrombin activation of human platelets. *J Biol Chem*. 270:31377-85.

Navarro, P., L. Caveda, F. Breviario, I. Mandoteanu, M.G. Lampugnani, and E. Dejana. 1995. Catenin-dependent and -independent functions of vascular endothelial cadherin. *J Biol Chem*. 270:30965-72.

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*. 140:1475-84.

Newman, P.J. 1999. Switched at birth: a new family for PECAM-1. *J Clin Invest*. 103:5-9.

Nieset, J.E., A.R. Redfield, F. Jin, K.A. Knudsen, K.R. Johnson, and M.J. Wheelock. 1997. Characterization of the interactions of alpha-catenin with alpha-actinin and beta-catenin/plakoglobin. *J Cell Sci*. 110 (Pt 8):1013-22.

Niggli, V., and J. Rossy. 2007. Ezrin/radixin/moesin: Versatile controllers of signaling molecules and of the cortical cytoskeleton. *Int J Biochem Cell Biol*.

Nollet, F., P. Kools, and F. van Roy. 2000. Phylogenetic analysis of the cadherin superfamily allows identification of six major subfamilies besides several solitary members. *J Mol Biol*. 299:551-72.

Noritake, J., T. Watanabe, K. Sato, S. Wang, and K. Kaibuchi. 2005. IQGAP1: a key regulator of adhesion and migration. *J Cell Sci*. 118:2085-92.

Norrby, K. 2006. In vivo models of angiogenesis. *J Cell Mol Med*. 10:588-612.

Olson, M.F. 2004. Contraction reaction: mechanical regulation of Rho GTPase. *Trends Cell Biol*. 14:111-4.

Olsson, A.K., A. Dimberg, J. Kreuger, and L. Claesson-Welsh. 2006. VEGF receptor signalling - in control of vascular function. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 7:359-71.

Ong, S.E., L.J. Foster, and M. Mann. 2003. Mass spectrometric-based approaches in quantitative proteomics. *Methods*. 29:124-30.

Owen, C.A., M.A. Campbell, P.L. Sannes, S.S. Boukedes, and E.J. Campbell. 1995. Cell surface-bound elastase and cathepsin G on human neutrophils: a novel, non-oxidative mechanism by which neutrophils focus and preserve catalytic activity of serine proteinases. *J Cell Biol*. 131:775-89.

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*. 358:665-74.

Paradela, A., S.B. Bravo, M. Henriquez, G. Riquelme, F. Gavilanes, J.M. Gonzalez-Ros, and J.P. Albar. 2005. Proteomic analysis of apical microvillous membranes of syncytiotrophoblast cells reveals a high degree of similarity with lipid rafts. *J Proteome Res*. 4:2435-41.

Patel, S.D., C. Ciatto, C.P. Chen, F. Bahna, M. Rajebhosale, N. Arkus, I. Schieren, T.M. Jessell, B. Honig, S.R. Price, and L. Shapiro. 2006. Type II cadherin ectodomain structures: implications for classical cadherin specificity. *Cell*. 124:1255-68.

Peifer, M., S. Berg, and A.B. Reynolds. 1994. A repeating amino acid motif shared by proteins with diverse cellular roles. *Cell*. 76:789-91.

Peifer, M., P.D. McCrea, K.J. Green, E. Wieschaus, and B.M. Gumbiner. 1992. The vertebrate adhesive junction proteins beta-catenin and plakoglobin and the Drosophila segment polarity gene armadillo form a multigene family with similar properties. *J Cell Biol*. 118:681-91.

Perez-Moreno, M., and E. Fuchs. 2006. Catenins: keeping cells from getting their signals crossed. *Dev Cell*. 11:601-12.

Perez, F., G.S. Diamantopoulos, R. Stalder, and T.E. Kreis. 1999. CLIP-170 highlights growing microtubule ends in vivo. *Cell*. 96:517-27.

Pertz, O., D. Bozic, A.W. Koch, C. Fauser, A. Brancaccio, and J. Engel. 1999. A new crystal structure, Ca2+ dependence and mutational analysis reveal molecular details of E-cadherin homoassociation. *Embo J*. 18:1738-47.

Pike, L.J. 2003. Lipid rafts: bringing order to chaos. *J Lipid Res*. 44:655-67.

Pike, L.J. 2006. Rafts defined: a report on the Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function. *J Lipid Res*. 47:1597-8.

Pokutta, S., and W.I. Weis. 2000. Structure of the dimerization and beta-catenin-binding region of alpha-catenin. *Mol Cell*. 5:533-43.

Pokutta, S., and W.I. Weis. 2002. The cytoplasmic face of cell contact sites. *Curr Opin Struct Biol*. 12:255-62.

Pollard, T.D., and G.G. Borisy. 2003. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell*. 112:453-65.

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*. 280:31906-12.

Prescott, S.M., T.M. McIntyre, G.A. Zimmerman, and D.M. Stafforini. 2002. Sol Sherry lecture in thrombosis: molecular events in acute inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 22:727-33.

Pujuguet, P., L. Del Maestro, A. Gautreau, D. Louvard, and M. Arpin. 2003. Ezrin regulates E-cadherin-dependent adherens junction assembly through Rac1 activation. *Mol Biol Cell*. 14:2181-91.

Qi, J., N. Chen, J. Wang, and C.H. Siu. 2005. Transendothelial migration of melanoma cells involves N-cadherin-mediated adhesion and activation of the beta-catenin signaling pathway. *Mol Biol Cell*. 16:4386-97.

Rajasekaran, A.K., M. Hojo, T. Huima, and E. Rodriguez-Boulan. 1996. Catenins and zonula occludens-1 form a complex during early stages in the assembly of tight junctions. *J Cell Biol*. 132:451-63.

Rampon, C., M.H. Prandini, S. Bouillot, H. Pointu, E. Tillet, R. Frank, M. Vernet, and P. Huber. 2005. Protocadherin 12 (VE-cadherin 2) is expressed in endothelial, trophoblast, and mesangial cells. *Exp Cell Res*. 302:48-60.

Rescher, U., and V. Gerke. 2004. Annexins--unique membrane binding proteins with diverse functions. *J Cell Sci*. 117:2631-9.

Rescher, U., D. Ruhe, C. Ludwig, N. Zobiack, and V. Gerke. 2004. Annexin 2 is a phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate binding protein recruited to actin assembly sites at cellular membranes. *J Cell Sci*. 117:3473-80.

Rety, S., J. Sopkova, M. Renouard, D. Osterloh, V. Gerke, S. Tabaries, F. Russo-Marie, and A. Lewit-Bentley. 1999. The crystal structure of a complex of p11 with the annexin II N-terminal peptide. *Nat Struct Biol*. 6:89-95.

Reya, T., and H. Clevers. 2005. Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature*. 434:843-50.

Reynolds, A.B. 2007. p120-catenin: Past and present. *Biochim Biophys Acta*. 1773:2-7.

Reynolds, A.B., and A. Roczniak-Ferguson. 2004. Emerging roles for p120-catenin in cell adhesion and cancer. *Oncogene*. 23:7947-56.

Ridley, A.J. 2006. Rho GTPases and actin dynamics in membrane protrusions and vesicle trafficking. *Trends Cell Biol*. 16:522-9.

Ridley, A.J., H.F. Paterson, C.L. Johnston, D. Diekmann, and A. Hall. 1992. The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell*. 70:401-10.

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*. 92:8813-7.

Saez, J.C., V.M. Berthoud, M.C. Branes, A.D. Martinez, and E.C. Beyer. 2003. Plasma membrane channels formed by connexins: their regulation and functions. *Physiol Rev*. 83:1359-400.

Sahai, E., and C.J. Marshall. 2002. ROCK and Dia have opposing effects on adherens junctions downstream of Rho. *Nat Cell Biol*. 4:408-15.

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*. 17:966-76.

Schafer, B.W., and C.W. Heizmann. 1996. The S100 family of EF-hand calcium-binding proteins: functions and pathology. *Trends Biochem Sci*. 21:134-40.

Scott, J.A., A.M. Shewan, N.R. den Elzen, J.J. Loureiro, F.B. Gertler, and A.S. Yap. 2006. Ena/VASP proteins can regulate distinct modes of actin organization at cadherin-adhesive contacts. *Mol Biol Cell*. 17:1085-95.

Shapiro, L., A.M. Fannon, P.D. Kwong, A. Thompson, M.S. Lehmann, G. Grubel, J.F. Legrand, J. Als-Nielsen, D.R. Colman, and W.A. Hendrickson. 1995. Structural basis of cell-cell adhesion by cadherins. *Nature*. 374:327-37.

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:L1330-8.

Shaw, S.K., P.S. Bamba, B.N. Perkins, and F.W. Luscinskas. 2001. Real-time imaging of vascular endothelial-cadherin during leukocyte transmigration across endothelium. *J Immunol*. 167:2323-30.

Shewan, A.M., M. Maddugoda, A. Kraemer, S.J. Stehbens, S. Verma, E.M. Kovacs, and A.S. Yap. 2005. Myosin 2 is a key Rho kinase target necessary for the local concentration of E-cadherin at cell-cell contacts. *Mol Biol Cell*. 16:4531-42.

Sohl, G., and K. Willecke. 2004. Gap junctions and the connexin protein family. *Cardiovasc Res*. 62:228-32.

Spagnuolo, R., M. Corada, F. Orsenigo, L. Zanetta, U. Deuschle, P. Sandy, C. Schneider, C.J. Drake, F. Breviario, and E. Dejana. 2004. Gas1 is induced by VE-cadherin and vascular endothelial growth factor and inhibits endothelial cell apoptosis. *Blood*. 103:3005-12.

Staddon, J.M., C. Smales, C. Schulze, F.S. Esch, and L.L. Rubin. 1995. p120, a p120-related protein (p100), and the cadherin/catenin complex. *J Cell Biol*. 130:369-81.

Stehbens, S.J., A.D. Paterson, M.S. Crampton, A.M. Shewan, C. Ferguson, A. Akhmanova, R.G. Parton, and A.S. Yap. 2006. Dynamic microtubules regulate the local concentration of E-cadherin at cell-cell contacts. *J Cell Sci*. 119:1801-11.

Su, W.H., H.I. Chen, and C.J. Jen. 2002. Differential movements of VE-cadherin and PECAM-1 during transmigration of polymorphonuclear leukocytes through human umbilical vein endothelium. *Blood*. 100:3597-603.

Suzuki, S., K. Sano, and H. Tanihara. 1991. Diversity of the cadherin family: evidence for eight new cadherins in nervous tissue. *Cell Regul*. 2:261-70.

Suzuki, S.T. 2000. Recent progress in protocadherin research. *Exp Cell Res*. 261:13-8.

Takai, Y., and H. Nakanishi. 2003. Nectin and afadin: novel organizers of intercellular junctions. *J Cell Sci*. 116:17-27.

Takenawa, T., and S. Suetsugu. 2007. The WASP-WAVE protein network: connecting the membrane to the cytoskeleton. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 8:37-48.

Taylor, P.C. 2005. Serum vascular markers and vascular imaging in assessment of rheumatoid arthritis disease activity and response to therapy. *Rheumatology (Oxford)*. 44:721-8.

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*. 273:17565-72.

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*. 310:392-400.

Tomschy, A., C. Fauser, R. Landwehr, and J. Engel. 1996. Homophilic adhesion of E-cadherin occurs by a co-operative two-step interaction of N-terminal domains. *Embo J*. 15:3507-14.

Tzima, E. 2006. Role of small GTPases in endothelial cytoskeletal dynamics and the shear stress response. *Circ Res*. 98:176-85.

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*. 275:5983-6.

Uruno, T., J. Liu, P. Zhang, Y. Fan, C. Egile, R. Li, S.C. Mueller, and X. Zhan. 2001. Activation of Arp2/3 complex-mediated actin polymerization by cortactin. *Nat Cell Biol*. 3:259-66.

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.

van Hengel, J., and F. van Roy. 2007. Diverse functions of p120ctn in tumors. *Biochim Biophys Acta*. 1773:78-88.

Venkiteswaran, K., K. Xiao, S. Summers, C.C. Calkins, P.A. Vincent, K. Pumiglia, and A.P. Kowalczyk. 2002. Regulation of endothelial barrier function and growth by VE-cadherin, plakoglobin, and beta-catenin. *Am J Physiol Cell Physiol*. 283:C811-21.

Verma, S., A.M. Shewan, J.A. Scott, F.M. Helwani, N.R. den Elzen, H. Miki, T. Takenawa, and A.S. Yap. 2004. Arp2/3 activity is necessary for efficient formation of E-cadherin adhesive contacts. *J Biol Chem*. 279:34062-70.

Vincent, P.A., K. Xiao, K.M. Buckley, and A.P. Kowalczyk. 2004. VE-cadherin: adhesion at arm's length. *Am J Physiol Cell Physiol*. 286:C987-97.

Vittet, D., T. Buchou, A. Schweitzer, E. Dejana, and P. Huber. 1997. 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*. 94:6273-8.

Vouret-Craviari, V., C. Bourcier, E. Boulter, and E. van Obberghen-Schilling. 2002. Distinct signals via Rho GTPases and Src drive shape changes by thrombin and sphingosine-1-phosphate in endothelial cells. *J Cell Sci*. 115:2475-84.

Wallar, B.J., and A.S. Alberts. 2003. The formins: active scaffolds that remodel the cytoskeleton. *Trends Cell Biol*. 13:435-46.

Wallez, Y., F. Cand, F. Cruzalegui, C. Wernstedt, S. Souchelnytskyi, I. Vilgrain, and P. Huber. 2006a. Src kinase phosphorylates vascular endothelial-cadherin in response to vascular endothelial growth factor: identification of tyrosine 685 as the unique target site. *Oncogene*.

Wallez, Y., I. Vilgrain, and P. Huber. 2006b. Angiogenesis: the VE-cadherin switch. *Trends Cardiovasc Med*. 16:55-9.

Waschke, J., F.E. Curry, R.H. Adamson, and D. Drenckhahn. 2005. Regulation of actin dynamics is critical for endothelial barrier functions. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 288:H1296-305.

Waterman-Storer, C.M., W.C. Salmon, and E.D. Salmon. 2000. Feedback interactions between cell-cell adherens junctions and cytoskeletal dynamics in newt lung epithelial cells. *Mol Biol Cell*. 11:2471-83.

Wei, C.J., X. Xu, and C.W. Lo. 2004. Connexins and cell signaling in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 20:811-38.

Weinrauch, Y., D. Drujan, S.D. Shapiro, J. Weiss, and A. Zychlinsky. 2002. Neutrophil elastase targets virulence factors of enterobacteria. *Nature*. 417:91-4.

Weis, W.I., and W.J. Nelson. 2006. Re-solving the cadherin-catenin-actin conundrum. *J Biol Chem*. 281:35593-7.

Weiss, E.E., M. Kroemker, A.H. Rudiger, B.M. Jockusch, and M. Rudiger. 1998. Vinculin is part of the cadherin-catenin junctional complex: complex formation between alpha-catenin and vinculin. *J Cell Biol*. 141:755-64.

Wheelock, M.J., and K.R. Johnson. 2003. Cadherin-mediated cellular signaling. *Curr Opin Cell Biol*. 15:509-14.

Willert, K., and K.A. Jones. 2006. Wnt signaling: is the party in the nucleus? *Genes Dev*. 20:1394-404.

Wojciak-Stothard, B., A. Entwistle, R. Garg, and A.J. Ridley. 1998. Regulation of TNF-alpha-induced reorganization of the actin cytoskeleton and cell-cell junctions by Rho, Rac, and Cdc42 in human endothelial cells. *J Cell Physiol*. 176:150-65.

Wojciak-Stothard, B., S. Potempa, T. Eichholtz, and A.J. Ridley. 2001. Rho and Rac but not Cdc42 regulate endothelial cell permeability. *J Cell Sci*. 114:1343-55.

Wojciak-Stothard, B., and A.J. Ridley. 2003. Shear stress-induced endothelial cell polarization is mediated by Rho and Rac but not Cdc42 or PI 3-kinases. *J Cell Biol*. 161:429-39.

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*. 163:535-45.

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*. 16:5141-51.

Xiao, K., R.G. Oas, C.M. Chiasson, and A.P. Kowalczyk. 2007. Role of p120-catenin in cadherin trafficking. *Biochim Biophys Acta*. 1773:8-16.

Yamada, A., N. Fujita, T. Sato, R. Okamoto, T. Ooshio, T. Hirota, K. Morimoto, K. Irie, and Y. Takai. 2006. Requirement of nectin, but not cadherin, for formation of claudin-based tight junctions in annexin II-knockdown MDCK cells. *Oncogene*.

Yamada, A., K. Irie, T. Hirota, T. Ooshio, A. Fukuhara, and Y. Takai. 2005a. Involvement of the annexin II-S100A10 complex in the formation of E-cadherin-based adherens junctions in Madin-Darby canine kidney cells. *J Biol Chem*. 280:6016-27.

Yamada, S., S. Pokutta, F. Drees, W.I. Weis, and W.J. Nelson. 2005b. Deconstructing the cadherin-catenin-actin complex. *Cell*. 123:889-901.

Yamaoka-Tojo, M., T. Tojo, H.W. Kim, L. Hilenski, N.A. Patrushev, L. Zhang, T. Fukai, and M. Ushio-Fukai. 2006. IQGAP1 mediates VE-cadherin-based cell-cell contacts and VEGF signaling at adherence junctions linked to angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 26:1991-7.

Yamaoka-Tojo, M., M. Ushio-Fukai, L. Hilenski, S.I. Dikalov, Y.E. Chen, T. Tojo, T. Fukai, M. Fujimoto, N.A. Patrushev, N. Wang, C.D. Kontos, G.S. Bloom, and R.W. Alexander. 2004. IQGAP1, a novel vascular endothelial growth factor receptor

binding protein, is involved in reactive oxygen species--dependent endothelial migration and proliferation. *Circ Res*. 95:276-83.

Yamazaki, D., T. Oikawa, and T. Takenawa. 2007. Rac-WAVE-mediated actin reorganization is required for organization and maintenance of cell-cell adhesion. *J Cell Sci*. 120:86-100.

Yang, J., P. Dokurno, N.K. Tonks, and D. Barford. 2001. Crystal structure of the M-fragment of alpha-catenin: implications for modulation of cell adhesion. *Embo J*. 20:3645-56.

Yokoyama, S., K. Tachibana, H. Nakanishi, Y. Yamamoto, K. Irie, K. Mandai, A. Nagafuchi, M. Monden, and Y. Takai. 2001. alpha-catenin-independent recruitment of ZO-1 to nectin-based cell-cell adhesion sites through afadin. *Mol Biol Cell*. 12:1595-609.

Yuan, S.Y. 2002. Protein kinase signaling in the modulation of microvascular permeability. *Vascul Pharmacol*. 39:213-23.

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*. 22:617-22.

Zhang, G., D.S. Spellman, E.Y. Skolnik, and T.A. Neubert. 2006. Quantitative phosphotyrosine proteomics of EphB2 signaling by stable isotope labeling with amino acids in cell culture (SILAC). *J Proteome Res*. 5:581-8.

Zhang, J., M. Betson, J. Erasmus, K. Zeikos, M. Bailly, L.P. Cramer, and V.M. Braga. 2005. Actin at cell-cell junctions is composed of two dynamic and functional populations. *J Cell Sci*. 118:5549-62.

Zhong, Y., W.M. Brieher, and B.M. Gumbiner. 1999. Analysis of C-cadherin regulation during tissue morphogenesis with an activating antibody. *J Cell Biol*. 144:351-9.

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*. 117:3129-40.

Zhurinsky, J., M. Shtutman, and A. Ben-Ze'ev. 2000. Plakoglobin and beta-catenin: protein interactions, regulation and biological roles. *J Cell Sci*. 113 (Pt 18):3127-39.

Zigmond, S.H. 2004. Formin-induced nucleation of actin filaments. *Curr Opin Cell Biol*. 16:99-105.

Zobiack, N., U. Rescher, S. Laarmann, S. Michgehl, M.A. Schmidt, and V. Gerke. 2002. Cell-surface attachment of pedestal-forming enteropathogenic E. coli induces a clustering of raft components and a recruitment of annexin 2. *J Cell Sci*. 115:91-8.

Stéphanie HEYRAUD

Nouvelle architecture de la jonction adhérente endothéliale

L'intégrité de l'endothélium vasculaire est maintenue par les jonctions intercellulaires, notamment les jonctions adhérentes. Ces jonctions voient leur structure perturbée lors de phénomènes physiologiques tels que l'angiogenèse ou l'inflammation.

Afin de comprendre les mécanismes sous-jacents à la perturbation de la structure des jonctions, nous avons tout d'abord établi la composition protéique du complexe à base de VE-cadhérine des jonctions adhérentes matures de cellules endothéliales primaires confluentes de type HUVEC. Pour cela, nous avons couplé immunoprécipitation et analyse protéomique par spectrométrie de masse (LC-nanoESI-MS/MS). Nous avons ainsi identifié de nouveaux partenaires du complexe à base de VE-cadhérine jamais identifiés auparavant au niveau de la jonction adhérente endothéliale. Parmi ceux-ci se trouvent des protéines liant l'actine telle l'annexine 2. Nos résultats indiquent que l'annexine 2, qui s'accumule à la membrane plasmique au niveau des radeaux de cholestérol, entre en interaction directe avec le complexe à base de VE-cadhérine. Ainsi, l'annexine 2 connecte le complexe jonctionnel au cytosquelette d'actine dans les HUVEC confluentes. L'utilisation de siRNA nous a permis d'établir que l'expression de l'annexine 2 est absolument nécessaire au maintien de la VE-cadhérine à la membrane plasmique. Nos résultats suggèrent que l'annexine 2, connectée à l'actine, arrime le complexe à base de VE-cadhérine au niveau des radeaux de cholestérol. En limitant la diffusion membranaire du complexe jonctionnel, ces interactions aboutissent à une consolidation des jonctions adhérentes ce qui contribue à maintenir l'intégrité de l'endothélium vasculaire. Lorsque les HUVEC sont soumises à des molecules destabilisant les jonctions adhérentes, une délocalisation de l'annexine 2 de la membrane vers le cytosol et une perturbation de la localisation de la VE-cadhérine sont observés. Ceci suggère que le prérequis à l'ouverture des jonctions adhérentes nécessite une rupture de l'interaction existant entre le complexe à base de VE-cadhérine et l'annexine 2.

La moésine, quant à elle, semble interagir avec le complexe à base de VE-cadhérine dans les jonctions immatures formées entre cellules sub-confluentes. La moésine serait donc impliquée dans l'établissement des contacts intercellulaires précoces plutôt que dans la maturation des jonctions endothéliales.

Mots-clés :

VE-cadhérine, Jonction adhérente, Actine, Annexine 2