VE-cadhérine dans l'inflammation et le cancer: phosphorylation et clivage

Tiphaine Mannic

▶ **To cite this version:**

Tiphaine Mannic. VE-cadhérine dans l'inflammation et le cancer: phosphorylation et clivage. Biologie cellulaire. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2009. Français. NNT : . tel-00526108

HAL Id: tel-00526108
https://theses.hal.science/tel-00526108

Submitted on 13 Oct 2010

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 Sciences Du Vivant

Laboratoire Physiopathologies vasculaires : interactions cellulaires, signalisation et vieillissement, U INSERM 882,
CEA GRENOBLE

THESE

Réalisée sous la direction du **Dr Isabelle Vilgrain**

Pour l'obtention du grade de

Docteur de l'Université Joseph Fourier Grenoble 1

Discipline : Biologie cellulaire

VE-cadhérine dans l'inflammation et le cancer : Phosphorylation et clivage

Présentée et soutenue publiquement par

Tiphaine MANNIC

Le 29 octobre 2009

Composition du jury :

Président :	Dr. Philippe HUBER
Rapporteurs :	Dr Fabrice SONCIN Pr. Evelyne DUPUY
Examinateurs :	Dr. Andrew BAIRD Dr. Ewa NINIO Dr. Isabelle VILGRAIN

Université Joseph Fourier Grenoble 1

Ecole Doctorale Chimie Sciences Du Vivant

Laboratoire Physiopathologies vasculaires : interactions cellulaires, signalisation et vieillissement, U INSERM 882,
CEA GRENOBLE

THESE

Réalisée sous la direction du **Dr Isabelle Vilgrain**

Pour l'obtention du grade de

Docteur de l'Université Joseph Fourier Grenoble 1

Discipline : Biologie cellulaire

VE-cadhérine dans l'inflammation et le cancer : Phosphorylation et clivage

Présentée et soutenue publiquement par

Tiphaine MANNIC

Le 29 octobre 2009

Composition du jury :

Président :	Dr. Philippe HUBER
Rapporteurs :	Dr Fabrice SONCIN Pr. Evelyne DUPUY
Examinateurs :	Dr. Andrew BAIRD Dr. Ewa NINIO Dr. Isabelle VILGRAIN

REMERCIEMENTS

J'ai attendu jusqu'au dernier moment pour écrire ces remerciements car la thèse, ce n'est pas que le manuscrit et la soutenance qui ponctuent quatre années de travail, ce sont aussi de nombreuses rencontres…

En premier lieu, je tiens à remercier Fabrice SONCIN et Evelyne DUPUY d'avoir bien voulu être les rapporteurs de ce travail, ainsi que les autres membres du jury, Ewa Ninio, Andrew Baird de s'être déplacés (de bien loin, pour certains) pour juger ma soutenance et mon travail.

Ensuite, je tiens à remercier le Dr Philippe HUBER, président de mon jury, qui m'a accueillie dans son laboratoire pendant ces quatre années, le laboratoire « Développement et Vieillissement de l'Endothélium » qui est devenu au cours de ma thèse « LAPV U882 ».

Je remercie également sincèrement Isabelle d'avoir été mon guide au cours de toutes ces années. Quand je suis arrivée au laboratoire, tu m'as tout de suite emportée dans ton sillage par ta passion de la VE-cadhérine et de son intérêt médical et scientifique évident !!. Nous avons passé des moments difficiles mais ces moments m'ont aidée à mieux me connaitre sur le plan professionnel comme personnel.

Je veux aussi remercier tous les chercheurs qui sont passés dans ce laboratoire : Daniel pour ta grande simplicité et ton accessibilité, Emmanuelle, que j'ai appris à connaitre et à apprécier au fil des années, Marie-Hélène, pour ton incroyable connaissance des personnes et des recoins du CEA et ta gentillesse, Gilles, pour nos nombreuses discussions autour de la thèse, Danielle pour tous tes encouragements et Anne-sophie pour nos nombreuses discussions scientifiques (ou pas…).

Je tiens aussi à exprimer tous mes remerciements au personnel « technique » de ce laboratoire et notamment à Stéphanie, qui, en plus de m'avoir bien guidée et aidée dans mes premiers pas avec l'immunofluorescence m'a également permis de rester à Grenoble en attendant d'avoir mon financement de thèse..

Je ne peux oublier Francine : avec ton expertise technique et tes nombreux savoir-faire vraiment impressionnants, ta patience et ton oreille attentive.

Beaucoup plus récemment, c'est Mélanie qui a pris le relai et qui m'a énormément aidée à garder le cap. Je te souhaite de trouver le poste de tes rêves pour continuer à apprendre ce métier passionnant…De collègue, tu es devenue une amie avec laquelle j'ai beaucoup discuté et plaisanté et tout cela a été primordial pour tenir le coup …

Un petit paragraphe pour remercier tous les étudiants en master qui sont passés par là pendant quelques mois et qui ont apporté leur fraicheur et m'ont ainsi aidée à prendre parfois le recul nécessaire, entre autre : Julie, Lisa, Jane, Mélanie, Adama, qui a pris le relai auprès d'Isabelle, …

J'en arrive au paragraphe qui concerne mes collègues thésards et post-docs avec qui les discussions étaient faciles…Certains sont devenus des amis…
De Yann, qui a amorcé cette étude sur la phosphorylation de la VE-cadhérine à Adeline qui est la petite dernière arrivée au laboratoire en passant par Bastien, Stef H, Steph R, Sandra, Mylène, Boubacar, Marion, Alice et Emilie dont le passage a été trop court…
Je n'oublierai pas nos nombreuses parties de rigolades (ou pas…) qui sont indispensables à une bonne ambiance dans un laboratoire. Je souhaite également beaucoup de bonheur à Adeline et Emilie avec leurs petits bouts !

Une thèse, c'est également des collaborations et une de ces collaborations m'a permis de rencontrer Carole, avec laquelle je partage de grands moments d'amitié. Je te souhaite de t'épanouir dans ta thèse à Reims où, compte sur moi, je passerai te rendre visite.

J'en arrive aux remerciements plus personnels..
Alice, tu es devenue ma « coloc » en juillet 2007, je ne pensais pas que travailler, vivre dans le même appartement et manger à presque tous les repas ensemble était possible, mais on l'a fait et souvent dans la bonne humeur, je te souhaite beaucoup de courage pour la fin de ta thèse et te remercie du soutien permanent que tu as pu m'apporter.
En parlant de colocation, je remercie aussi Emmanuelle qui a été une « coloc » de rêve pendant deux ans et sur laquelle j'ai pu compter en toute occasion…

Merci aussi à mes amis de (presque) toujours, Céline, ma plus ancienne et meilleure amie, Julien, Aurélia et Marie qui étaient avec moi en maîtrise et que j'apprécie énormément. Bonne chance à toi, Aurélia pour la fin de ta thèse…

Je remercie également mes parents et ma famille, en particulier Anne qui a contribué à ma vocation dans la recherche.

Enfin, je voulais remercier Thibault pour son soutien tout au long de cette fin de thèse, dans les moments les pires comme les meilleurs et j'espère conserver ce soutien tout au long de ma vie.

SOMMAIRE

INDEX DES FIGURES ET TABLEAUX 6

LISTES DES ABBREVIATIONS 7

AVANT PROPOS 9

INTRODUCTION 12

I. LE SYSTEME VASCULAIRE 13
I.1. Généralités 13
I.1.1. Les artères 13
I.1.2. Les veines 14
I.1.3. La microcirculation : 14
I.1.4. Les vaisseaux lymphatiques 15
I.2. Structure générale des vaisseaux sanguins 16
I. 3. Développement du système vasculaire 17
I.3.1. La vasculogenèse 17
I.3.2. L'angiogenèse 18

II. REGULATION DE L'ANGIOGENESE 19
II.1. Les Facteurs de croissance : 20
II.1.1. Le Vascular endothelial growth factor (ou VEGF) 20
II.1.2. Le facteur de croissance de fibroblastes (FGF) 23
II.1.3. Le PDGF ou acteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF) 23
II.1.4. Le système des angiopoiétines (Ang), et de leur récepteurs Tie 24
II.1.5. Les éphrines : 24
II.1.6. Les systèmes sémaphorines-plexines-neuropilines 25
II.1.7. Les nétrines- uncoordinated-5 (UNC5) 25
II.1.8. Les Slits-Roundabouts 25
II.1.9. Les intégrines 26
II.2. Rôle des Protéases 26
II.3. Hypoxie et angiogenèse 26
II.4. Role des cellules inflammatoires 27
II. 4.1. Une cytokine pro-angiogénique : Le TNFα 28
II.4.2. Cytokines antiangiogéniques 29
II.5. Ciblage de l'angiogenèse : exemple de thérapies anti angiogéniques 30
II.5.1. Exemple de thérapie ciblée visant VEGF 30

II.5.2. Exemple de thérapie ciblée visant le TNFα 30

III. L'ENDOTHELIUM VASCULAIRE ADULTE MATURE 31

III.1. Définition et structure 31

III.2. Les grandes fonctions de l'endothélium vasculaire 31

III.2.1. Barrière sélective 31

III.2.2. Synthèse des constituants de la membrane basale et du sous-endothélium 32

III.2.3. Fonctions anti-thrombogéniques 32

III.2.4. Régulation de la pression vasculaire par les cellules endothéliales 32

III.3. Perméabilité endothéliale 34

III.3.1. La voie transcellulaire (passage au travers de la cellule endothéliale) 34

III.3.2. La voie paracellulaire (passage par les jonctions endothéliales) 34

IV. REGULATION DE LA PERMEABILITE ENDOTHELIALE ET JONCTIONS ENDOTHELIALES 36

IV.1.Régulation de la perméabilité endothéliale par le cytosquelette 36

IV.2. Régulation de la perméabilité endothéliale par phosphorylations 37

IV.2.1. Rappel sur les processus de Phosphorylation 37

IV.2.2. Multiplicité des protéines kinases 37

IV.2.3. Les substrats de Protéines kinases dans la cellule endothéliale et leur influence sur la perméabilité endothéliale 39

IV.3. Les jonctions endothéliales 40

IV.3.1. les complexus adhaerentes 42

IV.3.2 Les jonctions serrées ou zonula occludens 43

IV.2.3. Les jonctions communicantes ou jonctions gap 47

IV.2.4. Les jonctions adhérentes 50

IV.2.5. Les autres systèmes d'adhérence 50

V. LA VE-CADHERINE, CADHERINE DES JONCTIONS ADHERENTES ENDOTHELIALES 54

V.1. Structure de la VE-cadhérine 54

V.1.1. Auto-assemblage de la VE-cadhérine 55

V.1.2.Domaine cytoplasmique de la VE-cadhérine 56

V.2. Fonctions de la VE-cadhérine 56

V.3 Régulation des propriétés adhésives de la VE-cadhérine 57

V.3.1 Régulation par les GTPases 57

V.3.2 Régulation par les caténines 58

V.3.3 Régulation par la protéine p120 59

V.3.4 Régulation par un autre facteur : le calcium 59

V.3.5. Régulation de la VE-cadhérine par phosphorylation 60

V.4. Clivage de la VE-cadhérine 62

VI. LA CELLULE ENDOTHELIALE DANS LE CANCER ET L'INFLAMMATION 63

VI.I. Le cancer 63
VI.1.1. Généralités et données épidémiologiques 63
VI.2 L'inflammation 65
VI.2.1. Mécanismes généraux 65
VI.2.2. Pathologies inflammatoires 67
VI.3. Cancer et inflammation 68

VII. LES BIOMARQUEURS 69
VII.1. Définitions : 69
VII.2.Classification des biomarqueurs de l'angiogenèse 70
VII.2.1. Les biomarqueurs moléculaires 70
VII.2.2. Les Biomarqueurs biologiques 70
VII.2.3. Les Biomarqueurs fonctionnels 71
VII.3. Les cadhérines 72
VII.3.1. Les cadhérines solubles 72
VII.3.2. Fonction des cadhérines solubles 72

VIII. OBJECTIFS DU PROJET DE RECHERCHE 74

RESULTATS 75

CHAPITRE I : EXISTENCE D'UNE PHOPSHORYLATION SUR TYROSINE DE LA VE-CADHERINE DANS L'INFLAMMATION ET LE CANCER: MECANISMES CELLULAIRES ET MOLECULAIRES 76

I. PHOPSHORYLATION SUR TYROSINE DE LA VE-CADHERINE DANS LE CANCER: MECANISMES CELLULAIRES ET MOLECULAIRES 77
I. 1. Contexte: 77
I.2 Article 1 77
I.3 Discussion : Phosphorylation sur tyrosine dans le réseau vasculaire tumoral 105

II. PHOSPHORYLATION SUR TYROSINE DE LA VE-CADHERINE DANS L'INFLAMMATION: 109
II. 1 Contexte: 109
II.2 Article 2 109
II.3. Discussion 123

CHAPITRE II : INHIBITEURS POTENTIELS DE LA PHOSPHORYLATION SUR TYROSINE DE LA VE-CADHERINE 125
II.1 Contexte: 126
II.2. Résultats expérimentaux: 127
II.3. Dicussion et conclusion 130

CHAPITRE III : VE-CADHERINE BIOMARQUEUR DANS LE CANCER 133
III.1. Contexte 134
III.2 Article 3 135
III.3. Discussion 156

DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSIONS 159

I. PHOSPHORYLATION SUR TYROSINE DE LA VE-CADHERINE DANS L'INFLAMMATION ET LE CANCER 160

II. INHIBITEURS POTENTIELS DE LA PHOSPHORYLATION SUR TYROSINE DE LA VE-CADHERINE 162

III. LA VE-CADHERINE : BIOMARQUEUR DANS LE CANCER ET L'INFLAMMATION 164

BIBLIOGRAPHIE 166

INDEX DES FIGURES ET TABLEAUX

Figure 1 : Schématisation de la paroi d'un vaisseau sanguin (p 16)
Figure 2 : Représentation schématique des mécanismes de vasculogenèse et d'angiogenèse (p 19)
Figure 3 : Structure et interactions des différents VEGFs, leurs récepteurs (VEGFR) et corécepteurs (NRP). (p 21)
Figure 4 : Description des voies de signalisation VEGF-dépendantes (p 23)
Figure 5 : Implications de l'endothélium vasculaire en physiopathologie
(p 33)
Figure 6 : Les deux voies principales de migration des leucocytes à travers l'endothélium : para- et transcellulaires (p 35)
Figure 7 : Régulation de l'activité catalytique de Src (p 39)
Figure 8 : Deux descriptions de l'organisation moléculaire des jonctions endothéliales (p 42)
Figure 9 : Organisation structurale des connexons et des jonctions gap (p 48)
Figure 10 : Le cycle des connexines et leurs interactions potentielles (p 50)
Figure 11 : Mécanismes de signalisation par PECAM (p53)
Figure 12 : Représentation de la structure de la VE-cadhérine (p 55)
Figure 13 : Arrangement en hexamères des fragments recombinants EC1-4 de la VE-cadhérine (p 56)
Figure 14 : Structure de la VE-cadhérine (p 56)
Figure 15 : Embryons de souris VE-cadhérine +/+ et -/-. (p 57)
Figure 16 : Les voies de phosphorylations de la VE-cadhérine (p 62)
Figure 17 : Image de micrographie électronique de l'intérieur de vaisseaux sanguins normal (gauche) et tumoral (droite) (p 65)
Figure 18 : Étapes essentielles du phénomène inflammatoire vasculaire : roulement, adhésion et transmigration des leucocytes à travers l'endothélium (p 66)
Figure 19: Mécanismes de régulation complexe entre les cellules tumorales et du système immunitaire (p 69)
Tableau 1 : Relation entre le taux de VEGF et la progression tumorale dans différents types de cancers (p 71)

LISTES DES ABBREVIATIONS

ADAM	A Disintegrin And Metalloprotease
ADN	Acide désoxyribonucléique
AINS	anti-inflammatoires non-stéroïdiens
AMPc	adénosine monophosphate cyclique
Ang	Angiopoietine
APC	Adenomatous Polyposis Coli
ARN	Acide ribonucléique
CHO	Chinese Hamster Ovary
CML	Cellule Musculaire Lisse
COX	cyclo-oxygénase
Csk	C-terminal Src kinase
DD	Death Domain
Dep	Density-enhanced phosphatase
EGF	Epidermal Growth Factor
EDTA	Ethylene Diamine Tetra Acetic
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
eNOS	NO synthase endothéliale
FADD	FAS-associated death domain
FAK	Focal adhesion kinase
FGFa, b	Fibroblaste Growth Factor acid, basic
GTP	Guanosine Tri Phosphate
HGF	Hepatocyte Growth Factor
HIF	Hypoxia Induced Factor
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cell
ICAM	Inter-Cellular Adhesion Molecule
IMID	Immune Mediated Inflammatory Diseases)
IL	InterLeukine
jpc	jours post-coîtum
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
MEC	Matrice extracellulaire
MLCK	Myosin Light Chain kinase

MMP	Matrix metalloproteinase
PAK	p21-activated kinase
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PDK	PtdIns(3,4,5)-dependant kinase
PECAM	Platelet/endothelial cell adhesion molecule
PI3K	Phosphatidil inositol 3-kinase
PKA	Protein kinase A
PKC	Protein kinase C
PLC	Phospholipase C
PlGF	Placental Growth Factor
PD-ECGF	Platelet-derived endothelial cell growth factor
PTB	Phosphotyrosine binding domain
PTP	Protein tyrosine phosphatase
ROS	Reactive Oxygen Species
RTK	Receptor Tyrosine kinase
SFK	Src Family Kinase
SH	Src homology
Sos	Son of sevenless
TADC	Tumor-associated dendritic cells
TAM	Tumor-associated macrophages
TEM	Trans-endothelial Migration
TIL	Tumor-infiltrating lymphocyte
TNF	Tumor Necrosis Factor
TRADD	TNFR-associated death domain
VCAM	Vascular Cell Adhesion Molecule
VLA	Very Late Antigen
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGF-R	Récepteur au VEGF

AVANT PROPOS

Le travail présenté dans ce mémoire a fait l'objet de plusieurs publications en cours de soumission. Ces résultats ont également été présentés sous formes de communications affichées ou orales.

Publications scientifiques :

-**Mannic T**, Sidibé A, Le Henaff C, Bouillot S, Lemasson B, Contreres JO, Rémy C, Barbier E, Tobelem G, Huber P, Dupuy E, Vilgrain I. *Evidence for in vivo Y^{658} VE-cadherin phosphorylation in tumoral angiogenesis: implication of Syk pathway (soumis Circulation Research)*

-F Cand, L Pelletier, **T Mannic**, S Boccard, F Laporte, J-L Laffont, A-S Gauchez, D Gulino-Debrac, P Huber, F Berger, I Vilgrain. *Human Lipoproteins, a new serum compartment for tracking biomarkers: an illustrative study of VE-cadherin in malignant gliomas (Soumis NEJM)*

-L Bouillet, **T Mannic**, C Massot, C Drouet, D Ponard, P Huber, I Vilgrain Bradykinin-induced angioedema: role for Vascular Endothelial (VE)-Cadherin (Soumis à JACI)

-F Cand , Y Wallez, L Pelletier, **T Mannic**, P Huber F Berger, I Vilgrain. VE-cadherin tyrosine phosphorylation in glioblastomas: identification of a therapeutic target site (En préparation)

Communications orales

-Colloque Phosphorylation de Protéines, Anglet, 23-26/09 2006

Tiphaine Mannic, Aude Villemain, Jean-Olivier Contreres , Philippe Huber, Gérard Tobelem, Evelyne Dupuy and Isabelle Vilgrain. *Phosphorylation sur tyrosine de la VE-cadhérine : détermination tumorale dans un modèle murin d'induction de tumeurs hépatiques*

-17th Meeting of the Association de Recherche sur la Polyarthrite. Ecole Normale Supérieure Paris, Novembre 2006.

Tiphaine Mannic « Phosphorylation sur tyrosine de la VE-cadhérine : rôle dans l'inflammation et la polyarthrite rhumatoïde ».

-First Jacques Courtin Meeting. Ecole Normale Supérieure Paris, Novembre 2007.

Tiphaine Mannic « Modifications structurales de la VE-cadhérine dans l'inflammation et la polyarthrite rhumatoïde »

-2nd Meeting of Arthritis Courtin Fondation. Paris, France, Novembre 2008.

T.Mannic Modifications covalentes de la VE-cadhérine dans l'inflammation et la Polyarthrite Rhumatoïde

Communications affichées

-Journées de la Recherche Médicale. Université J Fourier, Grenoble, Avril 7-8 2006

Yann Wallez, Laurent Pelletier,**Tiphaine Mannic**, Francine Cand, Philippe Huber, François Berger, Isabelle Vilgrain. *Angiogenèse dans les glioblastomes humains: phosphorylation sur tyrosine de la VE-cadhérine*

-Second meeting of Canceropole CLARA. Grenoble. 19-20 March 2007.

I. Vilgrain, F Cand , L Pelletier , **T Mannic**, F Berger, P Huber. La cadhérine de l'endothélium vasculaire: un marqueur circulant de la chimiorésistance dans les glioblastomes humains. Bull Cancer, 94:S9.

-Canreropole CLARA : Structuration of the research network on brain tumors. Lyon, 25 Mai 2007

F Cand , L Pelletier Y Wallez, **T Mannic**, P Huber, F Berger, I Vilgrain. Modifications structurales de la VE-cadhérine dans les glioblastomes humains: phosphorylation sur tyrosine et clivage.

-Gordon Research Conference on Angiogenesis & Microcirculation. Salve Regina University in Newport, RI., USA, 19-23 August 2007.

F Cand, L Pelletier, Y Wallez, **T Mannic**, P Huber, F Berger, I Vilgrain. Vascular endothelial (VE)-cadherin: Stuctural modifications in tumoral angiogenesis.

-Journée de la Recherche Médicale. Grenoble. April 2008

L. Bouillet, C.Drouet, D.Ponard, **T.Mannic**, C.Massot, P.Huber, I.Vilgrain Angioedème bradykinique et perméabilité vasculaire endothéliale : analyse de la VE-Cadhérine

-Third scientific days of canceropole CLARA Grenoble, France, 19-20 March 2008.

T.Mannic, JO. Contreres, E. Dupuy, G. Tobelem, P. Huber and I. Vilgrain. Tumoral Angiogenesis in hepatocellular carcinoma: evidence for VE-cadherin tyrosine phosphorylation and implication of ephrinB2 pathway. Bull Cancer Mars 2008

-26th annual meeting of the Groupe de Réflexion sur la Recherche Cardiovasculaire Nancy, France. 2-3 April 2009

T Mannic, JO Conteres, E Dupuis, G Tobelem, Benjamin, C Remy, E P Huber, O Vittecocq, I Vilgrain *La VE-cadhérine dans l'inflammation et le cancer*

-Gordon Research Conference on Angiogenesis 2-7 Aout 2009, Newport, USA

F Cand, L Pelletier, **T Mannic**, S Boccard, F Laporte, J-L Laffont, A-S Gauchez, D Gulino-Debrac, P Huber, F Berger, I Vilgrain *Human Lipoproteins, a new serum compartment for tracking biomarkers: an illustrative study of VE-cadherin in malignant gliomas*

INTRODUCTION

I. LE SYSTEME VASCULAIRE

Le système vasculaire comprend le cœur, les artères, les artérioles, les capillaires, les veines et les veinules. La fonction primaire du système vasculaire est d'acheminer, par le sang, l'oxygène et les nutriments indispensables au fonctionnement des tissus. Au sein d'un individu, le développement des vaisseaux sanguins permet la croissance des organes et la réparation des tissus. Pourtant, lorsque trop fortement stimulé, ce réseau nourricier autorise le développement tumoral et la dissémination métastatique, ou, à l'inverse, lorsque trop peu développé, il induit une dégénération tissulaire. L'espoir de développer des thérapies, ciblant ce réseau vasculaire, a naturellement engendré ces dix dernières années un formidable essor des recherches dans ce domaine.

I.1. Généralités

Tout organe nécessite pour sa survie un approvisionnement constant en oxygène et en nutriments. Chez les animaux primitifs comme le ver *Caenorhabditis elegans* ou la mouche *Drosophila melanogaster*, l'oxygène diffuse passivement dans tout l'organisme. Cependant, la diffusion passive de l'oxygène dans les tissus ne permet pas aux organismes d'excéder 150 µm. L'apparition de vaisseaux sanguins au cours de l'évolution a donc permis l'émergence d'animaux de taille plus importante. Outre l'approvisionnement constant en oxygène et en nutriments, l'appareil circulatoire prend en charge l'évacuation des déchets métaboliques. Le système vasculaire est également le support du transport des systèmes endocriniens et immunitaires. Il joue aussi un rôle central dans l'osmo- et la thermorégulation.

Chez les vertébrés, il existe trois types de vaisseaux sanguins : les artères, les veines et les capillaires, auxquels il faut ajouter les vaisseaux lymphatiques.

I.1.1. Les artères

Les artères sont des gros vaisseaux qui partent du cœur et apportent le sang oxygéné aux organes. Les artères sont caractérisées par une forte pression sanguine, qui impose une paroi épaisse et musculeuse, et une circulation pulsatile, résultat de la pulsation cardiaque. La composante élastique des artères, d'abord majoritaire au voisinage du cœur, diminue à distance dans les organes et tissus au profit de la couche musculaire. Cette particularité permet d'absorber la pulsatilité de l'écoulement sanguin, qui devient parfaitement continu et régulée à l'entrée dans les capillaires.

I.1.2. Les veines

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

I.1.3. La microcirculation :

La microcirculation est caractérisée par une arborescence organisée en unités fonctionnelles artérioles, capillaires, veinules.

- **Artérioles**

Les artérioles primaires, de diamètre compris entre 50 et 120 µm, se ramifient directement depuis les artères et sont innervées majoritairement par les fibres nerveuses sympathiques. Elles donnent progressivement naissance à des artérioles de deuxième, troisième et quatrième ordre de distribution statistique, de diamètres de 50-90, 25-50 et 8-25 µm, respectivement. Les artérioles terminales, qui sont peu innervées, vont donner naissance aux méta-artérioles débouchant soit sur le lit capillaire, soit directement dans les veinules par un shunt de jonction. Le réseau artériolaire a un rôle important dans la régulation locale de la perfusion (vasomotricité) et de l'apport d'oxygène aux tissus. C'est un système résistif où se réalise l'essentiel du gradient de pression hydrostatique artérioveineux.

- **Capillaires**

Les capillaires ont un diamètre de 3 à 10 µm et une paroi très fine (0,5 µm). Le réseau capillaire assure l'essentiel des échanges entre le secteur intravasculaire et le secteur interstitiel des organes par un mécanisme passif de diffusion simple permettant l'échange de molécules. La densité capillaire est un élément fondamental de l'oxygénation tissulaire. Elle est variable d'un organe à l'autre : de 300 à 600 capillaires par millimètre carré dans les muscles périphériques à 2000 à 3500 dans le myocarde. Leur structure est composée d'une

simple couche de cellules endothéliales entourée d'une membrane basale et de fibres de collagène sans cellules musculaires lisses. Contrairement aux veines, les capillaires ne peuvent contenir qu'un très faible volume de sang et leur section étroite produit une forte résistance à l'écoulement sanguin. Les capillaires sont organisés en réseaux très interconnectés.

On distingue ainsi trois types de capillaires:

-Les capillaires continus :

La paroi des capillaires est composée d'une couche de cellules endothéliales jointives reposant sur une lame basale continue. Il existe cependant d'étroites fentes entre les cellules constituant des ouvertures potentielles. Ces capillaires sont principalement retrouvés au niveau des muscles, du tube digestif et des poumons. Dans le système nerveux central, ils ont la particularité d'être constitués de jonctions de type *occludens*, l'endothélium constituant la barrière hémato-encéphalique,

-Les capillaires fenêtrés :

Ils sont composés de cellules endothéliales reposant sur une lame basale continue et perforées par de petits pores de diamètre de 70 nm. Ces capillaires sont importants dans les tissus ayant de nombreux échanges moléculaires comme les intestins, les glomérules rénaux, les plexus choroïdes et des glandes exocrines et endocrines.

-Les capillaires discontinus ou sinusoïdes :

Les capillaires discontinus sont composés de cellules endothéliales possèdant des ouvertures transcytoplasmiques suffisamment larges pour le passage de protéines plasmatiques et reposant sur une membrane basale discontinue. Ils sont principalement retrouvés dans le foie, la rate et la moelle osseuse.

-Les veinules :

Les veinules post-capillaires sont formées de la réunion de plusieurs capillaires dont la paroi est fine, continue et dépourvue de cellules musculaires lisses. Le diamètre des veinules est supérieur de 20% à celui des artérioles de même ordre. Cette particularité leur permet d'être le siège d'échanges libres entre le plasma et le fluide interstitiel. Les veinules convergent en veinules dites collectrices de diamètre supérieur à 30 µm et entourées de cellules musculaires lisses.

I.1.4. Les vaisseaux lymphatiques

La fonction principale du système vasculaire lymphatique consiste à drainer de façon unidirectionnelle ce fluide depuis les organes vers la circulation sanguine. Les vaisseaux

lymphatiques ont aussi pour fonction primordiale la défense immunitaire. En effet, des bactéries, des virus, des cellules cancéreuses, des leucocytes extravasés et des cellules présentatrices d'antigène peuvent se trouver dans ce réseau lymphatique et être ainsi éliminés. La lymphe est filtrée par les ganglions lymphatiques, qui concentrent de manière favorable les antigènes et les cellules de l'immunité pour initier la réponse immunitaire spécifique. Les capillaires lymphatiques se distinguent des capillaires sanguins par leur faible recouvrement pericytaire, des extrémités fermées, un calibre plus grand et plus irrégulier, une lame basale très discontinue ou absente, et des filaments d'ancrage les reliant à la matrice extracellulaire, prévenant ainsi le collapsus en cas de haute pression interstitielle.

I.2. Structure générale des vaisseaux sanguins

Les vaisseaux sanguins sont, en fait, constitués de trois tuniques morphologiquement distinctes: l'intima, la média et l'adventice (Figure 1). L'intima, couche la plus interne du vaisseau est formée d'un tapis de cellules endothéliales appelé endothélium vasculaire, qui est un épithélium simple pavimenteux tapissant l'intérieur de tous les vaisseaux par analogie avec l'épithélium, monocouche cellulaire tapissant l'intérieur de tous les organes. L'endothélium repose sur la lame basale, qui est une fine couche de tissu conjonctif. La média contient exclusivement des cellules musculaires lisses (CML) et des constituants extracellulaires : fibres élastiques, fibrilles d'élastine, faisceaux et fibrilles de collagène, protéoglycanes. Cette couche est très variable selon les différents territoires vasculaires, et la présence et l'organisation aussi bien des fibres élastiques que des CML, varient selon la fonction des vaisseaux. L'adventice, enveloppe conjonctive qui contient les éléments nerveux du vaisseau, est peu ou très présente selon le type de vaisseaux. En général, elle est constituée de fibres de collagène et contient également quelques fibres élastiques épaisses et des fibroblastes.

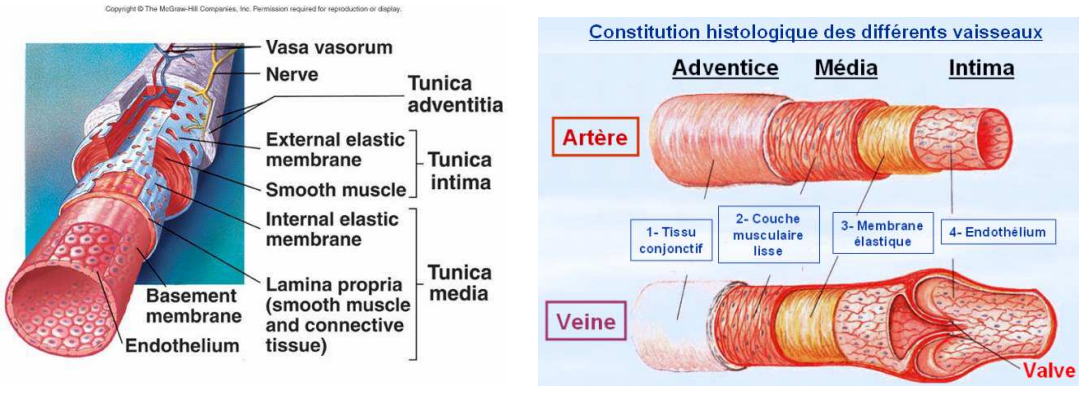


Figure 1 : Schématisation de la paroi d'un vaisseau sanguin. D'après http://www.iav.ac.ma/veto/filveto/guides/phys/physiopharmazine/imagecircul/Image9.png et http://www.rci.rutgers.edu/~uzwiak/AnatPhys/Blood_Vessels_files/image002.jpg .

I. 3. Développement du système vasculaire

Le système cardiovasculaire est le premier organe fonctionnel qui se développe chez l'embryon vertébré et qui est nécessaire à sa survie. Il a évolué pour assurer l'entretien de la fonction d'échange gazeux, d'apport nutritifs et d'enlèvement de déchets métaboliques et contribue au contrôle de température et de vasodilation. Plusieurs mécanismes génétiques et épigénétiques sont impliqués dans le développement primitif du système vasculaire. Les événements coordonnés que sont de l'activation des cellules endothéliales conduisant à leur prolifération, migration, alignement, formation de tubes, branchement et anastomoses sont collectivement appelés morphogenèse vasculaire et nécessite deux processus successifs : la vasculogenèse et l'angiogenèse **(Risau, 1997)**.

I.3.1. La vasculogenèse

On appelle " vasculogenèse " les événements embryologiques initiaux de la spécification de précurseurs endothéliaux (angioblastes) qui se différencient et forment des tubules de cellules endothéliales qui se réunissent en plexus vasculaires primitifs. On peut distinguer la vasculogenèse intra- et extra-embryonnaire.

- **La vasculogenèse intra-embryonnaire**

Le développement vasculaire commence dans le sac vitellin extra-embryonnaire, où la vasculogenèse présente la particularité d'être étroitement associée aux premiers stades de l'hématopoïèse.**(Risau, 1995)**. La vasculogenèse consiste en la formation des premiers vaisseaux sanguins intra-embryonnaires et du plexus vasculaire primaire dans le sac vitellin. Elle n'est pas forcément associée au développement hématopoïétique mais permet la différenciation d'hémangioblastes qui s'assemblent pour constituer les ébauches des aortes dorsales et des veines cardinales, sans formation et remodelage préalables d'un plexus capillaire primitif. La première description des progéniteurs endothéliaux ou angioblastes revient à T. Asahara en 1997 **(Asahara, 1997)** qui a montré que des cellules $CD34^+$ isolées à partir de sang périphérique humain et ensemencées sur fibronectine étaient capables de générer des cellules ayant des caractéristiques identiques aux cellules endothéliales. En 1998, dans un modèle de transplantation chez le chien, Shi observe la colonisation d'une greffe en Dacron® par des cellules $CD34^+$ d'origine médullaire **(Shi, 1998)**. Leur phénotype est caractérisé par la présence de trois marqueurs, CD133, CD34 et VEGFR-2, dont l'expression est liée au degré de maturation : la migration de la moelle osseuse vers le sang s'accompagne d'une diminution de l'expression de CD133/CD34, avec acquisition de marqueurs typiques de

la lignée endothéliale (CD31, VE-cadhérine, facteur Willebrand, *Endothelial Nitric Oxide Synthetase* (eNOS), E-sélectine) **(Peichev, 2000, Gehling, 2000)**.

- **La vasculogenèse extra-embryonnaire**

Elle consiste en la formation de capillaires à partir de cellules endothéliales originaires de cellules mesodermales et du plexus vasculaire, établis avant que commencent les battements du cœur. Le développement du réseau vasculaire de certains organes issus de l'endoderme, tels que le foie, le poumon, le pancréas, l'estomac/intestin et la rate, se produit par vasculogenèse extra-embryonnaire.

I.3.2. L'angiogenèse

L'angiogenèse est définie comme l'extension et le remodelage du réseau vasculaire primitif, pour permettre son extension et sa réorganisation en un arbre vasculaire hierarchisé, optimisé pour remplir des fonctions de conduction et d'échange. L'angiogenèse peut se dérouler suivant plusieurs modalités. Le réseau capillaire primitif est remodelé par des processus de croissance, de différenciation et d'organisation des plexus primitifs. Le bourgeonnement et l'intussusception sont les deux mécanismes participant au remodelage vasculaire.

- **Le bourgeonnement :**

Ce mécanisme consiste en l'activation de ces cellules, ce qui entraine une dégradation de la membrane basale et de la matrice extracellulaire environnante. Puis la migration orientée des cellules endothéliales est suivie d'une phase prolifération et d'une différenciation en une structure de type capillaire pour former un réseau vasculaire. Cette angiogenèse est importante au cours de la vascularisation de tissus avasculaires dans le système nerveux central, le muscle squelettique et la croissance vasculaire du corps jaune après l'ovulation. L'angiogenèse par bourgeonnement procède de manière analogue à la morphogenèse des tubes épithéliaux de la trachée chez la Drosophile. Pendant ce processus, des cellules uniques sont sélectionnées pour former le 'tip' (l'extrémité) d'un bourgeon ; ces cellules répondent au facteur FGF (branchless) par une extension des filopodes et prennent la tête du bourgeon croissant. Les cellules situées en arrière suivent, mais ne deviennent pas 'tip' **(Ghabrial, 2006)**.

- **L'intussusception**

Ce mécanisme consiste en un élargissement et une séparation des vaisseaux déjà formés. **(Burri et al, 2004)**. Deux vaisseaux immatures peuvent également fusionner pour n'en former qu'un seul de plus gros diamètre **(Wilting et al, 1995)**.

La maturation des vaisseaux sanguins se réalise ensuite par l'établissement d'un mur vasculaire par recrutement de cellules musculaires lisses et de pericytes dont l'origine dépend de la localisation dans l'embryon **(Gittenberger, 1999)**. Cette étape entraine une stabilisation du réseau vasculaire avec arrêt des processus d'angiogenèse et leur permet d'acquérir leur structure définitive, nécessaire au contrôle de l'hémodynamisme.

Les facteurs de régulation de ces deux mécanismes sont différents : FGF2 pour le premier et VEGF pour le second (Figure 2). **(Sato, 1995 ; Suri, 1996 ; Hellstom, 1999 ; Lamzus, 2004 ; Augustin, 2003 ; Gale, 2001 ; Shin, 2001)**.

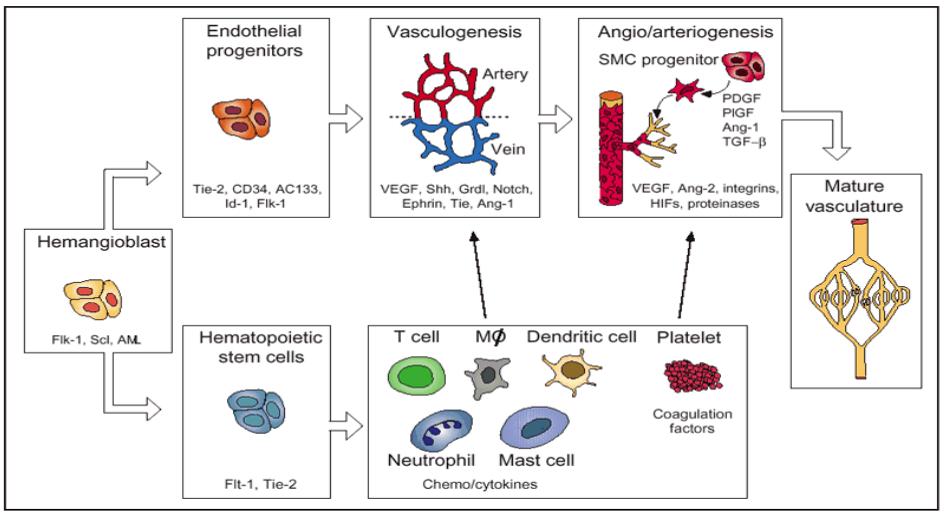


Figure 2 : Représentation schématique des mécanismes de vasculogenèse et d'angiogenèse. D'après **Carmeliet, 2003**.

II. REGULATION DE L'ANGIOGENESE

L'angiogenèse est le résultat d'un équilibre dynamique entre des facteurs activateurs (angiogéniques) et des facteurs inhibiteurs (angiostatiques) comprenant des facteurs de croissance, des cytokines (chimiokines, hormones, neuropeptides), des protéines de la matrice extracellulaire, des protéases ou encore la participation des paramètres hémodynamiques (force de cisaillement liées au flux sanguin). Le dérèglement de cet équilibre peut être à

l'origine d'une angiogenèse pathologique **(Folkman 1995)** où il est à l'origine de la néovascularisation des tumeurs.

II.1. Les Facteurs de croissance :

II.1.1. Le Vascular endothelial growth factor (ou VEGF)

C'est le facteur de croissance par excellence de la cellule endothéliale. Il a été découvert dans les années 1980. Cinq molécules différentes ont été identifiées, VEGF-A à VEGF-D ainsi que le PIGF *(placental growth factor)* (Figure 3).

Le VEGF A existe sous 4 formes moléculaires de 121, 165, 189 et 206 acides aminés. Le VEGF 121 ne se lie pas à l'héparine péricellulaire, tandis que le VEGF 189 et le VEGF 206 sont contenus dans les protéoglycanes (héparine sulfate) de la membrane cellulaire, et sont libérés suite à l'action de la plasmine.

- **Mode d'action :**

Comme son nom l'indique, le VEGF agit essentiellement sur les cellules de l'endothélium vasculaire, même s'il a une action sur un nombre limité d'autres cellules (comme lors de la stimulation de la migration monocyte/macrophage). Il se lie à des récepteurs à activité tyrosine kinase exprimés spécifiquement sur les cellules endothéliales, et est soumis à une régulation. Deux récepteurs à activité tyrosine kinase ont été identifiés : VEGFR-1/Flt-1 (fms-like tyrosine kinase) impliqué dans la migration des cellules endothéliales, et VEGF-2/Flk1/KDR (Kinase domain tyrosine kinase), impliqué dans la prolifération des cellules endothéliales. Ces récepteurs sont composés de trois domaines : un domaine extracellulaire composé de plusieurs domaines Ig-like, un domaine transmembranaire et un domaine intracellulaire, qui possède une activité tyrosine kinase. Le phénotype des embryons déficients en VEGFR2 est létal à des stades précoces de développement (E8,5-9,5) en raison de l'absence de vasculogenèse et d'hématopoïèse (**Shalaby, 1995**). Un troisième récepteur VEGFR-3/Flt-4 a été identifié dans les cellules endothéliales du système lymphatique. Il lie le VEGF-C et -D qui contrôlent la lymphangiogenèse ou prolifération lymphatique. **(Leung, 1989; Fong, 1999, Fong, 1995; Shalaby, 1995; Carmeliet, 1996; Ferrara, 1996, Fong, 1999).**

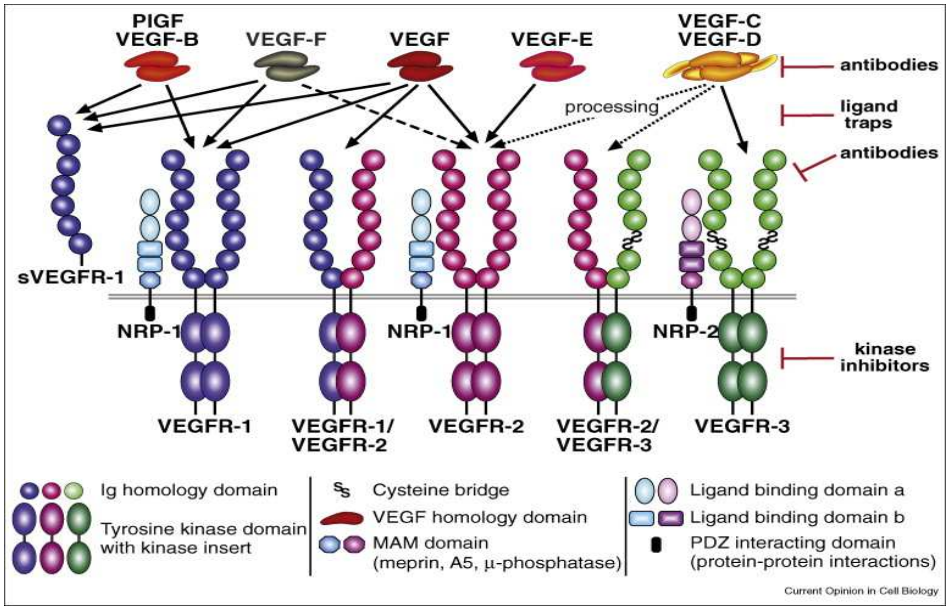


Figure 3 : Structure et interactions des différents VEGFs, leurs récepteurs (VEGFR) et corécepteurs (NRP). D'après **Lohela, 2009**. L'arrimage des dimères de VEGF à leur récepteur stimule la dimérisation de ces derniers et provoque leur autophosphorylation. Cette autophosphorylation va permettre le recrutement d'autres molécules de la signalisation.

- **Expression :**

Le VEGF est exprimé par plusieurs types cellulaires, y compris par les cellules cancéreuses, et esr relargué par la matrice extracellulaire sous l'action de métalloprotéases (ex : MMP9). L'induction du VEGF par hypoxie a été montrée peu après la découverte de la présence de VEGF dans le glioblastome, une tumeur cérébrale particulièrement vascularisée : le VEGF se trouve à proximité des zones hypoxiques de nécrose du tissu tumoral et est synthétisé par les cellules cancéreuses elles-mêmes **(Shweiki, 1992)**.

- **Signalisation induite par le VEGF :**

Suite à la liaison ligand-récepteur, les récepteurs à activité tyrosine kinase, ont la capacité de s'autophosphoryler et ainsi d'activer des voies de signalisation intracellulaires conduisant à la prolifération, la migration et la survie de la cellule endothéliale.

-Prolifération cellulaire : L'action mitogène du VEGFR2 passe par la phosphorylation du résidu Y1175 du récepteur 2 du VEGF, qui recrute la phospholipase Cγ, via les domaines SH2 C-terminaux et l'active. Celle-ci est à l'origine des messagers lipidiques secondaires capables d'activer une protéine kinase C (PKCβ) puis la voie MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) mesurable par le niveau de phosphorylation de Erk 1 et 2. Ceci aboutit à la

transcription de gènes régulant positivement la prolifération cellulaire qui est activée, tout en amont. (**Kowanetz, 2006**).

-Migration cellulaire : La migration des cellules comme la morphogenèse des vaisseaux nécessitent la succession alternée d'établissement et de rupture de ces contacts focaux d'adhérence entre cellules et matrice extracellulaire. Ainsi, la protéine tyrosine kinase située aux contacts focaux FAK (Focal Adhesion Kinase) est activée par VEGF et phosphorylée par des protéines telles que la Paxiline, mais aussi IQGAP-1 et la p38 MAPK (son activation est le résultat de la phosphorylation du résidu Y1214 du VEGFR2). De plus, le résidu Y951 phosphorylé induit le recrutement de la protéine kinase Src dont nous reparlerons ultérieurement. Cette tyrosine kinase est aussi impliquée dans l'activation du processus de migration cellulaire (**Kowanetz, 2006**).

-Survie cellulaire : c'est la voie de signalisation Akt/Pi3K/PKB (Serine/thréonine kinase Akt, phosphatidyl Inositol 3 Kinase et la protéine kinase B) qui est activée suite à la phosphorylation du résidu Y1125 du recepteur 2 du VEGF.

Ces trois principaux phénomènes , survie, migration et prolifération cellulaire sont l'essence même de l'activité du VEGF. Très étudiés, ils ont permis la découverte de voies inhibitrices utiles lorsque la « machinerie » VEGF est perturbée, c'est-à-dire quand les effecteurs impliqués ne jouent plus leur rôle régulateur comme dans le cas de cancer.

Ces différentes voies de signalisation sont schématisées dans la Figure 4.

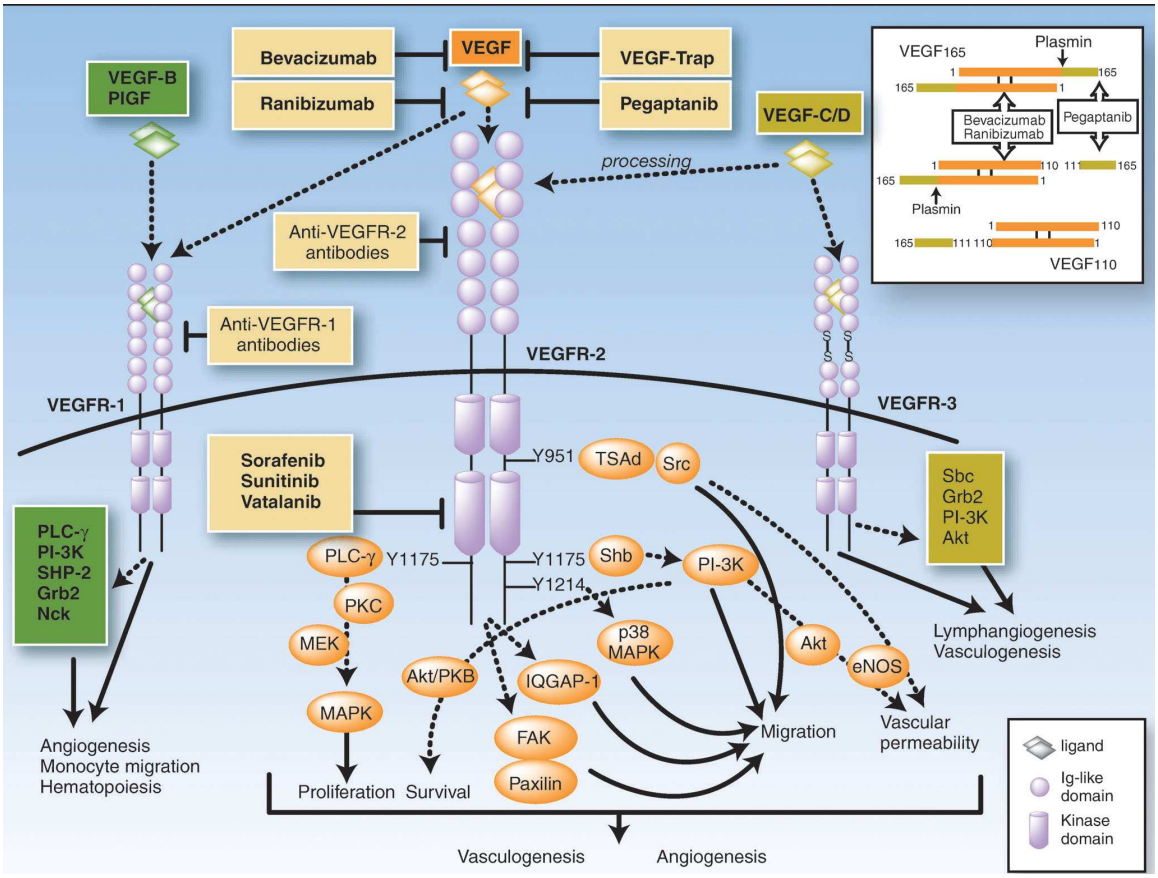


Figure 4 : description des voies de signalisation VEGF-dépendantes. D'après **Kowanetz, 2006**. Sur ce schéma sont résumées les principales voies de signalisation découlant de l'activation du récepteur du VEGF par fixation de son ligand ainsi que les principales molécules ciblant cette activité expliquées dans le paragraphe suivant.

II.1.2. Le facteur de croissance de fibroblastes (FGF)

C'est une famille de facteurs de croissance impliqués dans l'angiogenèse , la cicatrisation et le développement embryonnaire. Chez l'homme, 22 membres ont été identifiés. Les FGF1 à FGF10 lient le récepteur présent sur les fibroblastes (FGFRs) FGFR1 , FGFR2 , FGFR3 et FGFR4, mais aussi sur d'autres types cellulaires. FGF2 est également connu en tant que facteur de croissance des fibroblastes de base. Une fonction importante de FGF1 et FGF2 est d'induire la prolifération des cellules endothéliales et leur organisation en structures de type tube. Ainsi, ils favorisent l'angiogenèse, la croissance de nouveaux vaisseaux sanguins à partir du système vasculaire pré-existante. FGF1 et FGF2 sont de plus puissants facteurs angiogéniques que le VEGF ou le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF).

II.1.3. Le PDGF ou acteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF)

C'est l'un des nombreux facteurs de croissance, qui régule la croissance et la division cellulaire **(Matsui, 1989)**. En particulier, il joue un rôle important dans la formation des

vaisseaux sanguins (angiogenèse) et la croissance des vaisseaux sanguins. Sur le plan chimique, ce facteur de croissance dérivé des plaquettes est une glycoprotéine dimérique composée deux chaines AA, BB-, -AB. Ces molécules agissent par l'intermédiaire d'un récepteur à activité tyrosine kinase PDGFR (RTK). Le PDGF joue un rôle dans ceryaines phases du développement embryonnaire, la prolifération cellulaire, la migration cellulaire et l'angiogenèse, mais il a également été associé à plusieurs maladies telles que l'athérosclérose , la fibrose et les maladies malignes. Le PDGF-b et son récepteur PDGFR-b participent à la stabilisation des néovaisseaux en recrutant des péricytes **(Hellstom, 2001)**.

II.1.4. Le système des angiopoiétines (Ang), et de leur récepteurs Tie

Les récepteurs Tie-1 et Tie-2 ainsi que leurs ligands Ang-1 et Ang-2 sont aussi des éléments critiques dans la formation et la stabilisation des vaisseaux. **(Thurston, 2000, Hanahan, 1997, ; Maisonpierre, 1997 ; Holash, 1999).**

Les principales sources de Ang-1 et Ang-2 sont respectivement les cellules murales et endothéliales **(Jain, 2003)**. Ang1 est une protéine glycosylée de 70 kDa qui se lie au récepteur à activité tyrosine kinase Tie-2 présent à la surface de cellules endothéliales et active sa phosphorylation, permettant ainsi une signalisation qui favorise le recrutement péricytaire.

L'Ang-2, un deuxième ligand de Tie-2, se lie avec une affinité semblable à celle de l'Ang-1, mais inhibe la phosphorylation de Tie-2 induite par Ang-1. Ang-2 serait donc un facteur proangiogène qui, par sa fonction d'antagoniste à la fonction stabilisatrice de Ang-1, rendrait l'endothélium vasculaire plus susceptible de répondre à des facteurs angiogènes comme le VEGF **(Pepper, 2000)**. En absence de VEGF, Ang-2 déstabilise les vaisseaux, entraînant finalement leur régression. **(Jain, 2003)**.

II.1.5. Les éphrines :

Le bourgeonnement des capillaires partage des similarités avec celle du guidage axonal. Les éphrines possèdent la spécificité d'avoir des ligands membranaires non circulants agissant de façon autocrine ou paracrine immédiate, qui ont d'abord et surtout été impliqués dans les processus neurodéveloppementaux qui ont lieu lors de l'embryogenèse **(Flanagan, 1998).** Une spectaculaire découverte en 1998 montrait que le récepteur EphB4 se trouvait exclusivement sur les veines alors que son ligand éphrine B2 n'était porté que par les artères **(Wang, 1998)**. Cette caractérisation à l'échelle moléculaire était vraie jusqu'au niveau des veinules et des artérioles, et permettait ainsi de visualiser la transition artéro-veineuse aussi bien chez l'embryon que chez l'adulte. Les résultats les plus marquants furent obtenus chez les

animaux invalidés soit pour le gène de l'éphrine B2, soit pour les gènes codant les récepteurs EphB2 et EphB3. De tels embryons présentent de multiples défauts d'angiogenèse au niveau des organes, mais aussi dans la vasculogenèse générale **(Adams, 1998).** Ainsi, les couples éphrine-Eph participent à l'organisation des vaisseaux.

II.1.6. Les systèmes sémaphorines-plexines-neuropilines

Le terme « sémaphorine » vient du grec *semâ*, « signal », et *phoros*, « qui porte », en raison du rôle de ces molécules dans le guidage axonal. Plusieurs études d'invalidation des gènes codant pour les sémaphorines ou les neuropilines ont permis de révéler de graves altérations vasculaires et cardiaques conduisant souvent à la mort des mutants au cours du développement embryonnaire **(Behar, 1996 ; Takashima ,2002)**.

II.1.7. Les nétrines- uncoordinated-5 (UNC5)

Parmi les récepteurs des facteurs de guidage axonal, plusieurs ont une expression restreinte aux vaisseaux sanguins. Les nétrines sont des facteurs chémotropiques qui attirent ou repoussent différentes classes d'axones en agissant via les récepteurs DCC et UNC5 (UNC5a, b, c et d). DCC est impliqué dans l'attraction et dans la répulsion du cône de croissance tandis que les récepteurs UNC5 sont impliqués seulement dans la répulsion. Parmi les récepteurs de la Nétrine-1, UNC5B est exprimé sélectivement dans les cellules endothéliales, y compris dans les cellules "tip" (tip cells). Des études de perte de fonction par délétion des gènes codant pour ces récepteurs chez la souris montrent que leur fonction de récepteur de guidage est conservée dans leur nouvel environnement tissulaire : les souris déficientes en *unc5b* ont une arborisation vasculaire aberrante aussi bien pendant la vie embryonnaire que pendant la néovascularisation induite expérimentalement chez l'adulte **(Larrivée B, 2007)**.

II.1.8. Les Slits-Roundabouts

Chez les vertébrés, on connaît 3 protéines Slit (1-3) (ligands sécrétés) et 4 récepteurs de la famille *roundabout* ou Robo (1-4). Elles sont toutes exprimées au niveau de la ligne médiane du système nerveux mais aussi dans d'autres organes comme le poumon et le rein. Il semble que chaque protéine Slit soit capable d'interagir avec chacun des récepteurs Robo. Mais Slit2 et Robo4 ont particulièrement retenu l'attention dans l'angiogenèse, car ils sont spécifiquement exprimés dans le système vasculaire, avec toutefois des résultats contradictoires : certains concluent à une fonction pro-angiogénique de slit2-Robo4 **(Wang, 2003)**, d'autres à une fonction anti-angiogénique par inhibition de la migration des cellules

endothéliales **(Park, 2003)**. Un travail récent vient d'apporter des précisions importantes sur le rôle de Slit2 et de Robo4 : Robo4 stabiliserait le réseau vasculaire en régulant l'angiogenèse anormale et l'augmentation de la perméabilité endothéliale. **(Legg, 2008 ; Jones, 2008)**.

II.1.9. Les intégrines

En tant que récepteurs membranaires impliqués dans les interactions cellule/matrice extracellulaire et cellule/cellule, les intégrines jouent un rôle dans l'adhérence, la migration et l'établissement de la néoangiogénèse tumorale. L'état d'adhérence optimale est régulée par une signalisation de type *"inside-out"* mais les intégrines sont aussi capables de générer des signaux en direction de la machinerie cellulaire *"outside-in"* aboutissant à l'expression de gènes et la régulation de nombreuses fonctions. Des expériences réalisées avec des anticorps dirigés contre les intégrines $\alpha v\beta 3$ et $\alpha v\beta 5$ ont montré leur participation à la néovascularisation et à l'angiogenèse tumorale **(Hood, 2002 ; Hynes, 2002).**

II.2. Rôle des Protéases

L'angiogenèse nécessite la migration des cellules endothéliales. La dégradation de la matrice extracellulaire par les matrix metalloproteinases (MMP) permet donc aux cellules endothéliales de migrer en réponse aux facteurs chimiotactiques de croissance. Ces protéases participent également au remodelage de la matrice extracellulaire et à la libération de facteurs proangiogéniques (bFGF, VEGF, et TGFb) **(Pepper, 2001 ; Jackson, 2002 ; Luttun, 2000)**. Ces protéases peuvent aussi bloquer l'angiogenèse en libérant des inhibiteurs associés à la matrice tels que la Thrombospondine-1, la canstatine, la tumstatine, l'endostatine, et le platelet factor-4.

II.3. Hypoxie et angiogenèse

L'hypoxie est un élément majeur de régulation de l'angiogenèse physiologique et pathologique, dont le mécanisme majeur est l'activation des hypoxia-inducible-factors (HIF). Ils font partie de la super famille des bHLH-PAS (basic helix loop helix-per ARNT Sim). La fonction de ces protéines est de réagir aux stimuli de l'environnement et d'activer l'expression de gènes qui interviennent dans l'angiogenèse, mais également dans le rythme circadien, la détoxification xénobiotique et l'adaptation à l'hypoxie. La famille HIF comprend trois sous-unités alpha – HIF1α (aussi connu sous le nom de MOP1, membre de PAS1), HIF2α (connu sous le nom de EPAS1, MOP2 ou HRF), HIF3α (aussi connu comme MOP3) –

et trois sous-unités bêta – HIFβ, également appelé ARNT (pour aryl-hydrocarbone nuclear translocator), ARNT2 et ARNT3. Les protéines HIF forment des hétérodimères avec les sous-unités alpha et bêta. Ces complexes protéiques hétérodimériques se fixent sur les éléments de réponses hypoxiques (HRE) présents sur les promoteurs des gènes cibles, ce qui active leur transcription (ex : VEGF, ou l'angiopoiétine-2). Leur importance dans le développement vasculaire physiologique a été montrée sur des souris invalidées pour leurs gènes. Les souris HIF-1α-/- ou HIF-Iβ-/- présentent une régression très importante de leur réseau vasculaire, et meurent aux environs du 10ème jour de gestation. Les souris HIF-2α-/- présentent des phénotypes variables selon le fond génétique. Plus précisément, certains défauts vasculaires ont été décrits. Plusieurs études ont notamment montré l'implication des HIF ans l'angiogenèse tumorale. La présence d'hypoxie au sein de la tumeur est un des facteurs essentiels responsable de l'activation de l'angiogenèse tumorale. Dès que la tumeur atteint un volume de 1-2 mm^3, l'oxygène et les nutriments commencent à manquer. La large gamme des gènes dont l'expression est activée par HIF peut contribuer de fait à la tumorigenèse, car il s'agit de transporteurs de glucose et d'enzymes qui permettent de maintenir une production énergétique d'ATP grâce à la glycolyse anaérobie, de facteurs de croissance qui stimulent la prolifération cellulaire, de métalloprotéinases et de chimiokines qui peuvent favoriser le développement de métastases et le recrutement de cellules endothéliales (**Fidler, 1994; Yoshiji, 1996**, **Millauer, 1993**, (**Millauer, 1993**) (**Frederick, 2001**).

II.4. Role des cellules inflammatoires

Les processus inflammatoires participent de façon active à une angiogenèse locale par l'augmentation de l'expression de cytokines chimioattractantes secrétées par les macrophages ou monocytes (Interleukine, TNF, etc.). Différentes cellules sont capables de synthétiser ces cytokines et une seule de ces cytokines est capable d'agir sur un nombre varié de cellules différentes (**Hirano, 1999**).

Les cellules inflammatoires et les cellules tumorales secrètent également des héparinases qui participent à la migration cellulaire, l'invasion et la réaction vasculaire **(Heil, 2002**). Ces phénomènes sont largement observés dans des pathologies inflammatoires comme la polyarthrite rhumatoïde ou la rétinopathie diabétique, dans lesquelles l'angiogenèse dans le panus ou la rétine, respectivement, sont des critères physiopathologiques de diagnostique. (**Frederick, 2001, Norrby, 2001**).

II. 4.1. Une cytokine pro-angiogénique : Le TNFα

Les cytokines, protéines solubles non-spécifiques, sont des médiateurs essentiels du développement et de la régulation de la réponse immune. Elles sont classiquement regroupées en interleukines (agissant sur les lymphocytes), en facteurs de stimulation de colonie (Colony Stimulating Factors, agissant sur la régulation de l'hématopoïèse), en membres de la famille du facteur de nécrose tumorale (TNFα), et en facteurs de croissance transformant (TGF). Nous illustrerons ici seulement le TNF.

L'histoire de la découverte du TNF (ou TNFα) est intimement liée à celle de la thérapie du cancer. En 1868, Brunes avait observé chez certaines personnes atteintes du cancer que les tumeurs régressaient spontanément suite à une infection bactérienne aiguë. En 1894, William Colley observe qu'un extrait bactérien peut amener une régression tumorale. En 1944, Shear et collaborateur isole le LPS (lipopolysaccharide) de bactéries Gram-négative. Le LPS induit chez la souris une nécrose hémorragique des tumeurs. En 1962, O'Malley transfère du sérum de souris traitées au LPS chez des souris porteuses de tumeurs et observe une nécrose tumorale. En 1975, c'est l'apparition du terme *tumor-necrosis factor* par Carswell, qui a confirmé l'effet du sérum induit par le LPS sur les tumeurs de souris et a également démontré l'effet du sérum induit par le LPS sur la mortalité de cellules cancéreuses en culture. C'est finalement en 1985 que le groupe de Pennica a rapporté le clonage de l'ADN complémentaire de la protéine TNF (**Pennica, 1985, 1987**).

- **Structure et rôle du TNFα**

Il existe deux formes de TNF : le TNF α et le TNFβ. Leur structure a pu être résolue et ces résidus possèdent environ 32% d'homologies. Le TNFα est un polypeptide de 17 kDa qui agit sous forme d'homotrimère. Il se présente comme une protéine transmembranaire, pouvant agir de façon juxtacrine. Il peut également être clivé et relargué sous forme soluble. Il possède deux récepteurs, le p55 TNFR (CD120a) et le p75 TNFR (CD120b). La forme p55 est exprimée de manière ubiquitaire et est responsable de plusieurs aspects de la réponse immunitaire. Au niveau cellulaire, cette isoforme de TNFα entraîne également l'apoptose et dans l'organisme, elle est responsable de l'induction de changements tels la fièvre, la perte d'appétit et la cachexie. Le récepteur p75 est exprimé principalement sur les cellules hématopoïétiques et est activé principalement par le TNF membranaire. Ses effets semblent plutôt limités et dans la plupart des cas, ses réponses peuvent être induites également par le récepteur p55 (**Wallach, 1999, Wilson, 2002**).

- **Signalisation induite par le TNFα**

La liaison du TNF à son récepteur active différentes voies de signalisation dont la spécificité est acquise par les différents adaptateurs recrutés au récepteur. On distingue 4 grandes voies de signalisation intracellulaire pouvant être activées suite à la liaison du TNF à son récepteur (**Wallach, 1999**) :

-**Les voies d'induction de mort cellulaire** : Le récepteur du TNF possède dans son domaine cytoplasmique un domaine de mort (DD, *Death Domain*), séquence importante dans l'effet cytotoxique du récepteur. Le domaine DD du TNFR recrute la protéine adaptatrice TRADD (TNFR-*associated death domain*), qui, par la suite, recrutera des protéines telles que le FADD (*FAS-associated death domain*). Ces dernières amènent à l'activation des pro-caspases-8 et –10, impliquées dans la réponse apoptotique (**Wallach, 1999, Ashkenazi, 2002**)

-La signalisation lipidique: La liaison du TNFα à son récepteur conduit à la formation de différents médiateurs lipidiques. Bien que les effets et les cascades soient moins bien décrits que pour la voie apoptotique, l'activité des enzymes sphyngomyélinases (production de céramide) et phospholipases (production d'acide arachidonique) est augmentée (**Wallach, 1999**).

-Les voies des MAP kinases: L'activation des trois voies MAP kinase, ERK, JNK et p38 surviennent rapidement suite à la liaison du TNF à son récepteur. Ces trois voies sont surtout connues pour leurs effets activateurs de facteurs de transcription et de l'expression génique, principalement de l'expression des gènes liés à l'inflammation (**Wallach, 1999**). JNK et p38 seraient aussi impliqués dans l'expression de la E-sélectine, une molécule d'adhérence propre aux cellules endothéliales (**Read, 1997**).

-La voie NF-κB – Le facteur de transcription NF-κB est composé de deux sous-unités, p65 et p50. Son activation est régulée par un inhibiteur cytoplasmique, IκB. Suite à la liaison du TNFα à son récepteur, IκB est phosphorylé par sa kinase IKK (*IκB kinase*), ce qui amène sa dégradation par le protéasome. NF-κB migre ensuite vers le noyau pour augmenter l'expression de gènes inflammatoires et immuns (production de cytokines, entre autre) (**Jobin, 1998, Jobin, 1999**).

II.4.2. Cytokines antiangiogéniques

Il existe également des cytokines qui agissent de façon négative sur l'endothélium, ce sont les cytokines anti-inflammatoires. Citons l'interféron α, les interleukines 4, 10 et 13 et le TGFβ. Les interférons α et β sont 2 cytokines qui agissent en diminuant l'expression du bFGF dans

de nombreux néoplasmes (rein, vessie, prostate, colon). L'utilisation d'anticorps neutralisants anti-IFNγ abroge totalement l'effet anti-angiogénique de l'IL-12 chez la souris et l'utilisation d'IL-12 n'a aucun effet sur la prolifération des cellules endothéliales *in vitro* **(Sgadari, 1996).**

L'interleukine-18 (IL-18) est une cytokine produite par les cellules de Kupffer et les macrophages activés. Elle est également capable d'induire la production d'IFNγ et exerce donc son activité antiangiogénique de la même manière que l'IL-12. **(Coughlin, 1998)**.

Le TNFα possède également des propriétés anti-angiogéniques : il a été suggéré que les effets antagonistes du TNFα soient le résultat d'une concentration et d'une durée d'exposition différentes. **(Fajardo, 1992)**.

II.5. Ciblage de l'angiogenèse : exemple de thérapies anti angiogéniques

II.5.1. Exemple de thérapie ciblée visant VEGF

L'Avastin®, aussi appelé bevacizumab, est un anticorps monoclonal humanisé recombinant qui se lie au VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) facteur clé de l'angiogenèse et inhibe de ce fait la liaison du VEGF à ses récepteurs (VEGFR-1 et 2). Cette neutralisation fait régresser les vaisseaux tumoraux et permet d'inhiber la croissance tumorale. Aujourd'hui, ce médicament a reçu des autorisations de mise sur le marché (AMM) pour quatre indications dans les cancers suivants : -pour le cancer colorectal métastasique (janvier 2005), -pour le cancer du sein métastasique, en première ligne pour le traitement (2007), -pour le cancer du rein métastasique (2007),-pour le cancer du poumon non à petites cellules (en Janvier 2008), -pour le gliome en seconde ligne si les patients présentent une résistance au Temodal (Avril 2009).

Il existe également plusieurs autres traitements antiangiogéniques visant l'activité tyrosine kinase de son récepteur (Sorafenib, Sunitinib, vatalanib, anticorps anti-VEGFR2, VEGFR1) (**Kowanetz, 2006**).

II.5.2. Exemple de thérapie ciblée visant le TNFα

L'infiximab est un anticorps monoclonal chimérique recombinant qui se lie au TNFα et réduit ainsi son action. C'est donc un immunosuppresseur spécifique du TNF. Son action a été montrée efficace dans plusieurs pathologies inflammatoires chroniques telles que :-la maladie de Crohn,-la spondylarthrite ankylosante,-la polyarthrite rhumatoïde, (**Felson, 1993**),-une variété de maladies auto-immunes et non auto-immunes.

Il existe deux autres types d'agents thérapeutiques utilisés pour contrer l'effet du TNFα : l'Etanercept, qui est une protéine de fusion sécrétée par des cellules d'ovaires de hamster (les

CHOs), et l'Adalimumab, qui est un anticorps monoclonal IG1 humaine spécifique du TNF humain.(**Bencsath, 2003**). (**Breedveld, 2006**).

Au total , la connaissance de mécanismes moléculaire de molécules angiogéniques a permis le transfert clinique de molécules à visée thérapeutique

III. L'ENDOTHELIUM VASCULAIRE ADULTE MATURE

III.1. Définition et structure

L'endothélium vasculaire tapisse le système vasculaire dans son intégralité et est composé d'une monocouche de cellules endothéliales polygonales allongées, longues de 25 à 50 µm, alignées dans le sens du flux sanguin. L'endothélium forme ainsi un « organe » d'environ un kilo de poids et représente une surface totale de 1 à 7 m^2 (**Augustin, 1994**). Il est semi-perméable et contrôle le transfert de petites et de grosses molécules. La surface vasculaire des cellules endothéliales est recouverte d'une enveloppe cellulaire avec un glycocalyx riche en carbohydrates (protéoglycanes, héparane sulfate en particulier). Les cellules endothéliales se distinguent de toutes les autres cellules (excepté les mégacaryocytes) par l'existence dans leur cytoplasme de structures en forme de bâtonnets appelées « corps de Weibel-Palade », lieu de stockage du facteur Willebrand. Bien que l'endothélium ait longtemps été considéré comme une barrière inerte permettant de séparer le sang des tissus sous-jacents, on sait aujourd'hui que les cellules endothéliales qui le constituent sont dynamiques et ont un rôle extrêmement important dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques (**Fajardo, 1989**).

III.2. Les grandes fonctions de l'endothélium vasculaire

III.2.1. Barrière sélective

Différentes voies de passage sont possibles à travers la couche des cellules endothéliales en focntion de la taille des molécules. Les jonctions entre cellules endothéliales sont plus lâches au niveau des veinules : c'est là que se font les échanges trans-endothéliaux de l'eau, des gaz et des substances dont la taille moléculaire ne dépasse pas 2 nm. Les substances dont la taille est plus importante vont et viennent à travers les cellules endothéliales par un système de pores qui résulte de la fusion de vésicules d'endocytose entre elles : leur diamètre est limité à 10 nm.

III.2.2. Synthèse des constituants de la membrane basale et du sous-endothélium

Toutes les molécules constitutives de la membrane basale et de la matrice extracellulaire du sous- endothélium sont synthétisées et secrétées par les cellules endothéliales. Seuls certains composants sont exclusivement synthétisés par les cellules endothéliales : c'est le cas du collagène de type IV caractéristique de la membrane basale.

III.2.3. Fonctions anti-thrombogéniques

En dehors du propre rôle du glycocalyx, la cellule endothéliale joue un rôle fondamental d'inhibition de la thrombose grâce à un équilibre subtil entre facteurs pro- et antithrombogènes synthétisés par les cellules endothéliales

Citons:

•la synthèse de prostacycline (PGI2)qui s'oppose à l'activation et à l'agrégation plaquettaire. Le PGI2 favorise également la vasodilatation

•la synthèse de monoxyde d'azote (NO) aux propriétés vasodilatatrices et anti-agrégantes

•la présence d'inhibiteur de protéases de la coagulation à leur surface : antithrombine III,

•la synthèse d'activateurs de la fibrinolyse parmi lesquels l'activateur tissulaire du plasminogène (tPA)

•la libération d'ADPase, enzyme catabolisant l'ADP, principal inducteur physiologique de l'agrégation plaquettaire

•l'aptitude à dégrader certaines substances à la fois vasoactives et inductrices d'activation plaquettaire •présence ensurface de thrombomoduline (TM), protéine ayant un rôle régulateur important dans les phénomènes d'hémostase en fixant la thrombine.

III.2.4. Régulation de la pression vasculaire par les cellules endothéliales

La régulation du tonus vasculaire est sous la dépendance à la fois du système nerveux périphérique et de l'endothélium.

- **Système nerveux périphérique:**

Différents neuropeptides sont relargués par les terminaisons nerveuses et vont agir soit directement sur les cellules musculaires lisses des parois vasculaires, soit via les médiateurs synthétisés par les cellules endothéliales. Ainsi, la substance P et le peptide associé au gène de la calcitonine (CGRP) ont une fonction vasorelaxante en induisant la synthèse et le relargage

de NO par les cellules endothéliales. Les fibres parasympathiques (via l'acétylcholine) ont une action vasodilatatrice antagonisée par les fibres sympathiques et les médiateurs adrénergiques.

- **Tonus vasculaire et médiateurs endothéliaux**

Il existe 3 principaux médiateurs endothéliaux qui contrôlent le tonus vasculaire : NO, PGI2 et endothéline. Certains médiateurs sont vasoconstricteurs comme l'endothéline, l'angiotensine II et les amines superoxydes, d'autres sont vasodilatateurs comme le NO, le CO, la prostacycline, la bradykinine et le facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium ou EDHF. Ces facteurs agissent sur les cellules musculaires lisses de la média et diverses cellules vasculaires en se fixant à des récepteurs spécifiques constituant des facteurs soit endocrines, soit paracrines, soit autocrines. Outre une activité vasotonique, ces facteurs ont un impact important sur l'activation des plaquettes, la cascade de la coagulation / fibrinolyse et sur la prolifération de l'endothélium et des cellules musculaires lisses.
En contrôlant la circulation de molécules et de cellules à travers les vaisseaux sanguins, les cellules endothéliales vasculaires jouent un rôle actif dans la régulation cardiovasculaire et l'homéostasie ainsi que dans la modulation des fonctions physiopathologiques tels que l'inflammation et l'immunité.

L'endothélium vasculaire est donc maintenant perçu comme un véritable organe endocrine qui intervient directement dans la régulation de processus biologiques, lesquels ont un impact certain sur la structure et l'activité vasculaire et donc sur la santé vasculaire.

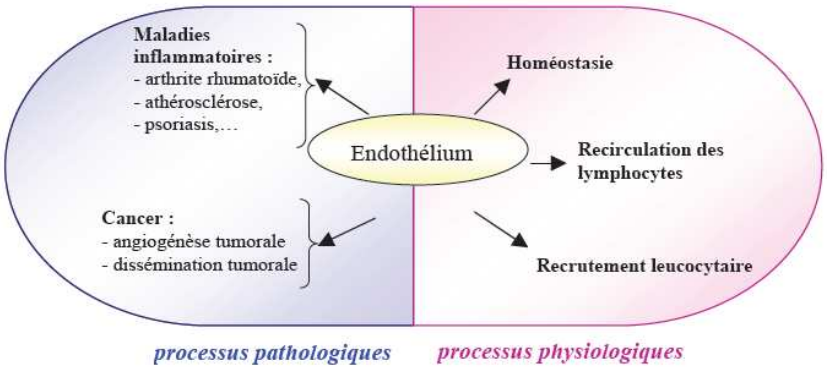


Figure 5 : Implications de l'endothélium vasculaire en physiopathologie

III.3. Perméabilité endothéliale

Dans de nombreux cas physiologiques ou pathologiques, souvent liés à l'inflammation ou à l'angiogenèse, l'intégrité de l'endothélium est perturbée et l'endothélium devient alors perméable.

Il existe deux formes de perméabilité endothéliale : la voie transcellulaire et la voie paracellulaire qui est liée à la constitution et au fonctionnement des jonctions entre les cellules endothéliales (Figure 6).

III.3.1. La voie transcellulaire (passage au travers de la cellule endothéliale)

La voie transcellulaire concerne les molécules d'une taille supérieure à 3 nm comme l'albumine. La voie transcellulaire permet également le passage de cellules à travers l'endothélium et peut, dans ce cas, nécessiter la formation d'un canal transendothélial, ou organelles vesiculo-vacuolaires (VVO) ou encore un mécanisme utilisant un récepteur **(Feng, 2005, Dvorak, 2001).** Cette voie n'est pas ou peu observée au cours des transmigrations de leucocytes à travers la barrière endothéliale *in vitro* mais elle semble se produire dans les processus *in vivo* **(Millan, 2005)**. Il est actuellement difficile aujourd'hui de quantifier le rôle de l'une ou l'autre des voies de transmigration des leucocytes de par le peu de comparaisons observées entre les deux. Cette voie ne sera donc pas évoquée dans la suite de cet exposé.

III.3.2. La voie paracellulaire (passage par les jonctions endothéliales)

La voie paracellulaire, permettant le passage de molécules de taille inférieure à 3 nm peut requérir, en cas de réaction inflammatoire, l'ouverture et la fermeture régulées et coordonnées des jonctions intercellulaires. Cette régulation est primordiale pour maintenir l'intégrité de l'endothélium et prévenir voire éviter l'exposition possible de la matrice sous-endothéliale. (**Carman, 2007, Engelhardt, 2004, Feng, 1999, Millan, 2006, Nieminen, 2006**).

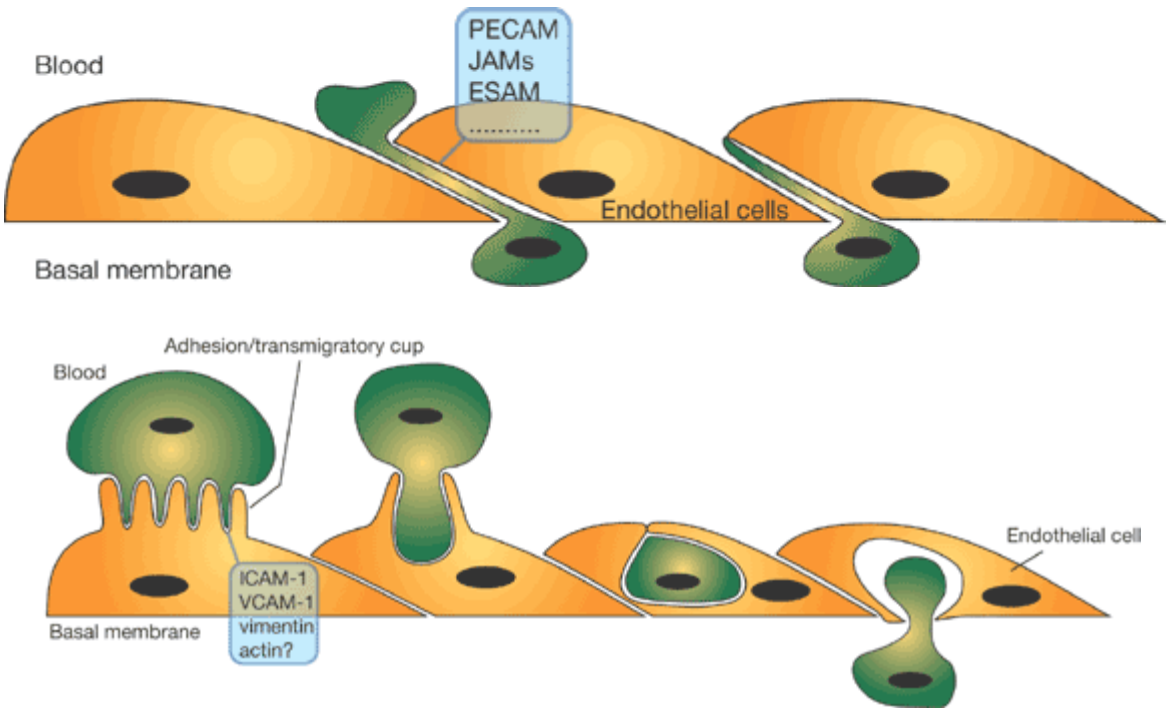


Figure 6 : Les deux voies principales de migration des leucocytes à travers l'endothélium : para- et transcellulaires . D'après **Dejana, 2006**.

Le phénomène d'inflammation localisé ou d'infection attire les cellules immunitaires compétentes (les leucocytes tels que monocytes, lymphocytes et granulocytes) nécessaires au déclenchement de la réparation tissulaire et de la lutte contre les agents pathogènes. En effet, au niveau du site d'inflammation, les leucocytes quittent la circulation sanguine et s'infiltrent dans le tissu. Ce processus débute par une liaison faible entre les leucocytes et les cellules endothéliales (vasculaires), liaison où interviennent les sélectines (E- et P-sélectine) et les motifs glucidiques (jouant le rôle de ligands comme sialyl LewisX). Dans les circonstances normales, cette faible interaction, combinée au flux sanguin, résulte en un mouvement de roulement des leucocytes à la surface de l'endothélium. Cependant, au site de l'inflammation, les cellules endothéliales relarguent des chimiokines. Ces molécules ont pour rôle d'immobiliser les leucocytes roulants et de favoriser leur traversée de l'endothélium (**Millan, 2005**). Pour cela elles activent, grâce à un signal intracellulaire, les intégrines, autres molécules d'adhérence présentes à la surface des leucocytes. Ces intégrines activées se fixent sur les molécules I-CAM-1 (Inter-Cellular Adhesion Molecule-1), fortement exprimées sur l'endothélium au site de l'inflammation, provoquant ainsi une immobilisation totale du leucocyte (**Ley, 1996**). En se déformant, celui-ci migre vers le tissu en passant entre les cellules endothéliales. Une fois dans le tissu, les leucocytes assurent deux rôles ; reconstruire le tissu endommagé et, en cas de lésion septique, éliminer les agents pathogènes. L'accumulation des leucocytes est la résultante de deux phénomènes : surexpression des

sélectines et I-CAMs sur les cellules endothéliales et relargage des chimiokines par ces cellules uniquement au site de l'inflammation. Cette situation extrême peut être irréversible et mener à de nombreux problèmes majeurs d'homéostasie tissulaire et vasculaire.

Par contre, certains agents moléculaires induisent une perméabilité réversible qui n'affecte pas la viabilité des cellules endothéliales ni les réponses fonctionnelles. Ainsi, le VEGF augmente expérimentalement la perméabilité paracellulaire mais aussi transcellulaire par régulation du nombre de fenestrations, en augmentant des médiateurs intracellulaires tels que le calcium ainsi qu'une molécule vasoactive le NO. Il en est de même pour l'histamine, la thrombine, les radicaux oxygénés, mais aussi le TNFα et le lipopolysacharride (LPS).

IV. REGULATION DE LA PERMEABILITE ENDOTHELIALE ET JONCTIONS ENDOTHELIALES

Une grande variété de pathologies est associée à une perte de l'étanchéité de la barrière endothéliale permettant alors le passage non régulé de macromolécules, de fluides et de cellules depuis ou vers le compartiment sanguin, comme c'est le cas au cours d'œdème, hémorragies, angiogenèse tumorale, métastase, inflammation chronique ou aiguë, rétinopathie diabétique. Une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires et cellulaires de perméabilité endothéliale peut aboutir à la découverte de nouvelles cibles thérapeutiques, pour ces pathologies.

IV.1.Régulation de la perméabilité endothéliale par le cytosquelette

L'actine et la myosine, composants contractiles majeurs du cytosquelette (**Schnitter, 1990**), assurent le maintien de la tension centripète mais aussi le développement d'une force contractile des cellules au cours de stimulations chimiques ou physiques (**Baldwin, 2001**). Dans les cellules endothéliales vasculaires, l'interaction actine-myosine dépend de la phosphorylation de la chaîne légère de myosine (MLC : Myosin Light Chain) par la MLCK (Myosin Light Chain Kinase) qui provoque ainsi la contraction de l'actomyosine (**Verin, 1998**). Inversement une protéine phosphatase associée à la myosine provoque la déphosphorylation de la chaine légère de la myosine et donc sa relaxation (**Verin, 1995**). Le statut de phosphorylation de la chaine légère de la myosine peut être aussi régulé par le calcium ou bien les petites GTPases de type Rho (**Shasby, 1997, Van Nieuw Amerongen, 2001**).

IV.2. Régulation de la perméabilité endothéliale par phosphorylations

Les modifications de perméabilité endothéliale induite par des médiateurs de l'inflammation ou des facteurs de croissance font suite à la liaison de l'effecteur à son récepteur membranaire sur la cellule endothéliale. Ainsi par la génération de certains messagers secondaires, des voies de signalisation intracellulaires sont activées pouvant conduire à l'ouverture des jonctions intercellulaires, qui impliquent un réarrangement des complexes d'adhésion cellulaires et du cytosquelette.

IV.2.1. Rappel sur les processus de Phosphorylation

L'intérêt des modifications covalentes de protéines par introduction de phosphate est apparu avec la découverte de l'activation de la phosphorylase du glycogène du muscle squelettique **(Fisher, 1955 ; Krebs 1955)**. Les réactions catalysées pas des protéines kinases (PK) et réversibles *in vivo* par l'effet de phosphoprotéines phosphatases sont reconnues comme un mécanisme de régulation d'activités métaboliques majeures. La découverte de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) comme messager intracellulaire **(Haynes 1960)** a amené l'évidence que les phosphorylations de protéines constituent un mécanisme majeur dans les réponses cellulaires aux effecteurs humoraux de leur fonctions, agissant au niveau d'un récepteur membranaire spécifique **(Cohen, 1982,)**.

IV.2.2. Multiplicité des protéines kinases

Une protéine kinase transfert le groupement phosphate terminal d'un nucléotide triphosphate sur un groupement disponible d'un résidu acide aminé de la protéine substrat. Si les activités protéine kinases sont réversibles dans certaines conditions *in vivo*, la déphosphorylation des phosphoprotéines est réalisée dans la cellule par des phosphoprotéines phosphatases, elles même soumises à régulation. Ces dernières années ont clairement fait apparaître les notions de distribution ubiquitaire des activités protéine kinases dans les tissus animaux et celle de leur multiplicité. Environ 2000 kinases ont été recensées, plus de 100 structures tri-dimensionnelles ont été résolues. Elles peuvent être caractérisées par leur acide aminé cible et leur substrat nucléotidique. Deux types de résidus possèdent un groupement hydroxylé susceptible de lier un groupement phosphate : les tyrosines ou les sérines/thréonines. La source de phosphate est en général l'ATP mais une certaine catégorie d'enzyme utilise le GTP. L'intérêt majeur de la phosphorylation lors de la transmission des signaux est qu'elle constitue un moyen très rapide et réversible de modifier les protéines. Ainsi, l'équilibre entre

les protéines kinases et les protéines phosphatases constitue-t-il un moyen de régulation crucial pour la transmission des signaux.

- **Phosphorylations sur résidus sérine/thréonine**

Le taux de phosphorylation de la sérine, de la thréonine et de la tyrosine est respectivement de 1000 / 100 / 1. La famille des serine-thréonine kinases comportent les protéines kinases régulées par les nucléotides cycliques (AMP cyclique - GMP cyclique) : la protéine kinase A (PKA) et la protéine kinase G (PKG), respectivement ; la protéine kinase activée par le les phospholipides et le calcium : la protéine kinase C (PKC), les protéines kinases calcium / calmoduline dépendantes (CaM kinase), les protéines kinases calcium dépendantes (" Calcium-dependent protein kinases").
Ces kinases sont souvent activées en réponse à des stimuli hormonaux (ACTH, angiotensine, bradykinine, vasopressine etc.) et associées à la différenciation cellulaire. Un autre groupe de kinases impliquées dans la prolifération cellulaire a été décrit dans les années 1990 dont font partie les MAP kinases ("Mitogen-activated protein kinases"), c-jun N-terminal kinase, MAP kinase p38. Ces kinases sont indépendantes des nucléotides cycliques et du calcium, mais elles ont activées par phosphorylation sur thréonine et tyrosine.

- **Phosphorylations sur résidus tyrosine**

De nombreuses protéines jouant un rôle dans la transmission des signaux ont initialement été identifiées en tant qu'oncogènes dans le génome de rétrovirus transformants ou dans des cellules tumorales. Il s'est avéré par la suite que ces oncogènes correspondaient à des versions mutées de protéines cellulaires. La plupart des classes de protéines jouant un rôle dans la transmission des signaux - récepteurs, facteurs de transcription, protéines kinases ou encore protéines G - possèdent ainsi des contreparties oncogéniques. Les modifications des formes oncogéniques consistent dans la plupart des cas en des mutations ponctuelles ou des délétions, qui se traduisent par l'activation constitutive des molécules. L'un des premiers oncogènes a été découvert en 1910 par Peyton ROUS de l'Institut Rockefeller. Il s'agit du Sarcome de Rous ou Src qui a été identifié comme uniquement d'origine virale qui code pour une famille de tyrosines kinases dont le chef de file a été appelé pp60c-Src (**Eckart, 1979, Hunter, 2004**).
Les protéines tyrosine kinases sont peu abondantes puisqu'elles représentent seulement 2 % des protéines kinases totales. Plus de 90 protéines tyrosine kinases sont recensées dans le

génome humain et forment une très vaste famille multigènique. Deux groupes se distinguent ; les tyrosine kinases cytoplasmiques (32 de ce type) et les protéines tyrosine kinases récepteurs transmembranaires ("transmembrane receptor-linked kinases" (58 de ce type). Les kinases de la famille Src ont un processus de régulation élaboré, qui fait intervenir deux autres domaines en plus du domaine kinase, les domaines SH2 et SH3. Les domaines SH2 sont des séquences conservées d'une centaine d'acides aminés, qui reconnaissent et lient spécifiquement certains résidus tyrosines phosphorylés. Les domaines SH3 sont des séquences capables d'interagir avec d'autres séquences riches en proline. A l'état inactif, la kinase Src est verrouillée dans une conformation repliée sur elle-même, qui implique son domaine SH3 et SH2. Ce dernier interagit avec une tyrosine inhibitrice en position carboxy-terminal. L'activation de la kinase a lieu suite à la déphosphorylation de cette tyrosine qui permet l'ouverture de l'enzyme. (Figure 7).

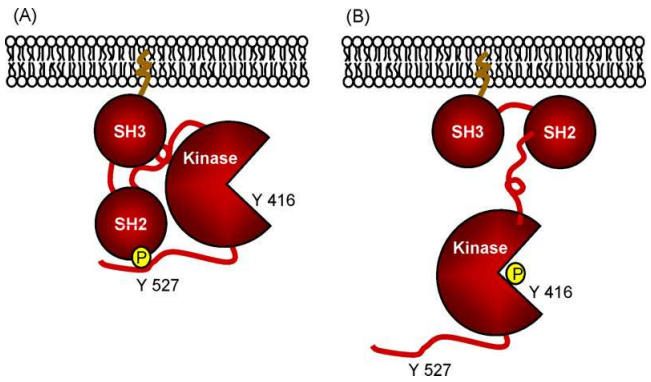


Figure 7 : Régulation de l'activité catalytique de Src. D'apres **Hu, 2008**. (A) conformation inactive. (B) conformation active.

La protéine tyrosine-kinase Csk (C-terminal Src kinase) est un régulateur négatif des SFKs, qui inactive ces enzymes en phosphorylant leur tyrosine inhibitrice et en imposant la conformation verrouillée. Les tyrosines phosphorylées dans les différents substrats deviennent des sites d'ancrage pour des protéines contenant des domaines SH2 et jouent un rôle majeur dans les interactions protéine/protéine.

IV.2.3. Les substrats de Protéines kinases dans la cellule endothéliale et leur influence sur la perméabilité endothéliale.

Des stimuli tels que la bradykinine, la thrombine, le PAF (Platelet activating Factor), le peroxyde d'hydrogène, le VEGF ou encore les neutrophiles activés augmentent la perméabilité endothéliale, et impliquent la protéine kinase C (**Tanita, 2000 (a et b), Wu, 1999**, **Dempsey, 2000**) (**Sandoval, 2001**). (**Sandoval (a et b), 2001**).

La Protéine Kinase A (PKA) présente des substrats dans la cellule endothéliale localisés au niveau du cytosquelette et des structures adhésives (**Morel, 1990, Seibert, 1992, Sheldon, 1993, Zink, 1995**). Certains auteurs ont rapporté qu'elle peut inhiber la MLC kinase **(Moy, 1997)**, et ainsi la dissociation actineF-myosine (**Langeler, 1991**), la stabilisation des filaments du cytosquelette (**Hastie, 1997**) et le maintien l'adhésion cellule-matrice (**Lampugnagni, 1990**).

Les tyrosine-kinases de la famille Src et Csk sont activées par VEGF et régulent la perméabilité vasculaire, l'angiogenèse **(Eliceiri, 1999; Weis, 2004)**, la motilité cellulaire et l'apoptose **(Abu-Ghazaleh, 2001)**. Chez la souris, l'invalidation génique de Csk engendre une létalité embryonnaire due à des défauts dans le bourgeonnement angiogénique et le remodelage vasculaire **(Imamoto, 1993)**. **(Duan, 2004).** De plus, l'inhibition de l'expression de Csk dans des cellules endothéliales humaines par interférence ARN (RNAi) est corrélée à une augmentation de la prolifération cellulaire.

Une tyrosine kinase appelée Spleen Tyrosine Kinase (Syk) qui a tout d'abord été isolée à partir de la rate, les poumons et le thymus, puis clonée dans la rate de porc en 1991 (**Taniguchi, 1991**), a un rôle majeur dans la perméabilité endothéliale. En effet, son invalidation génique chez la souris se traduit par phénotype endothélial avec une létalité due à des hémorragies et des malformations des vaisseaux. **(Inatome**, **2001**). De plus, *in vitro* son inhibition est corrélée avec une inhibition de la migration et la prolifération des cellules endothéliale. (**Inatome, 2001**). Plus récemment étudiée dans d'autres plusieurs modèles cellulaires comme les cellules épithéliales tumorales mammaires (**Coopman, 2000**), les cellules épithéliales des voies respiratoires (**Ulanova, 2005**), les fibroblastes humains (**Yamada, 2001**), les cellules neurones-like (**Tsujimura, 2001**), les hépatocytes (**Tsuchida, 2000**) et les mélanocytes (**Hoeller, 2005**), elle semble jouer un role majeur dans l'adhérence cellule-cellule en réponse à des effecteurs tels que la thrombine (**Bijli, 2008**), ou le TNF-α (**Mun, 2009**).

IV.3. Les jonctions endothéliales

Les différents systèmes de jonctions vont permettre la cohésion des cellules entre elles, mais également la cohésion des cellules avec les constituants de la matrice extracellulaire sous-jacente. La cohésion des cellules endothéliales est établie grâce à plusieurs types de jonctions : les jonctions serrées, les jonctions adhérentes, les desmosomes et les jonctions gap (Figure 8). Ces structures jonctionnelles sont formées de protéines transmembranaires responsables de l'adhésion homotypique intercellulaire. Ces protéines transmembranaires lient des partenaires

cytoplasmiques spécifiques qui les ancrent au cytosquelette d'actine, stabilisant ainsi la jonction. Seules les jonctions serrées et adhérentes sont reliées au cytosquelette d'actine et aux protéines intervenant dans les différentes voies de signalisation (**Broman, 2006, Carmeliet, 1999, Dejana, 2004, Esser, 1998, Gavard, 2006, Lampugnani, 2003**).

Les jonctions des cellules endothéliales et des cellules épithéliales partagent certaines homologies. En effet, les deux types cellulaires, possèdent les jonctions adhérentes ou *zonula adhaerens*, et les jonctions étanches, appelées également jonctions serrées ou *zonula occludens*. De plus, à la différence des cellules épithéliales, les cellules endothéliales sont dépourvues de desmosomes. Cependant, certains types de cellules endothéliales, comme celles du système lymphatique ou des veines, possèdent des structures proches, appelées *complexus adhaerentes* **(Schmelz, 1993, 1994)**, qui contiennent certains des composants des desmosomes.

L'organisation des jonctions endothéliales varie le long de l'arbre vasculaire en fonction des besoins spécifiques des organes. Les jonctions adhérentes sont ubiquitaires dans tous les types de vaisseaux. En revanche, les jonctions étanches montrent plus de variabilité. Ainsi, dans le cerveau, où un contrôle strict de la perméabilité entre le sang et le système nerveux est nécessaire, les jonctions sont très développées, avec une forte proportion de jonctions étanches. À l'inverse, les veinules post-capillaires, qui permettent un trafic dynamique de cellules circulantes et de protéines plasmatiques en possèdent peu.

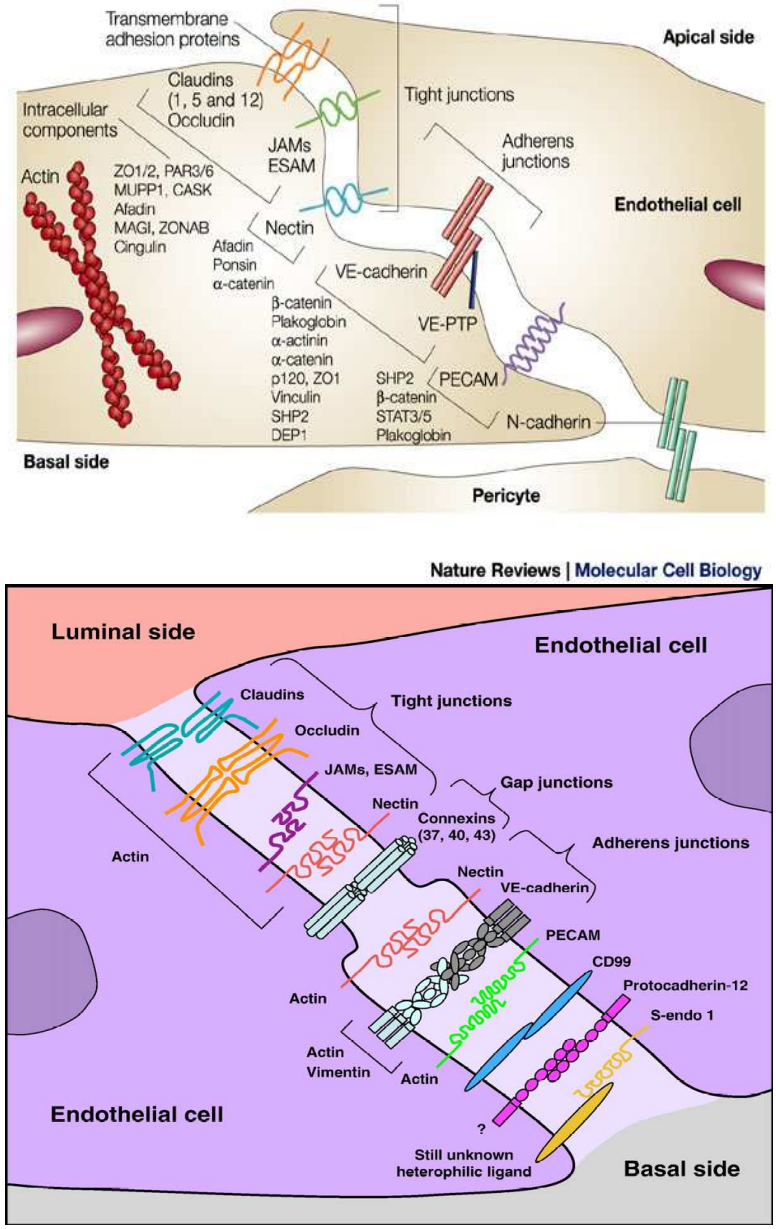


Figure 8 : Deux descriptions de l'organisation moléculaire des jonctions endothéliales. D'après **Dejana, 2004 et Wallez, 2007.**

IV.3.1. les complexus adhaerentes

La majorité des cellules qui composent l'endothélium ne possèdent pas de jonctions desmosomales comme celles de l'épithélium. Cependant, des structures communes ou dérivées de l'endothélium comme les vaisseaux lymphatiques et les microvaisseaux possèdent des structures assimilées aux desmosomes : les complexus adhaerentes. (**Dejana, 2004, Zhou, 2004**).

Ces jonctions, peu décrites à ce jour, jouent un rôle dans la vasculogenèse, essentiellement. Ces complexus sont reliés de façon indirecte aux filaments intermédiaires via la desmoplakine

(**Calkins, 2003, Cattelino, 2003, Gallicano, 2001**). Ces structures pourraient, par cette liaison avec les filaments intermédiaires, jouer un rôle important dans la perméabilité endothéliale et l'angiogenèse en plus de la vasculogenèse (**Gallicano, 2001**).

IV.3.2 Les jonctions serrées ou zonula occludens

- **Définition et rôle**

Les jonctions serrées sont les jonctions prédominantes de l'épithélium alors que ce sont les jonctions adhérentes qui sont les plus nombreuses dans l'endothélium (**Metha, 2006, Balkovetz, 2006**). Dans les cellules endothéliales et épithéliales polarisées, les jonctions serrées forment une structure au pôle apical et représentent une frontière entre les domaines membranaires apicaux et baso-latéraux (**Tsukita, 2001**). Elles sont constituées de protéines transmembranaires qui sont reliées au cytosquelette, permettant la création de sites d'adhésion cellule-cellule ou cellule-substrat. Des protéines cytoplasmiques leur sont associées et jouent un rôle dans les mécanismes physiologiques de transcription, prolifération, différenciation régulés au niveau de certains organes au cours du développement ou pour maintenir l'intégrité de la barrière endothéliale.

- **Structure des jonctions serrées**

On distingue principalement trois classes de protéines transmembranaires qui composent la jonction serrée et de nombreux complexes multi-protéiques à l'origine de ses fonctions.
-La première est constituée des claudines, occludines et tricellulines. Ces protéines sont similaires et possèdent comme caractéristique d'avoir une hélice extracellulaire, un domaine transmembranaire et les parties N- et C-terminale localisées dans le cytoplasme. A ce jour, 24 claudines, dont le poids moléculaire est de 22 kDa, ont été identifiées chez l'humain. Cependant les claudines semblent connaitre une spécificité tissulaire : par exemple, la claudine-5 n'est exprimée qu'au niveau des cellules endothéliales vasculaires alors que la claudine-11 est exprimée plutôt dans les oligodendrocytes et les cellules de Sertoli. Le rôle des claudines est de former des motifs de type homo- ou hétéro-philiques en interagissant en *cis*- ou en *trans*-. Le nombre important de claudines, leur capacité à former des liaisons hétérophiliques et leur sélectivité pour certains ions leur permettent d'établir des jonctions serrées avec des propriétés de perméabilité spécifiques et qui dépendent des besoins du tissu (**Furuse, 2006, Ebnet, 2008**). L'occludine, protéine de 60kDa**,** semble avoir un rôle plus

accessoire au sein de la jonction serrée : en effet, son expression ectopique n'induit pas nécessairement la formation d'une jonction contrairement à la claudine (**Yu, 2005, Furuse, 1998**). La tricelluline diffère des deux autres types de protéines membranaires car elle se situe le plus souvent au niveau de contacts « tri-cellulaires » (**Ikenouchi, 2005**).

-La deuxième famille de protéines transmembranaires qui compose la jonction serrée comprend des membres de la sous-famille CTX (cortical thymocyte marker in *Xenopus*) de la super-famille des immunoglobulines (Ig) qui est caractérisée par deux motifs, un domaine de type V et un domaine de type C2- Ig- like. Cette sous-famille peut encore être subdivisée en deux groupes, celui qui rassemble les molécules JAM-A, B et C (Junction adhesion Molecule A, B et C) et celui qui rassemble les molécules CAR (coxsackie- and adenovirus receptor), CLMP (coxsackie- and adenovirus receptor-like membrane protein), ESAM (Endothelial Selective cell Adhesion Molecule) et JAM-4 (**Ebnet, 2004**). Excepté pour JAM-A, la littérature est assez peu informative sur le rôle de ces protéines dans la formation ou la fonction de la jonction serrée. Toutes, exceptée CLMP, interagissent avec un autre type de protéines qui sont cytoplasmiques : par exemple, les protéines CAR, JAM-A, -B et –C interagissent avec les protéines ZO-1 (Zonula Ocludens-1) (Cohen, 2001, Ebnet, 2000 et 2003), les protéines JAM-A, -B et –C avec la protéine PAR-3 (**Ebnet, 2001, 2003**) et les protéines ESAM et JAM-4 avec MAGI-1 (Membrane Associated Guanylate Kinase-1). JAM-A est localisé de façon précoce au niveau des jonctions serrées et c'est en recrutant PAR-3 qu'elle permet l'initialisation de la polarisation de la membrane latérale conduisant à la formation de la jonction.

-La troisième famille de protéines transmembranaires qui composent la jonction serrée ne contient qu'un membre, CRB-3 (Crumbs-3). Cette protéine est caractérisée par un très petit domaine extra-cellulaire de 36 acides aminés, un domaine transmembranaire simple et une courte queue cytoplasmique. Contrairement aux autres protéines transmembranaires qui composent la jonction serrée, la fonction de CRB-3 reste relativement mal connue à ce jour.

- **Les complexes protéiques associés à la jonction serrée**

Le nombre de protéines colocalisées avec la jonction serrée ne cesse d'augmenter depuis la découverte de ZO-1 et son clonage en 1993. Il peut s'agir de petites GTPases, de protéines G, de kinases, de phosphatases, mais aussi de facteurs de transcription.

Certaines protéines comportant des domaines PDZ (Post-synaptique Disc-large Zonula),ou GuK (Guanylate Kinase), ou SH2 ou SH3 (Src Homology Domain 2 et 3) régulent ces

associations (**Pawson, 2003**). Trois principaux complexes de protéines formant la jonction serrée sont décrits: le complexe ZO-1, le complexe Pals-1/PATJ et le complexe PAR-3/αPKC/PAR6. ZO-1 est une protéine de 220 kDa, membre des protéines de la famille MAGUK (Membrane Associated Guanylate Kinase) et possède trois domaines PDZ, un domaine SH3 et un domaine GuK. ZO-1 peut interagir directement avec un certain nombre de protéines transmembranaires décrites ci-dessus parmi lesquelles l'occludine, les claudines, les JAMs et CAR. Mais ZO-1 peut aussi interagir avec des protéines comme ZO-2 et -3 et le cytosquelette d'actine (**Fanning, 1998, 2002, Wittchen, 1999**) (**Ebnet, 2006**).
Au final, chacune des protéines et complexes cités ci-dessus sont capables d'interagir avec des partenaires de la signalisation cellulaire tels que des facteurs de transcription ou des kinases/phosphatases, ce qui montre la dynamique potentielle de telles structures.

- **Régulation de la perméabilité endothéliale par les jonctions serrées**

La régulation de la perméabilité endothéliale impliquant les jonctions serrées est beaucoup moins bien connue que celle régulée par les jonctions adhérentes. Bien que ces jonctions soient moins abondantes que les jonctions adhérentes, elles n'en sont pas moins extrêmement importantes pour l'intégrité de la barrière endothéliale.
La barrière hémato-encéphalique (BHE) entre le sang et le cerveau et la barrière rétinienne (BRB) entre le sang et la rétine sont très riches en jonctions serrées, c'est d'ailleurs à ce niveau que leur rôle dans la perméabilité endothéliale à été le plus étudié (**Wallez, 2008**).
Les mécanismes qui conduisent à la dissociation des jonctions serrées au niveau de la BHE sont exposés ci dessous :
- le calcium :
Avant même que les protéines qui composent les jonctions serrées ne soient découvertes, il était connu que les variations de concentration calcique pouvait conduire à une dissociation des jonctions serrées de la BHE **(Nagy, 1985, Abott, 1991)**. Ainsi la culture de cellules épithéliales à taux faible en Ca2+ induit une perte d'expression des protéines de la jonction serrée telles que l'occludine, ZO-1 et 2 et ceci est associé à une augmentation de la perméabilité para-cellulaire. Ces effets sont atténués par une inhibition de la protéine kinase A **(Klinger, 2000)**. Le calcium est un modulateur de la protéine kinase C qui est donc semble aussi impliquée de la régulation des jonctions serrées. En effet, sa sur-activation est capable de contrebalancer les effets délétères d'une faible concentration de Ca2+ extracellulaire

(Balda, 1993). Par ailleurs, les variations de calcium intra- et extracellulaires peuvent activer d'autres voies de signalisation conduisant à l'activation de facteurs de transcription (NFκB (Nuclear Factor-κB), c-fos, etc.) qui régulent l'expression des protéines de la jonction serrée **(Brown, 2002)**.

-Régulation par des mécanismes de phosphorylation :

Les phosphorylations sur sérine et thréonine de l'occludine régulent sa localisation subcellulaire (**Andreeva, 2001**) et sont très fortement corrélées avec le réassemblage de la jonction serrée après sa dissociation. Ainsi, le VEGF est capable d'induire la phosphorylation de l'occludine *via* la protéine PKA, de même que l'activation du système urokinase (uPA/uPAR) qui va protéolyser l'occludine (**Antonetti, 1998, Behzadian, 2003**), et ceci conduit à la dissociation des jonctions et une augmentation de la perméabilité.

Sur les cellules endothéliales de cerveau, l'AMPc par activation de la PKA induit une l'augmentation d'expression de la Claudine-5 au niveau du complexe jonctionnel (**Ishizaki, 2003**). D'anciennes évidences avaient par ailleurs montré que la perméabilité endothéliale jonctionnelle était corrélée avec le niveau de phosphorylation de la protéine ZO-1 (**Stevenson, 1989**). Il existe donc une réelle corrélation entre phosphorylations sur tyrosine, serine, thréonine et fonctions des jonctions serrées dans la barrière endothéliale.

-Régulation par les protéines G :

Le rôle des protéines G a été largement étudié dans le développement et la fonction des jonctions serrées (**Balda, 1991, Saha, 1998, Hopkins, 2000**). Les protéines G hétéro-trimériques sont exprimées dans les cellules endothéliales cérébrales où elles participent à la transmigration des lymphocytes T (**Adamson, 2002**). Les petites protéines G de la famille des GTPases Rho ont été impliquées dans l'altération de la perméabilité endothéliale suite aux modifications du cytosquelette d'actine. Elles agissent ainsi en amont du récepteur à l'acide lysophosphatidique couplé aux protéines G et du récepteur à la prostaglandine E2 (**Hasegawa, 1999**).

Les protéines Rab, connues principalement pour leur rôle dans le trafic vésiculaire, sont aussi impliquées dans le régulation des protéines des jonctions serrées comme ZO-1 (**Stevenson, 1998**).

L'activation de la protéine p21ras , issue aussi des petites protéines G, est associée à une rupture des contacts intercellulaires, la perte de ZO-1 du complexe jonctionnel et l'augmentation de la perméabilité vasculaire car elle cible la protéine AF-6 , un interactant de ZO-1 (**Yamamoto, 1998, Hawkins, 2005**).

- **Fonctions des jonctions serrées**

Les jonctions serrées jouent un rôle majeur dans l'établissement de la polarité cellulaire. Elles forment une ceinture apicale séparant la cellule en un compartiment apical et un compartiment basolatéral, empêchant ainsi la diffusion latérale des composés lipidiques et protéiques apicaux et baso-latéraux de la membrane plasmique. Elles constituent une barrière semi-perméable pour les ions et solutés en régulant leur diffusion par la voie paracellulaire. Ainsi, la diffusion latérale de protéines membranaires est restreinte et contrôlée. Par exemple, les canaux sodiques restent au niveau du domaine apical tandis que les pompes à sodium et potassium dépendantes de l'ATP (Adenosine Tri-Phosphate) se situent au niveau baso-latéral. (**Bazzoni, 2003**).

Les jonctions serrées semblent jouer aussi un rôle également dans la prolifération cellulaire, en l'inhibant via le facteur de transcription lié à ZO-1, ZONAB (ZO-1 Associated Nucleic Acid Binding). Lorsque ZONAB est associé aux complexes de jonctions serrées, il devient inactif (**Balda, 2003, Matter, 2003**) alors qu'il peut interagir avec la protéine cdk4 (Cyclic Dependant Kinase-4), activant alors la prolifération cellulaire.

IV.2.3. Les jonctions communicantes ou jonctions gap

- **Définition et rôle**

Ces structures, présentes dans toutes les cellules des vaisseaux sanguins, sont abondantes. La protéine majeure de la jonction communicante est la connexine (Cx), qui comporte quatre domaines transmembranaires, deux boucles extracellulaires et ses extrémités N- et C-terminales cytoplasmiques. Six sous-unités Cx s'assemblent pour former un hémi-canal, appelé connexon, dans la membrane plasmique. Ce connexon s'associe au connexon de la cellule voisine, formant alors une jonction communicante complète. Les jonctions communicantes permettent de faire passer directement des molécules de la signalisation, incluant les ions et les petits métabolites (de masse inférieure à 1KDa) d'une cellule à l'autre (**Sohl, 2004, Haefliger, 2004**). Ce mode de communication permet à une cellule de connaître l'état fonctionnel de ces voisines et d'adapter les besoins immédiatement à tout un groupe de cellules voisines (Figure 9).

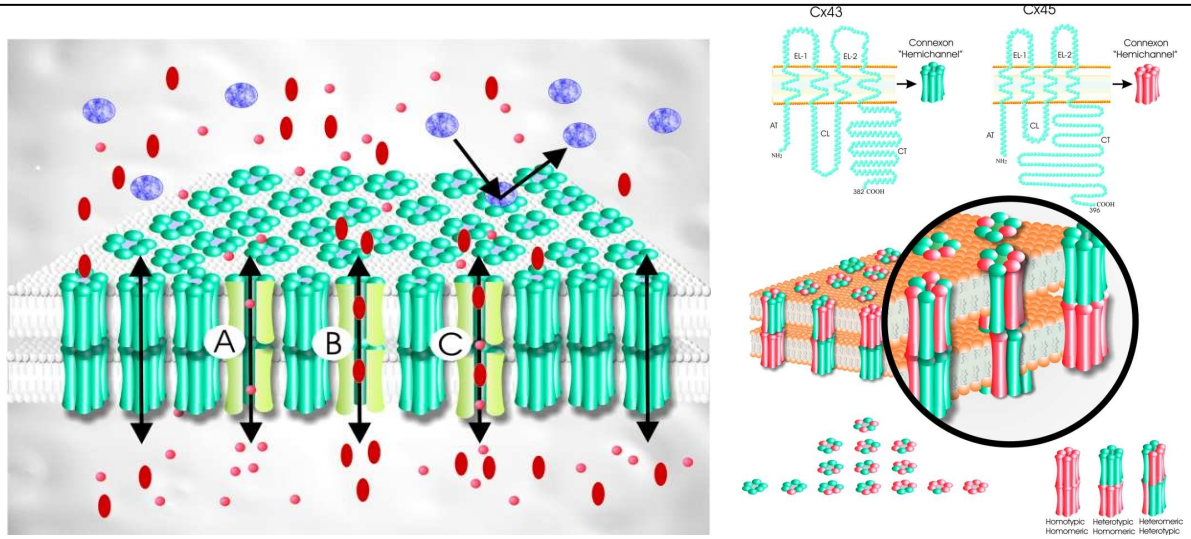


Figure 9 : organisation structurale des connexons et des jonctions gap. D'apres **Laird, 2006.** Les jonctions communicantes sont organisées en hémi-canaux composé de six connexines Les canaux permettent le transport, soit de petites molécules (A), de molécules avec des motifs d'élongation (B) ou des deux en même temps (C). La liaison d'un « réseau » de connexine à celui de la cellule adjacente peut être de type homo/hétéro-philique et/ou homo/hétéro-typique.

- **Les connexines « vasculaires »**

Dans le système vasculaire, ce sont quatre connexines : Cx 37, Cx 40, Cx 43 et Cx45 qui ont été les plus largement décrites. Mais l'expression de ces connexines n'est pas uniforme dans l'endothélium de tous les vaisseaux et dépend aussi des espèces considérées. Par exemple, les jonctions gap de l'endothélium natif sont composées de Cx 37, 40 et 43, et ceci dépend du type de vaisseau et de sa position dans l'arbre vasculaire (**Bruzzone, 1993, Traub, 1998**).

Les connexines ont une demi-vie très courte, de quelques heures seulement. Les connexines sont pré-programmées pour être synthétisées et dégradées en permanence (**Laird, 2006**).

Les connexines sont généralement déjà présentes sous forme d'oligomères au niveau du Reticulum Endoplasmique sauf Cx 43 qui est encore présente sous forme monomérique dans l'appareil de Golgi et qui oligomèrise dans le réseau *trans*-golgien (**Sarma, 2002, Falk, 1998**).

Les connexines utilisent différents moyens de transport jusqu'à la membrane plasmique pour y assurer leur fonction en formant des connexons. Les connexons, bien qu'insérés dans la membrane, sont capables de diffuser latéralement au sein de la bicouche lipidique et forment des canaux jonctionnels, guidés par la N- et la E-cadhérine. Des études ont par ailleurs montré que la N-cadhérine et la Cx 43 étaient co-assemblées suggérant un lien direct entre jonctions communicantes et jonctions adhérentes.

L'étude de la dégradation des connexines a montré qu'elle était plus complexe que pour la majorité des protéines transmembranaires qui sont dégradées par la voie des lysosomes. En effet, la Cx 43 a été montrée être substrat potentiel de l'ubiquitine, ce qui a conduit à l'hypothèse que la voie de dégradation pouvait vraisemblablement être dépendante du protéasome. En réalité les deux voies de dégradation restent possibles (**Laing, 1997, Leithe, 2004**).

- **Signalisation des jonctions communicantes**

Les connexines sont des protéines qui ont été montrées phosphorylées. Ces phosphorylations sous-entendent qu'elles doivent interagir avec des protéines kinases ou phosphatases, de façon transitoire au minimum. Les kinases impliquées incluent les protéines v- et c-Src, les MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase), cdc2 kinase (cycline-dependent kinase), CK1 (casein Kinase-1) et la PKA (Protéine kinase A).

Les connexines sont aussi associées à d'autres types de protéines qui n'ont pas d'activité kinase. Ainsi, les connexines sont capables d'interagir avec des protéines de la jonction serrées comme ZO-1. Un autre membre de la famille MAGUK est associé aux connexines, il s'agit de ZO-2 mais le rôle de cette association connexines/ZO-1 et 2 commence seulement à être compris. Les protéines ZO-1 et 2 s'associent avec Cx 43 à différentes étapes du cycle cellulaire. ZO-1 est associé à Cx 43 lorsque les cellules sont quiescentes, suggérant que ce complexe possède un rôle stabilisateur des jonctions gap (**Giepmans, 1998, Toyofuku, 1998, Singh, 2005**). Les jonctions communicantes sont également étroitement liées aux jonctions adhérentes et ces deux complexes semblent agir en parfaite coordination.

En effet, d'autres protéines peuvent interagir avec les connexines comme la β-caténine, l'α et la β-tubuline mais aussi des protéines qui sont liées à l'actine comme la drebrine. Le fait d'être connectées avec toutes ces protéines confèrent aux jonctions communicantes des rôles bien précis de communication intercellulaire et font d'elles des carrefours de signalisation qui régulent l'adhérence cellulaire et la morphologie vasculaire (Figure 10).

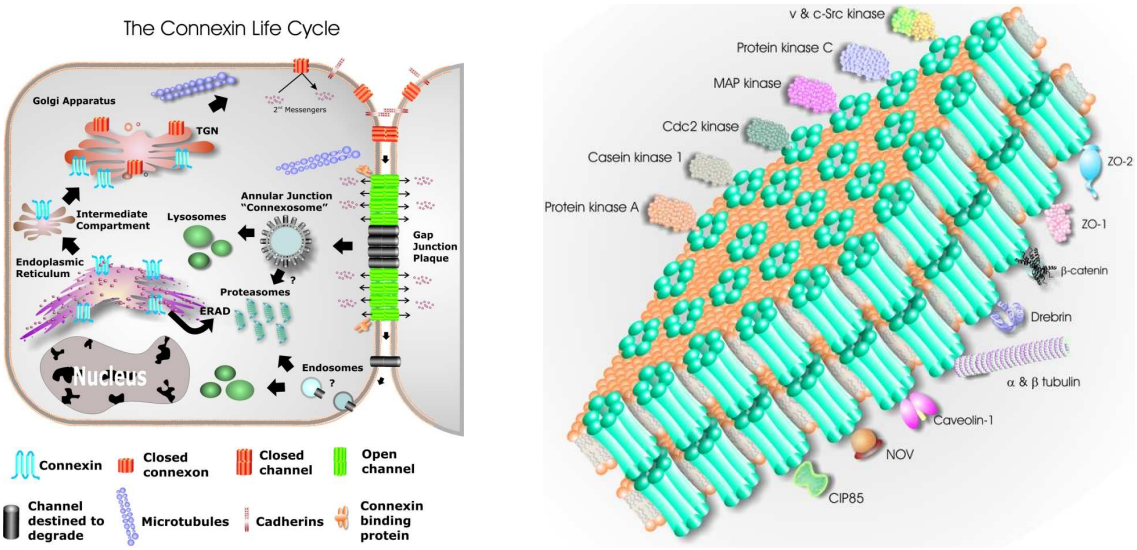


Figure 10 : le cycle des connexines et leurs interactions potentielles. D'apres **Laird, 2006**.

IV.2.4. Les jonctions adhérentes

Les jonctions adhérentes forment une ceinture adhérente située au dessus et en dessous des jonctions serrées (Figure 8). Contrairement aux jonctions serrées où les membranes plasmiques fusionnent, il existe un espace intercellulaire d'environ 15 à 20nm. Les jonctions adhérentes jouent un rôle important dans la stabilisation des jonctions serrées par leur localisation, mais aussi dans la coordination de nombreux processus cellulaires. Les jonctions adhérentes sont présentes dans tout le système vasculaire. (**Gumbiner, 2005**). Les molécules principales d'adhésion de ces jonctions, les cadhérines classiques, établissent des liaisons de type homophilique dépendantes du Ca^{2+} avec les molécules de la cellule voisine et sont reliées au cytosquelette à travers des protéines associées à leur domaine cytoplasmique : les caténines (**Ebnet, 2008**).

Dans les cellules endothéliales, les deux cadhérines impliquées dans les jonctions adhérentes préférentiellement sont la N- et la VE-cadhérine Ces jonctions adhérentes endothéliales représentent le cœur de notre étude, notamment en ce qui concerne la régulation des fonctions de la VE-cadhérine (cf paragraphe V).

IV.2.5. Les autres systèmes d'adhérence

D'autres protéines, souvent issues de la super-famille des immunoglobulines, ont le même rôle d'adhésion que les protéines constitutives des jonctions adhérentes. Il s'agit de systèmes tels que celui des nectines/afadines ou le complexe protéique comportant majoritairement PECAM (Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule) ou encore les molécules ICAM (Intercellular Cell Adhesion Molecule) et VCAM (Vascular Cell Adhesion Molecule).

- **Le système nectine/afadine**

Les nectines appartiennent à la super famille des immunoglobulines et leur activité adhésive est indépendante du Ca^{2+} (**Irié, 2004, Ogita, 2006**). Chaque nectine forme d'abord des dimères en *cis*- puis des dimères en *trans*-. Quatre membres de cette famille ont été identifiés, les nectines 1 à 5, chacune de ces nectines ayant deux ou trois variants d'épissage. Il existe également cinq nectines-« like » : Necl 1-5. Les nectines possèdent une région extracellulaire constituée de trois hélices « Ig-like », une seule région transmembranaire et un domaine cytoplasmique. Toutes les nectines, excepté les nectines -1, -3 et -4, ont quatre acides aminés conservés au niveau C-terminal : Glu/Ala-X-Tyr-Val qui se lie au domaine PDZ de l'afadine (ou AF-6), protéine de liaison de l'actine et qui donc les connecte au cytosquelette d'actine de façon indirecte. Les nectines-« like » ne possèdent pas de motifs PDZ et ne sont donc pas reliée à l'afadine. L'afadine possède, quant à elle, deux variants d'épissage. Le plus long s'arrime aux nectines par son domaine PDZ et à l'actine F au niveau de son résidu C-terminal (**Irié, 2004**).

Dans l'endothélium, seules la nectine-2 et la Necl-5 ont été identifiées. La nectine-2 est un récepteur du virus de l'herpes α et la Necl-5 est un récepteur du virus de la polio ce qui suggère que ces deux protéines sont impliquées dans la dissémination virale. La nectine-2 est capable d'interagir *via* des liaisons homophiliques et hétérophiliques avec la nectine-3 tandis que la Necl-5 n'effectue pas d'interaction homophilique avec la nectine-3 mais est cependant capable de d'interagir avec elle. La Necl-5 est également un récepteur potentiel de CD226/ DNAM-1 (DNAX Accesory Molecule-1), une glycoprotéine transmembranaire dans les cellules B et T, les cellules NK (Natural Killers), les monocytes et les plaquettes. La Nec-5 facilite ainsi la transmigration des leucocytes à travers la monocouche endothéliale lui conférant un rôle dans les processus inflammatoires *in vivo*, ce qui n'est pas le cas de la Nectine-2 malgré sa liaison à DNAM-1 (**Reymond, 2004, Wallez, 2007**).

- **Système d'adhésion comportant PECAM-1**

PECAM-1 est une glycoprotéine de 130 kDa qui appartient à la super-famille des Ig et possède 6 boucles Ig dans son domaine extracellulaire. La molécule PECAM réalise des liaisons homophiliques mais d'autres partenaires peuvent interagir avec elle réalisant des liaisons hétérophiliques (**Woodfin, 2008**). L'expression de la protéine PECAM-1 est retrouvée dans les plaquettes sanguines, les cellules endothéliales, les monocytes, et les

neutrophiles (**Ilan, 2003**). La fonction de PECAM-1 n'est pas seulement restreinte à ses propriétés adhésives. En effet, cette protéine est aussi impliquée dans certains mécanismes de transduction du signal par des interactions avec des molécules adaptatrices, principalement à travers des phosphorylations de résidus tyrosines situés au niveau du motif ITAM (Immunoregulatory Tyrosine-based Activation Motif) de son domaine cytoplasmique. Mais ces interactions peuvent également s'effectuer via des phosphorylations sur résidus serine/thréonine comme c'est le cas pour sa liaison à PKC qui permet d'être le censeur d'associations avec d'autres protéines adaptatrices.

L'autre caractéristique de PECAM-1 c'est la présence de 2 motifs ITIMs (Immunoreceptor Tyrosine Inhibitory Motif) centrés autour de deux tyrosines importantes de PECAM-1, les tyrosines Y^{663} et Y^{686}, dans son domaine cytoplasmique (**Jackson, 1997**). Ces motifs sont le siège d'interaction avec des protéines tyrosine phosphatases lorsqu'ils sont phosphorylés par des kinases appartenant probablement à la famille Src kinase, dont la nature reste à être déterminée.

La tyrosine Y^{663} phosphorylée est un site d'arrimage spécifique du domaine SH2 (Src Homology 2) de la protéine phosphatase SHP2 (SH2-domain-containing-protein Phosphatase 2), qui va ensuite agir sur d'autres protéines de la signalisation (**Jackson, 1996**).

PECAM-1 est aussi capable d'interagir avec les Intégrines, selon un mécanisme soit outside-in soit inside-out (extérieur-intérieur ou intérieur-extérieur), régulant ainsi leur activation et leur recyclage.

PECAM-1 est également associée aux β- et γ- caténines de la jonction adhérente composée de VE-cadhérine. La β-caténine phosphorylée interagit avec PECAM-1 dans son état non phosphorylé (**Biswas, 2005**). Par cette liaison, PECAM-1 constituerait un réservoir de β-caténine phosphorylée au niveau de la membrane plasmique, empêchant par la même sa dégradation par le protéasome, soit son transport dans le noyau où elle sert de facteur de transcription lors de sa délocalisation (figure 11).

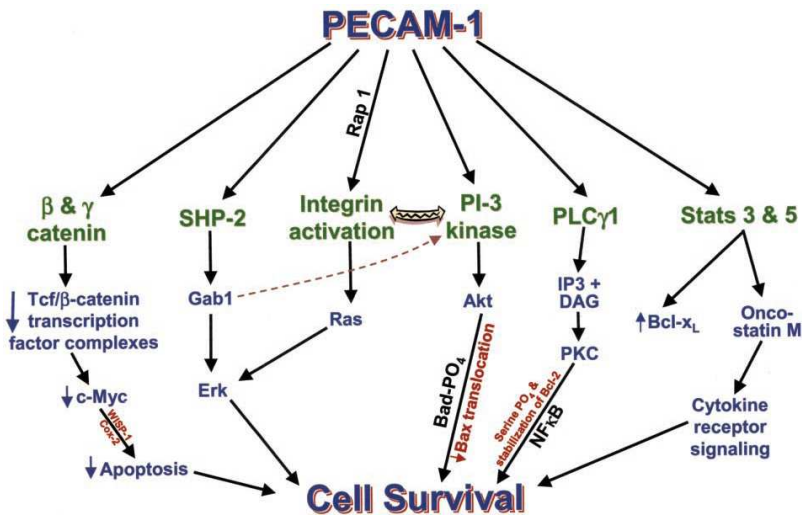


Figure 11 : Mécanismes de signalisation par PECAM. D'après Newman, 2003. La protéine PECAM est à l'origine de nombreux ou le transducteur de nombreuses voies de signalisation de la cellule endothéliale.

- **Les autres molécules d'adhésion: VCAM et ICAM**

En plus de tous les systèmes d'adhésion complexes décrits ci-dessus, il existe certaines protéines qui sont exprimés au niveau de la cellule endothéliale en physiopathologie (**Van Buul, 2008**). Il s'agit principalement d'ICAM-1 et de VCAM-1. Ces protéines agissent en lien direct avec les intégrines et sont généralement impliquées dans les mécanismes de reconnaissance, d'adhésion ou de transmigration des leucocytes à travers la barrière endothéliale.

L'endothélium quiescent exprime peu de molécule ICAM-1. Au cours d'un mécanisme comme, par exemple, un stimulus inflammatoire, l'expression de ICAM-1 est très fortement augmentée, permettant l'adhésion intégrines-dépendante des leucocytes à l'endothélium. ICAM-1 est une molécule composée de cinq domaines extracellulaires Ig-like, un domaine transmembranaire et une courte queue cytoplasmique qui comporte seulement 28 acides aminés. Le domaine cytoplasmique d'ICAM-1 est impliqué dans de nombreuses voies de signalisation cellulaire notamment l'activation de petites GTPases comme RhoA et RhoG (**Etienne-Malville, 2000**), l'induction de changements du cytosquelette (**Adamson, 1999**) et l'activation de la protéine kinase Src (**Wang, 2003**). Tous ces changements permettent la migration des leucocytes à travers l'endothélium (TEM pour Trans-Endothelial Migration). Le domaine intracellulaire d'ICAM-1 ne possède pas de motif particulier de type PDZ mais il est connu pour colocaliser avec d'autres types de protéines telles que l'α-actinine, l'ezrine et la moésine.

Des résultats similaires ont été rapportés pour la molécule VCAM-1, un ligand spécifique des intégrines β1. La stimulation de VCAM-1 conduit à l'activation de la petite GTPase Rac1 qui provoque une augmentation des ROS (Reactive Oxygen species) (**Wetering, 2003**). Ces réactifs vont favoriser la migration trans-endotheliale. Certains auteurs ont rapporté l'interaction de VCAM-1 avec l'ezrine et la moésine dans des structures endothéliales particulières mais en fait ses autres interactions potentielles ne sont pas connues, malgré le fait que VCAM-1 possède dans son domaine cytoplasmique une région qui ressemble à un domaine PDZ.

V. LA VE-CADHERINE, CADHERINE DES JONCTIONS ADHERENTES ENDOTHELIALES

Les molécules d'adhésion ont un rôle majeur dans la régulation de la perméabilité endothéliale. Au laboratoire, nous nous sommes intéressés plus particulièrement aux rôles des jonctions adhérentes endothéliales et plus précisément à travers l'étude de la VE-cadhérine.

V.1. Structure de la VE-cadhérine

Les jonctions adhérentes, ubiquitaires le long de l'arbre vasculaire, sont présentes à la fois dans les vaisseaux sanguins et lymphatiques. La molécule d'adhésion spécifique et majoritaire des jonctions adhérentes des cellules endothéliales est la VE-cadhérine (vascular endothelial-cadhérine). Cette protéine est directement impliquée dans le maintien des contacts intercellulaires **(Dejana, 1999)**. Il s'agit d'une glycoprotéine transmembranaire de type I de 125 kDa, de 784 acides aminés, dont le domaine extracellulaire comporte 592 acides aminés et est formé de cinq ectodomaines (EC1 à 5) d'environ 100 acides aminés (Figure 12). Les domaines EC1 à EC4 sont composés de structures en feuillet β comme ses homologues, la E- et la N- cadhérines. Le domaine EC5, le plus proche de la membrane, comprend quatre résidus cystéine à l'origine de deux ponts disulfures. Les sites de fixation du Ca^{2+} sont situés au niveau du domaine extracellulaire plus particulièrement dans les régions inter-modulaires et la saturation de ces sites pourrait être à l'origine de la rigidité du domaine extracellulaire de la VE-cadhérine par formation de multimères de VE-cadhérine (**Nagar, 1996**).

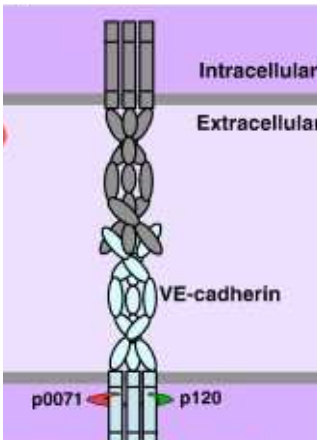


Figure 12 : Représentation de la structure de la VE-cadhérine. D'après **Wallez, 2007.**

V.1.1. Auto-assemblage de la VE-cadhérine

Il a été montré au laboratoire que le domaine extracellulaire de la VE-cadhérine recombinant (modules EC1à 4) produit à partir de la bactérie *Escherichia coli*, peut s'organiser en hexamères. Ces hexamères correspondent en fait à un trimère de dimères où chaque dimère résulte de l'association antiparallèle de deux monomères via les modules EC1. La trimérisation se fait ensuite par l'intermédiaire des modules EC3 et 4 qui interagissent en cis.

In vitro, des pseudo-jonctions ont pu être reconstituées par intégration du domaine recombinant EC1-4 de la VE-cadhérine humaine dans des liposomes. L'observation de ces jonctions par cryo-électro-microscopie, montre deux surfaces membranaires parallèles séparées par du matériel protéique, dense aux électrons. Ces jonctions présentent une épaisseur de 23 nm (± 1nm) et s'étendent latéralement, révélant une organisation régulière (**Lambert, 2005**). En vue latérale, elles apparaissent constituées d'anneaux empilés dont le diamètre correspond à celui des hexamères observés en solution (**Legrand, 2001**) (Figure 12). Ainsi, le domaine extracellulaire de la VE-cadhérine peut à lui seul provoquer cet auto-assemblage cohésif.

L'assemblage de la VE-cadhérine, à travers son domaine extracellulaire, permet de mieux comprendre les mécanismes d'adhésion cellule-cellule *in vitro*. Il est à noter que d'autres mécanismes impliquant le domaine cytoplasmique de la VE-cadhérine sont aussi à l'origine de modifications de l'adhésion cellule-cellule

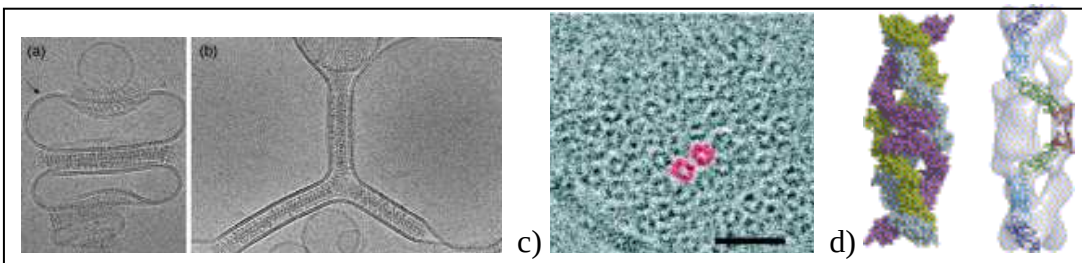


Figure 13 : Arrangement en hexamères des fragments recombinants EC1-4 de la VE-cadhérine. D'après **Lambert, 2005**. (A-C) Images en cryo-électro-microscopie des fragments EC1-4 de la VE-cadhérine dans des membranes liposomiales. (D) modélisation de l'hexamère EC 1-4.

V.1.2.Domaine cytoplasmique de la VE-cadhérine

Cette protéine comporte également un domaine transmembranaire (TM) de 21 acides aminés et un domaine cytoplasmique (162 acides aminés) qui possède la propriété unique de lier à la fois des protéines partenaires des filaments d'actines et des filaments intermédiaires. Ce domaine cytoplasmique comporte également plusieurs sites potentiels de phosphorylation (Ser, Thr, Tyr), pouvant modifier de façon covalente la protéine et sa conformation ainsi que son interaction avec ses partenaires cytoplasmiques (figure 14).

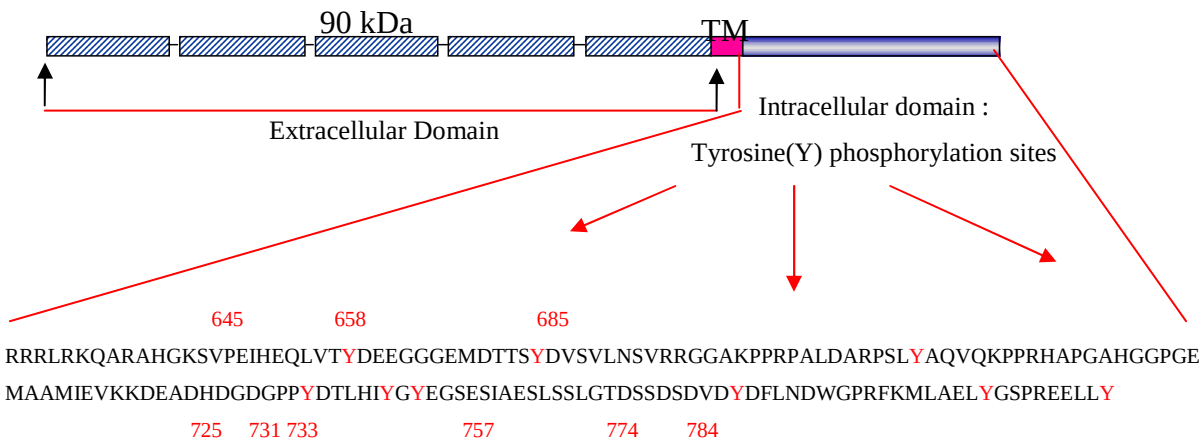


Figure 14 : Structure de la VE-cadhérine

V.2. Fonctions de la VE-cadhérine

La VE-cadhérine intervient à différents niveaux en biologie vasculaire. Les années 1995-99 ont vu la parution de plusieurs publications démontrant les différentes fonctions biologiques de la VE-cadhérine. En 1995, les propriétés adhésives de la VE-cadhérine ont été montrées par transfection de son ADNc et surexpression de la protéine dans des cellules CHOs. Celles-ci acquièrent alors la capacité de former des agrégats **(Breviario, 1995)**. En 1996, la même équipe montre que la VE-cadhérine peut réguler négativement la prolifération cellulaire **(Caveda, 1996)**. En 1998, grâce à l'utilisation d'anticorps anti-VE-cadhérine, qui empêchent l'établissement de liaisons homotypiques, les auteurs ont pu montrer le rôle de la VE-

cadhérine dans la perméabilité endothéliale **(Gulino, 1998)**. En effet, ces anticorps dissocient les jonctions endothéliales et augmentent la perméabilité paracellulaire transendothéliale aux macromolécules. De même, l'injection intraveineuse d'un anticorps anti-VE-cadhérine chez la souris accélère le recrutement des neutrophiles sur les sites d'inflammation démontrant l'augmentation de la perméabilité paracellulaire *in vivo* par blocage des jonctions endothéliales **(Gotsch, 1997)**.

En 1997, Vittet et collaborateurs ont montré l'importance de la VE-cadhérine dans l'angiogenèse par des expériences d'inactivation de son gène dans des cellules souches embryonnaires. En effet, les cellules totalement déficientes pour le gène de la VE-cadhérine ne pouvaient s'organiser en réseau vasculaire **(Vittet, 1997)**. En 1999, L'invalidation génique chez la souris a été réalisée et montre un phénotype létal au stade embryonnaire 9,5 jours de développement. Les analyses des embryons au stade précoce a montré la formation d'un plexus vasculaire primitif, mais une absence de remodelage vasculaire, avec des cellules endothéliales qui tendent à se détacher et des vaisseaux qui collapsent et régressent, **(Gory-Faure, 1999)** (Figure 15).

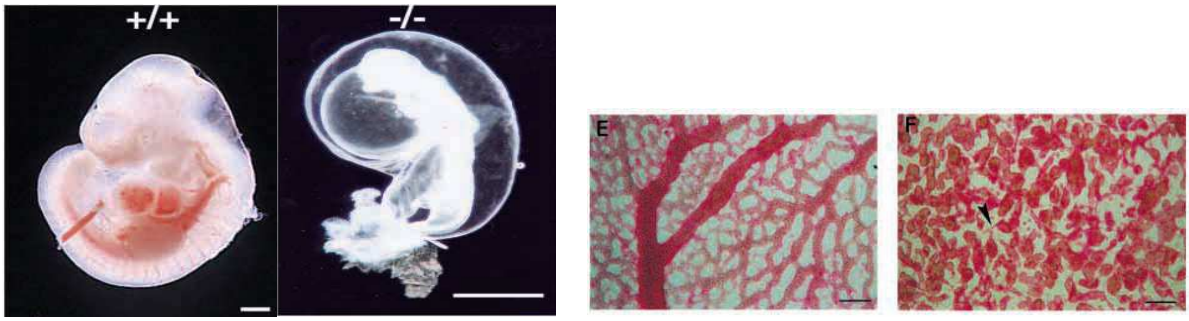


Figure 15 : Embryons de souris VE-cadhérine +/+ et -/-. D'après **Gory-Faure, 1999.** Embryon (au dessus) et réseau vasculaire (E et F).

L'invalidation génique de la VE-cadhérine a donc permis de mettre en évidence son rôle primordial dans la morphogenèse vasculaire et l'intégrité de l'endothélium.

V.3 Régulation des propriétés adhésives de la VE-cadhérine

V.3.1 Régulation par les GTPases

Bien que le mécanisme de régulation de l'assemblage de la jonction adhérente par la VE-cadhérine ne soit pas encore complètement compris, les protéines de liaison avec l'actine et les Rho-GTPases semblent y jouer un rôle fondamental. Dans des cellules non-endothéliales,

la E-cadhérine interagit avec la protéine arp2/3 (Actine-Related Protéine 2/3) qui est associée à la protéine WASP (Wiskott Aldrich Syndrome Protein), à la vinculine et à la cortactine. WASP agit en amont de la RhoGTPase cdc 42. A partir de ces observations, il est clair que l'adhésion induite par les interactions homotypiques de la cadhérine doit activer une signalisation « outside-in » qui résulte de l'augmentation de la polymérisation de l'actine par la voie cdc42-Arp2/3-WASP et donc la stabilisation des jonctions adhérentes. L'expression d'un mutant de la VE-cadhérine délété de son domaine extracellulaire montre l'activation d'une voie de signalisation intracellulaire impliquant cdc42 qui est associé avec la formation de protrusions de la membrane dans les cellules endothéliales transfectées. Ainsi, la VE-cadhérine, en plus de son rôle de médiateur de l'intégrité de l'endothélium par son activité de liaison homotypique, régule la perméabilité endothéliale en modulant l'accrochage et l'hydrolyse du GTP, de cdc42, Rac et RhoA (**Kouklis, 2003, 2004**).

V.3.2 Régulation par les caténines

L'α-caténine est impliquée dans la régulation de l'assemblage des complexes protéiques interagissant avec la E-Cadhérine ; la β-Caténine quant à elle, permet l'ancrage de ce complexe avec le cytosquelette d'Actine.

Des souris transgéniques exprimant la VE-cadhérine délétée des 80 derniers acides aminés de son domaine cytoplasmique (domaine de liaison à la β-caténine) ont un phénotype létal. (**Carmeliet, 1999**).. L'expression d'un mutant auquel il manque le domaine extracellulaire de la VE-cadhérine mais pas le domaine de liaison à la β-caténine montre aussi la dissociation des jonctions endothéliales. De façon surprenante, l'expression de ce mutant bloque aussi la transmigration des neutrophiles en réponse à un stimulus chimio-attractant (**Orringtin-Myers, 2003**). L'inactivation conditionnelle de la β-caténine réduit, de même, l'aptitude des cellules endothéliale à rester jointives (**Cattelino, 2003**). En dehors de son rôle dans l'adhésion des cellules, la β-Caténine intervient également dans le processus de cancérisation. Ainsi, on la trouve complexée aux molécules de la voie Wnt APC (Adenomatous Polyposis Coli), Axine, GSK-3β (Glycogen Synthase Kinase-3β) dans le cytoplasme. Ce complexe permet la phosphorylation de la β- Caténine et sa dégradation par le protéasome. L'interaction β-caténine - VE-cadhérine stabilise donc la jonction qui joue un rôle de senseur dans la transmigration entre autres effets (**Mehta, 2006**). VE-cadhérine et caténine forme donc un tandem majeur pour la bonne cohésion endothéliale.

V.3.3 Régulation par la protéine p120

Bien que l'interaction entre les caténines et les cadhérines soit requise pour maintenir l'intégrité de la jonction, l'arrimage de p120 est sans doute l'élément le plus important de la stabilité de la jonction adhérente.

La fonction de p120 sert à réguler des interactions entre cadhérines, kinases, phosphatases et GTPases, qui au final, contrôle l'état de phosphorylation et la stabilité de l'interaction d'une cadhérine avec une autre, aussi bien qu'avec les caténines.

Contrairement aux autres caténines, p120 ne s'associe pas avec le cytosquelette d'actine (**Reynolds, 2004**). La protéine p120 s'arrime à la VE-cadhérine et régule la contractilité des cellules endothéliales en inhibant l'activité de la GTPase RhoA. Des études ont également montré qu'il y a une corrélation entre le niveau d'expression de p120 et l'activation des protéines de la famille Rho, Rac et cdc42 (**Anastasiadis, 2001**). De cette façon, p120 peut interagir avec les protéines microtubulaires, ce qui pourrait potentiellement être une clé de la régulation de la perméabilité endothéliale *via* les jonctions adhérentes.

p120 a aussi été largement impliquée dans la régulation de l'expression et de l'insertion de la VE-cadhérine dans la membrane plasmique. La p120, accrochée à la VE-cadhérine, est capable de la protéger d'une ubiquitine ligase, *Hakai*, empêchant ainsi sa dégradation (**Vincent, 2004**). De plus, grâce à une interaction avec la Kinesin Heavy Chain qui régule le trafic vésiculaire, p120 pourrait influencer l'expression de la VE-cadhérine en agissant sur son relargage vésiculaire (**Mehta, 2006**).

V.3.4 Régulation par un autre facteur : le calcium

Le calcium joue un rôle important dans la régulation de la liaison homophilique de la VE-cadhérine. La chélation du Ca^{2+} extracellulaire par l'EDTA (Ethylène Diamine Tetra Acétique) augmente la perméabilité des micro-vaisseaux dans le poumon, après l'observation de la perte d'adhésion cellule-cellule. La perméabilité peut être reversée en fournissant de nouveau une quantité de calcium adéquate au milieu des cellules (**Gao, 2000**). L'application d'un anticorps neutralisant la VE-cadhérine augmente cette perméabilité induite par la déplétion en calcium et prévient de la réversion observée.

V.3.5. Régulation de la VE-cadhérine par phosphorylation

- **Etat de l'art**

Depuis 1998, il était connu que les jonctions endothéliales étaient le siège de phosphorylations sur tyrosine en réponse à VEGF et certains agents inflammatoires comme l'histamine et la thrombine (**Rabiet, 1996, Andrioupoulou, 1999**), un processus corrélé avec la dissociation des cellules endothéliales (**Esser, 1998**). Par analogie aux récepteurs de facteurs de croissance, la VE-cadhérine, protéine transmembranaire, peut être phosphorylée dans son domaine cytoplasmique où 9 résidus tyrosine sont des sites potentiels pour des tyrosine kinases, permettant ainsi une interaction avec des protéines à domaines SH2 aux jonctions endothéliales, et un rôle potentiel de cette protéine dans la signalisation endothéliale lié à l'angiogenèse ou la perméabilité. Notre étude sur les mécanismes moléculaires de la phosphorylation de la VE-cadhérine a permis de montrer :

1/ La VE-cadhérine est phosphorylée sur tyrosine *in vivo* au cours de l'angiogenèse physiologique et non dans les tissus quiescents (**Lambeng, 2005**) et dans des cellules en culture soumises à un stimulus inflammatoire: le PAF (Platelet activting factor) (**Hudry-Clergeon, 2005**).

2/ la VE-cadhérine est associée *in vivo* avec des partenaires de la signalisation: association permanente avec la tyrosine kinase Src, association hormono-regulée avec Flk1, le récepteur de VEGF, (**Lambeng, 2005**) et association avec la PI3kinase (**Hudry-Clergeon, 2005**).

3/ la tyrosine 685 est l'unique acide aminé du domaine cytoplasmique de la VE-cadhérine cible de la tyrosine kinase Src de cellules stimulées par VEGF. (**Wallez, 2007**), (Thèse de Yann Wallez présentée en 2007).

- **Sites de phosphorylation de la VE-cadhérine humaine et kinases:**

Le ciblage direct des jonctions endothéliales par Src a été montré au laboratoire. En effet par des essais kinase *in vitro* et des analyses par carte peptidique *in cellulo*, la VE-cadhérine a été identifiée comme substrat de Src en réponse à VEGF et seule une tyrosine de la protéine est phosphorylée (Y685). Cette phosphorylation est un pré-requis à la migration des cellules endothéliales stimulées par VEGF (**Wallez, 2007**). L'identification de ce site a conduit à la production d'un antiphosphosite permettant la mise en évidence de cette forme phosphorylée dans l'angiogenèse ovarienne chez la souris (A Sidibé, Master 2). Une souris « knock-in »

pour la tyrosine Y685 a été produite pour déterminer le rôle de ce site dans les fonctions biologiques de la VE-cadhérine (vasculogenèse et angiogenèse : travail de Thèse de Adama Sidibé 2010).

Plusieurs publications d'autres groupes se sont succédées sur ce thème durant la même période. Le laboratoire de D Vestweber a identifié que la VE-cadhérine phosphorylée sur la Y685 était un partenaire de CSK, tyrosine kinase régulatrice de Src **(Baumeister, 2005)**, permettant de proposer un modèle de rétrocontrôle de la phosphorylation de la VE-cadhérine dans la voie de VEGF : en effet Src, activée par VEGF, phosphoryle la Y685, laquelle devient un interactant pour la tyrosine kinase Csk, régulateur négatif de l'activité de Src. Le laboratoire de D Cheresh a montré, par mutagenèse dirigée, que les Y658 et Y731 étaient impliqués dans l'augmentation de perméabilité endothéliale par modification des interactions de la VE-cadhérine avec les caténines β-caténine et p120 **(Potter, 2005)**. Cependant ces phosphorylations sur les sites Y658 et Y731 n'ont pas été attribuées à une voie de signalisation impliquée dans l'angiogenèse. Les kinases responsables de la phosphorylation de ces sites ne sont pas encore connues. Cette publication a conduit à la production d'anticorps commerciaux (Biosources, San Diego, CA) dirigés contre ces deux phosphosites, qui, utilisés en expériences cellulaires, ont permis de montrer que la phosphorylation sur les tyrosines Y658 et Y731 de la VE-cadhérine était corrélée à une dissociation des jonctions lors de la diapédèse leucocytaire **(Allingham, 2007)**. L'utilisation d'outils pharmacologiques ou d'inhibiteurs de kinases a permis aux auteurs de proposer Src ou Pyk2 dans la phosphorylation de ces sites. Savoir si c'est une voie directe reste à démontrer.

Plus récemment, la phosphorylation sur sérine de la VE-cadhérine en réponse au VEGF a également été documentée. En effet, un site de phosphorylation par PAK (p21 activated kinase), unique et conservé, dans le domaine cytoplasmique de la VE-cadhérine (sérine 665 de la séquence humaine) a été identifié **(Gavard, 2006)**. La construction de mutants ponctuels mimant la phosphorylation (S/D) ou au contraire l'abrogeant (S/V) révèle que l'endocytose de la VE-cadhérine est régulée par le statut de phosphorylation sur ce site. Il a été proposé un modèle dans lequel le VEGF contrôle la voie de signalisation Src/Vav2/Rac/PAK.

Une autre étude a été réalisée sur l'engagement de la molécule ICAM-1 par des lymphocytes activés par un antigène. Dans cette voie, les lymphocytes semblent induire la phosphorylation des sites Y645, 731 et 733 (**Turowski, 2008**).

En pleine expansion, la compréhension des mécanismes de phosphorylation de la VE-cadhérine n'est pas encore complètement élucidée du fait de sa complexité (Figure 16). Ainsi,

le rôle d'une tyrosine kinase différente des candidates précédentes et phosphorylant le site Y658 sera discuté dans le chapitre I.

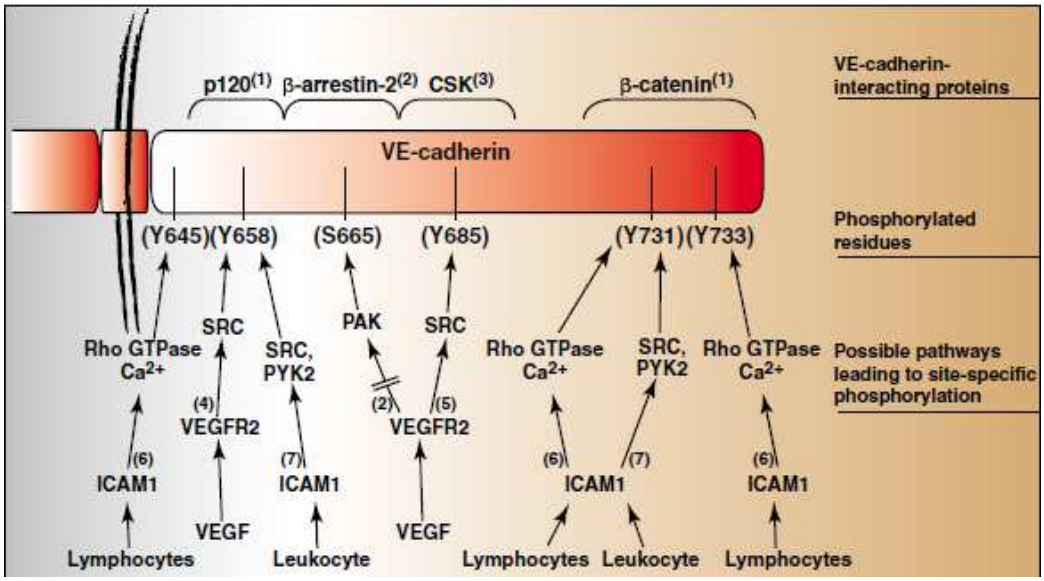


Figure 16 : Les voies de phosphorylations de la VE-cadhérine. D'après **Dejana, 2009**. Sur cette figure sont recensées toutes les phosphorylations de la VE-cadhérine et les acteurs potentiels de ces phosphorylations.

La phosphorylation de la VE-cadhérine peut aussi être régulée par des phosphatases qui peuvent lui être associées. Ainsi, La VE-PTP (Vascular Endothelial- Phosphatase Tyrosine Protein) présente l'intérêt particulier d'être spécifiquement exprimée dans l'endothélium et associée à la VE-cadhérine. Son inactivation génique chez la souris a permis de démontrer un phénotype comparable à celui des embryons déficients pour la VE-cadhérine. Ce qui suggère que les vaisseaux ne peuvent se former correctement si la VE-cadhérine est constamment phosphorylée (**Baumer, 2006**). D'autres phosphatases comme Dep-1 (**Lampugnani, 2003**), PTP-μ (Phosphatase tyrosine Protein μ) **(Sui, 2005)** et SHP2 peuvent s'associer avec la VE-cadhérine et réguler de façon directe ou indirecte la phosphorylation de la VE-cadhérine et donc la perméabilité endothéliale (**Nawroth, 2002**).

V.4. Clivage de la VE-cadhérine

La VE-cadhérine est particulièrement sensible au clivage enzymatique, suggérant que d'autres voies de signalisation peuvent être à l'origine de l'augmentation de la perméabilité endothéliale ou de la diapédèse leucocytaire.

L'exposition de cette protéine à des métalloprotéases comme l'élastase, la cathepsine G ou une concentration minimale de trypsine induit la digestion du domaine extracellulaire de la

VE-cadhérine dans des cellules en culture. (**Herren, 1998, Luplertlop, 2006, Hermant, 2003, Xia, 2003**). Les leucocytes et les cellules tumorales peuvent ainsi sécréter de grandes quantités de ces enzymes, ce qui pourrait induite le clivage de la VE-cadhérine et donc augmenter l'extravasation des leucocytes et induire une fragilité du réseau vasculaire.

Il existe d'autres enzymes susceptibles d'induire la protéolyse de la VE-cadhérine de la famille des métalloprotéases : la métalloprotéase ADAM-10 (A Disintegrin And Metalloprotéase-10). Cette protéase induit le clivage de la VE-cadhérine en plusieurs fragments, *in vitro* au cours du passage de cellules T à travers la monocouche ou par stimulation avec la thrombine (**Schulz, 2008**).

L'endothélium vasculaire étant le premier type cellulaire à être en contact avec des éléments du sang circulant, c'est lui qui va subir des modifications morphologiques au cours de processus tumoraux, ou d'angiogenèse et inflammation. La VE-cadhérine étant exclusivement exprimée dans l'endothélium vasculaire, ses modifications structurales peuvent être considérées comme des biomarqueurs potentiels d'un endothélium agressé ou en remaniement.

VI. LA CELLULE ENDOTHELIALE DANS LE CANCER ET L'INFLAMMATION

Nous abordons ici deux grands processus pathologiques où nous montrons que la cellule endothéliale est fortement sollicitée : l'angiogenèse dans le cancer et les modifications d'intégrité de l'endothélium dans l'inflammation.

VI.I. Le cancer

VI.1.1. Généralités et données épidémiologiques

Le mot cancer est un mot latin, qui signifie crabe ou écrevisse. Tout comme le crabe qui représente plusieurs espèces, le cancer comprend près de deux cents maladies différentes, toutes caractérisées par une croissance incontrôlée de cellules. Ces cellules s'accumulent pour former une tumeur qui envahit et détruit par la suite les tissus normaux avoisinants, d'où la malignité.

En 2007, le cancer reste un enjeu majeur de santé publique. Si les données d'incidence du cancer ne sont pas encore disponibles pour les dernières années, l'analyse des données de 2000 et des tendances associées montre clairement que le cancer reste en France en progression, avec près de 280 000 nouveaux cas par an. Aux États Unis, on estime que 1,4

millions de nouveaux cas de cancers seront diagnostiqués en 2008. Le cancer, première cause de mortalité prématurée, seconde cause de décès tous âges confondus, reste un enjeu de santé publique fort, enjeu humain, social, et même sociétal et économique. Les travaux économiques ont en effet montré le coût important de cette maladie pour le pays, et les associations de malades en ont souligné l'impact humain et social, pour eux-mêmes comme pour leurs proches. En outre, en 2007, pratiquement tous les cancers sont susceptibles de bénéficier d'un traitement. Si l'on ne guérit encore guère plus d'un cancer sur deux chez l'adulte, les avancées médicales issues de la recherche sur le cancer ont été importantes depuis une dizaine d'années. La progression lente, mais réelle, des taux de survie à cinq ans, montre que les efforts dans la recherche et dans la qualité des soins permettent d'améliorer progressivement l'espoir de guérison pour les patients.

VI.1.2 Cancer et vascularisation

Il est maintenant bien établi que le développement d'une vascularisation (angiogenèse) intra ou péritumorale est un événement clé autant pour la croissance d'une tumeur que pour la dissémination métastatique par la voie sanguine (**Folkman, 2002**). Ainsi, des études ont montré que l'angiogenèse est un facteur pronostique dans diverses tumeurs, notamment le cancer du rein, du côlon, du sein, du poumon et du cerveau, ainsi que dans le mélanome. En effet, le taux de récidive des tumeurs fortement vascularisées est plus élevé que celui des tumeurs faiblement vascularisées. Cette révolution présente plusieurs avantages par rapport aux thérapies anticancéreuses classique : spécificité d'action antitumorale, cible plus facilement accessible, risque moins élevé de résistance, efficacité dans le traitement d'association avec des agents anticancéreux classiques, et possibilité de chimioprophylaxie (**Fidler, 2002**).

De plus, avec le développement technologique de l'acquisition d'images, il a été montré que réseau vasculaire normal et tumoral diffèrent. En effet, le **réseau vasculaire normal** se caractérise par sa relative régularité, sa stabilité et son efficacité. La régularité se traduit par une succession régulière de tubes, dont le calibre diminue puis augmente à nouveau en passant du côté artériel vers le côté veineux. À l'inverse, la morphologie des **vaisseaux tumoraux** est hétérogène, leur forme est irrégulière, ils sont dilatés et tortueux, avec des branchements excessifs et des terminaisons aveugles. Le flux sanguin tumoral y est chaotique et variable formant des régions hypoxiques et acides au sein des tumeurs. L'ensemble de ces aspects font que l'on qualifie le réseau vasculaire tumoral d'immature. Des anomalies au niveau ultrastructural ont été observées: présence de nombreuses « ouvertures » (« fenestrae »

endothéliales, vésicules et trous transcellulaires), de larges jonctions inter-endothéliales et une membrane basale discontinue ou absente (Figure 17). Toutes ces anomalies confèrent aux vaisseaux tumoraux une perméabilité accrue. A l'intérieur de chaque tumeur, il existe généralement aussi une certaine hétérogénéité, avec des régions vascularisées de façon inégale, un degré de maturité variable des vaisseaux tumoraux, qui pourrait traduire des différences localement dans la balance de molécules pro- et antiangiogènes, sachant que l'équilibre des signaux et ses répercussions peut aussi se modifier au cours de l'évolution de la tumeur.

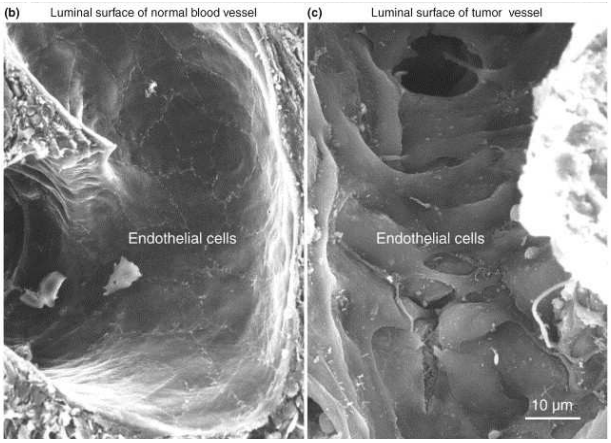


Figure 17 : Image de micrographie électronique de l'intérieur de vaisseaux sanguins normal (gauche) et tumoral (droite). D'après Baluk, 2005.

VI.2 L'inflammation

VI.2.1. Mécanismes généraux

L'inflammation ou réaction inflammatoire est la réponse des tissus vivants, vascularisés, à une agression. Ce processus comprend des phénomènes généraux, exprimés biologiquement par le syndrome inflammatoire et cliniquement de façon variable, le plus souvent par de la fièvre et éventuellement une altération de l'état général et des phénomènes locaux au cours desquels l'inflammation se déroule dans le tissu conjonctif vascularisé. Les tissus dépourvus de vaisseaux (cartilage, cornée) sont incapables de développer une réaction inflammatoire complète. Les tissus épithéliaux n'ont pas de rôle actif dans le déroulement de la réaction inflammatoire, mais ils peuvent être altérés par l'agression qui déclenche l'inflammation puis être réparés au cours de la phase terminale de l'inflammation. L'inflammation est un processus habituellement bénéfique : son but est d'éliminer l'agent pathogène et de réparer les lésions tissulaires. Parfois l'inflammation peut être néfaste du fait de l'agressivité de l'agent pathogène, de sa persistance, du siège de l'inflammation, par anomalies des régulations du

processus inflammatoire, ou par anomalie quantitative ou qualitative des cellules intervenant dans l'inflammation.

Au niveau cellulaire, elle se caractérise par une infiltration leucocytaire. Une inflammation aiguë est caractérisée par l'expression et la sécrétion de médiateurs solubles, telles les cytokines, appelées encore chemokines ou chimiokines. Ces dernières activent l'endothélium, la monocouche de cellules la première en contact du sang, qui exprimera différentes molécules d'adhérence.

L'adhésion des leucocytes sur l'endothélium activé se fait en trois étapes séquentielles. Premièrement les leucocytes sont captés et roulent sur l'endothélium par l'intermédiaire des sélectines (**Vestweber, 1999**). Par la suite, les leucocytes sont activés par les chimioattractants relargués par l'endothélium. Finalement les leucocytes s'arrêtent, adhèrent fortement à l'endothélium et migrent à travers ce dernier. Ce processus de migration fait intervenir les intégrines du leucocyte qui se lient à des membres de la superfamille des immunoglobulines exprimées sur l'endothélium (Figure 18).

L'inflammation fait intervenir des processus complexes qui aboutissent à une augmentation de la perméabilité endothéliale, événement indispensable à la poursuite du processus.

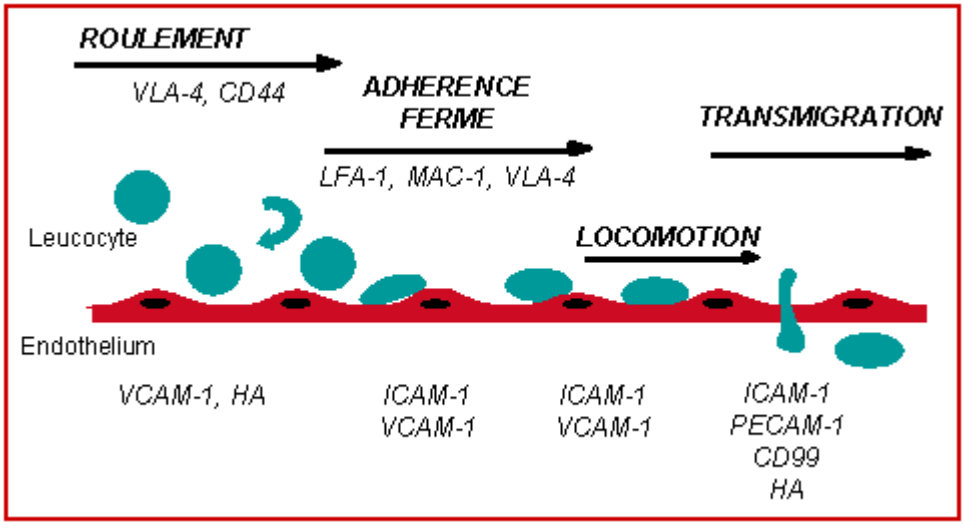


Figure 18 : Étapes essentielles du phénomène inflammatoire vasculaire : roulement, adhésion et transmigration des leucocytes à travers l'endothélium. (D'après http://institut.cochin.inserm.fr/la_recherche/departements/biocihp/copy_of_equipe-couraud/themes-de-recherche/mecanismes-moleculaires-de-linfiltration).

VI.2.2. Pathologies inflammatoires

De nombreuses maladies inflammatoires sont liées à des mécanismes considérés comme dysimmunitaires. Ces affections récemment regroupées sous le terme d'IMID (Immune Mediated Inflammatory Diseases) comprennent trois grandes entités nosologiques : les maladies auto-immunes systémiques (non spécifiques d'organe) et localisées (spécifiques d'organe), les maladies auto-inflammatoires, les affections inflammatoires de mécanisme indéterminé comprenant, notamment, des affections iatrogènes ou paranéoplasiques dont le mécanisme n'est pas auto-immun. Ces maladies inflammatoires étaient définies jusqu'à présent par des critères cliniques et biologiques validés par l'usage et l'avis d'experts. Cependant, leur polymorphisme suggère qu'une même entité puisse être liée à des mécanismes moléculaires différents. À titre d'exemple, la polyarthrite rhumatoïde (PR) est une maladie articulaire parfois extrêmement agressive ou inversement une forme bénigne non destructrice qui touche entre 0.3 et 1.5% de la population globale en France. C'est une maladie « auto-immune » caractérisée par la présence d'anticorps (facteur rhumatoïde) et de complexe immuns tissulaires qui sont fabriqués par le patient. Elle se caractérise par une inflammation de plusieurs articulations avec gonflement articulaire bilatéral et symétrique prédominant sur les mains, les poignets et les pieds.

Les lymphocytes T et autres cellules immunitaires, dont les macrophages, secrètent des cytokines, médiateurs chimiques importants de l'inflammation et de la destruction des articulations. Les cytokines entraînent une prolifération des cellules immunitaires et inflammatoires dans l'articulation et la sécrétion d'autres cytokines et une atteinte de l'os, du cartilage et d'autres tissus connectifs (**Kingsley, 1997**). Parmi les cytokines clés, le TNF-α (Tumoral Necrosis Factor) et différentes interleukines (Interleukine-1, Interleukine-6…) ont été l'objet de toutes les attentions (**Dayer, 2002**). Ainsi, le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), principal médiateur pro-angiogénique, est présent dans le liquide synovial et dans le sérum de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde et son expression est corrélée à la sévérité de la maladie. Le rôle de ce médiateur dans la synovite a en revanche, été largement démontré dans des modèles expérimentaux de polyarthrite rhumatoïde.

Une autre pathologie génétique, l'angioedème (AE) bradykinique repose la dérégulation du système protéasique kallicréine-kinines et peut conduire à un déclenchement soudain de crises d'œdème facial ou laryngé dont la sévérité nécessite la mise en place d'outils de diagnostic précoce. Au plan moléculaire, une cascade d'activation de protéases conduit à la libération de bradykinine qui agit sur les cellules endothéliales par fixation sur son récepteur B2 et

déclenche une modification de la perméabilité endothéliale. Les mécanismes moléculaires mis en jeu sont mal connus.

VI.3. Cancer et inflammation

Les pathologistes ont reconnu, il y a plus d'un siècle, que la plupart des cancers étaient accompagnés de cellules du système immunitaire, des cellules inflammatoires. Cette observation a été signalée pour la première fois en 1863 par Rudolf Virchow, qui nota la présence de leucocytes dans le tissue néoplasique et supposa qu'il existait un lien entre l'inflammation et le cancer (**Nickoloff, 2005, Platz, 2004, Dalgleish, 2006, Hussain, 2007**). Ce sont les macrophages associés aux tumeurs (TAM – Tumor-associated macrophages), les cellules dendritiques associées aux tumeurs (TADC – Tumor-associated dendritic cells) et les lymphocytes associés aux tumeurs (TIL – Tumor-infiltrating lymphocyte), principalement des lymphocytes T. L'ensemble de ces cellules contribuent à la production de cytokines, à la croissance tumorale ainsi qu'à l'immunosuppression associée au cancer. En effet, une tumeur apporte le paradoxe d'une inflammation locale avec un effet anti-inflammatoire systémique (**Balkwill, 2001**).

La source de l'inflammation est souvent d'étiologie inconnue, ce qui amène à la prescription des traitements dont le but est le soulagement de la douleur et la diminution, ou l'arrêt des processus de dommages tissulaires. Le traitement le plus commun est l'utilisation des anti-inflammatoires non-stéroïdiens (AINS). Les AINS incluent une variété de molécules, l'aspirine et les salicylates ainsi que d'autres composés comme l'ibuprofène et le sulindac. Le principal mécanisme d'action est l'inhibition de la biosynthèse des prostaglandines en bloquant l'enzyme cyclo-oxygénase (COX). Selon l'AINS, l'inhibition est réversible ou irréversible et elle affecte l'isoforme I et/ou II de la COX. Les effets non désirés incluent l'ulcération gastrique et des défaillances rénales (**Katzung, 1995**).

Les AINS semblent maintenant impliqués dans la prévention du cancer. En effet, une utilisation prolongée des AINS diminue le risque de cancer colorectal (**Baron, 2000**). Les mécanismes responsables de cet effet protecteur agiraient à plusieurs niveaux. Les AINS auraient un effet directement sur la cellule cancéreuse. La résistance des cellules cancéreuses à la chimiothérapie est en partie due à la résistance à l'induction de l'apoptose. Les AINS auraient un effet indépendant de celui sur la COX sur l'induction de l'apoptose dans la cellule cancéreuse Ainsi, on pourrait imaginer une thérapie combinatoire de la chimiothérapie classique conjuguée aux AINS pour diminuer la croissance tumorale (**Ricchi, 2003**).

Le cancer est aussi associé à un risque thromboembolique élevé, les cellules cancéreuses activant la coagulation pour favoriser leur progression. Les événements thromboemboliques ont un impact négatif sur le pronostic. Le traitement prophylactique apparaît important mais s'avère difficile en raison du taux élevé de complication hémorragique.

La figure ci dessous illustre les differents types de communications entre cellules tumorales, immunitaire et endothéliales ainsi que les nombreux médiateurs impliquées.

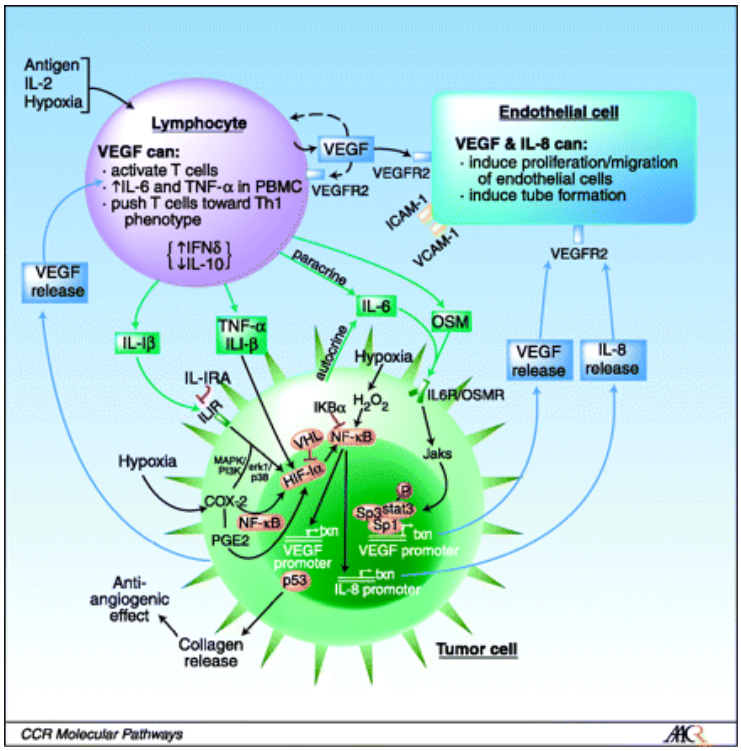


Figure 19: Mécanismes de régulation complexe entre les cellules tumorales et du système immunitaire. (D'après **Angelo, 2007)**. Lien entre le VEGF et les cytokines pro-inflammatoires produites. Illustration de la complexité de la signalisation entre chaque type cellulaire.

VII. LES BIOMARQUEURS

La modification de la cellule endothéliale en physiopathologie nous amène à aborder le monde des biomarqueurs, qui sont des outils importants pour les cliniciens en terme de diagnostique, pronostique ou de suivi thérapeutique.

VII.1. Définitions :

Les biomarqueurs sont définis comme des paramètres mesurables fonctionnels, cellulaires ou moléculaires, indicatifs d'un statut particulier génétique, épigénétique ou fonctionnel, pour un

système biologique. Leur dosage doit être précis, reproductible, fiable, et réalisable par des méthodes peu invasives.

Un biomarqueur possède une valeur :

- pronostique lorsqu'il donne une indication sur le stade d'agressivité de la maladie diagnostiquée, et ce indépendamment d'un quelconque traitement pouvant être mis en place.
- prédictive lorsque sa présence est corrélée avec la réponse clinique à un traitement particulier.

La valeur potentielle des différents biomarqueurs doit être testée et validée par les études cliniques et corrélée avec les valeurs de PFS (progression-free survival) et d'OS (overall survival).

De larges études au cours de ces dix dernières années ont été menées pour essayer d'identifier des biomarqueurs associés au processus d'angiogenèse des tumeurs.

VII.2.Classification des biomarqueurs de l'angiogenèse

VII.2.1. Les biomarqueurs moléculaires

Ils sont indicatifs des évènements moléculaires associés à l'angiogenèse ou à l'activité du médicament. Ils consistent en des molécules telles que le VEGF, le bFGF, les récepteurs de surface cellulaire (VEGFR2, intégrines), les molécules de voie de signalisation (ERK, Akt), et les modifications (activation, phosphorylation), ou transcrits d'un ou de multiples gènes.

VII.2.2. Les Biomarqueurs biologiques

Les cellules associées à l'angiogenèse (i.e. cellules endothéliales circulantes (CEC) et leurs progéniteurs (CECP) peuvent refléter les phénomènes moléculaires observés grâce aux biomarqueurs moléculaires. Un nombre élevé de cellules endothéliales circulantes ou de progéniteurs sont observés dans le sang de patients atteints de cancer (**Bertolini, 2006, Mancuso, 2001**). Leur augmentation corrèle parfaitement avec l'angiogenèse et leur taux diminue chez les patients sous traitement anti-angiogénique (**Shaked, 2005**).

Le VEGF est facilement détecté dans les épanchements pleuraux malins ou ascites, et ses effets sur la perméabilité vasculaire représentent des mécanismes important pour la formation de ces œdèmes malins (**Kraft, 1999**). La présence de grandes quantités de VEGF dans les fluides biologiques (sérum) de patients atteints de cancer a été rapportée pour la première fois en 1994 (**Kondo, 1994**) et a été vérifiée pour plusieurs types de cancers par la suite. Une corrélation étroite entre le taux de VEGF, le stade de la tumeur, la densité microvasculaire et

l'expression du VEGF dans la tumeur a été suggérée, de même qu'une corrélation entre un fort taux de VEGF sérique dans les pathologies disséminées par rapport aux pathologies localisées (**Salven, 1997**). (Tableau 1)

Cancer Type	Correlation With Tumor Progression or Patient Survival*
Breast cancer	Positive
Lung cancer	Positive
	No correlation
Gastrointestinal cancers	
Colorectal carcinoma	Positive
Gastric carcinoma	Positive
Hepatocellular carcinoma	Positive
Urologic cancers	
Prostate carcinoma	Positive
Bladder carcinoma	Positive
Renal cell carcinoma	Positive
	No correlation
Gynecologic cancers	
Ovarian carcinoma	Positive
	No correlation
Vulvar carcinoma	Positive
Head and neck cancers	
Nasopharyngeal carcinoma	Positive
Squamous cell carcinoma	No correlation
Hematological malignancies	
Lymphoma	Positive
Leukemia	Positive
Soft tissue sarcoma	Positive

Abbreviations: S, serum samples used for the assay; P, plasma samples used for the assay.
*Positive correlation indicates more advanced tumor or poorer survival with higher circulating VEGF level.

Tableau 1 : Relation entre le taux de VEGF et la progression tumorale dans différents types de cancers. D'après **Poon, 2001**.

VII.2.3. Les Biomarqueurs fonctionnels

Les mesures des paramètres de perfusion (rBV (relative Blood Volume), MTT (Mean Transit Time), rBF (relative Blood Flow), K^{trans} (évaluation de la perméabilité vasculaire) par imagerie peuvent être plus pertinentes pour la mise en évidence de l'activité anti-vasculaire des médicaments en phase clinique avancée (phase III). La mesure de la densité microvasculaire (MicroVessels Density ou MVD) est réalisée par imagerie *in vivo*. Au niveau des régions de haute activité angiogénique (ou « hot spots »), cette mesure a une valeur seulement pronostique mais non diagnostique dans de nombreux cancers (**Hlatky, 2002**). A titre d'exemple, la MVD de tumeurs primaires chez les patients métastatiques ne peut être suffisante pour la prédiction de la réponse au Bevacizumab® (anti-VEGF**) (Jubb, 2006).**

VII.3. Les cadhérines

VII.3.1. Les cadhérines solubles

Récemment, une étude menée par l'équipe du Dr. DE Wever, sur les cadhérines solubles a montré que leur ectodomaine pouvait être un biomarqueur significatif dans divers cancers. Ces fragments de protéines pourraient avoir une incidence sur les cellules avoisinantes. Ce mécanisme s'appelle le « shedding » de l'ectodomaine, un évènement post-transcriptionnel qui peut changer de façon notoire les propriétés fonctionnelles de la protéine ou de la cellule substrat. En effet, il est connu que les adhésions intercellulaires qui impliquent directement les cadhérines sont modifiées et fragilisées dans les cellules tumorales par rapport aux cellules normales. Ce qui est actuellement décrit pour l'endothélium vasculaire a été montré tout d'abord dans certains épithélia. Lorsque ces barrières de diffusion disparaissent, des cadhérines dites « solubles » sont alors retrouvées dans le sérum des patients.

-La E-cadhérine, cadhérine responsable de l'adhésion entre cellules épithéliales a été retrouvée dans le sérum de patients atteints d'hépatocarcinomes (HCC). Avant cela, elle avait été retrouvée dans le milieu de cultures de cellules, sous la forme de son domaine extracellulaire de 80 kDa (**Damsky, 1983**). Dans le sérum de patients, les différents dosages ELISA ont montré que la E-cadhérine sérique était quantitativement plus élevée que dans le sérum des patients sains et ce, dans le cas de carcinomes gastriques (**Katayama, 1994, Gofuku, 1998, Chan, 2001 (a et b)**), de mélanomes (**Billion, 2006**), de tumeurs pulmonaires (**Charalabopoulos, 2006**). De plus, cette quantité était plus importante pour les patients avec récidive et présentant des métastases extra-hépatiques ou pulmonaires (**Charalabopoulos, 2006**). Très récemment, elle a été impliquée comme marqueur précoce de la sévérité dans la pancréatite aigue (**Sewpaul, 2009**) ou encore de la néphropathie diabétique, cette fois analysée dans les urines des patients par western-blot et ensuite par un test ELISA sur 40 patients (**Jiang, 2009**).

-La N-cadhérine, quant à elle, a été également retrouvée dans le sérum de patients atteints de divers cancer et une corrélation a pu être démontrée entre le taux de N-cadhérine soluble et le taux de PSA (Prosate Specific Antigen) dans les sera de ces patients (**Derycke, 2006**).

VII.3.2. Fonction des cadhérines solubles

En 2006, l'équipe de Derycke a pu mettre en évidence le rôle de la N-cadhérine soluble. En effet, un fragment de N-cadhérine soluble est capable d'induire l'angiogenèse et plus précisément la migration des cellules endothéliales *in vitro* (**Derycke, 2006**). D'autres relatent son action inhibitrice de la migration de cellules tumorales de carcinomes du sein et proposent

des anticorps anti-N-cadhérine pour bloquer la migration de ces cellules et ainsi la formation de métastases (**Potthoff, 2007**).

En résumé, la complexité intrinsèque de l'angiogenèse tumorale et les multiples mécanismes de régulation et d'adaptation de l'angiogenèse durant la thérapie suggèrent que plusieurs biomarqueurs seront nécessaires pour obtenir une représentation compréhensive de l'angiogenèse (**Sessa, 2008**). Par ailleurs, au jour d'aujourd'hui, nombres de marqueurs investigués n'ont pu être validés pour l'utilisation en routine clinique.

Dans l'inflammation, l'endothélium est fortement sollicité et réactif, pourtant peu de molécules le constituant ont été analysés au plan sérique pour leur utilité potentielle de signature d'une modification ou agression endothéliale. Dans le chapitre III , nous discuterons d'un rôle nouveau, pour la VE-cadhérine clivée dans l'évolution de pathologies comme l'inflammation et le cancer.

VIII. OBJECTIFS DU PROJET DE RECHERCHE

Le laboratoire a montré que la VE-cadhérine est phosphorylée sur tyrosine *in vivo* au cours de l'angiogenèse physiologique (**Lambeng, 2005**) et *in vitro* en réponse à un agent inflammatoire: le PAF (**Hudry-Clergeon, 2005**). De plus, *in vivo* la VE-cadhérine est associée de façon permanente avec la tyrosine kinase Src, qui peut phosphoryler la tyrosine 685 du domaine cytoplasmique de la VE-cadhérine in vitro dans des cellules endothéliales humaines stimulées par VEGF (**Wallez, 2007**). La phospho-VE-cadhérine semble être une caractéristique de l'endothélium activé.

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à la VE-cadhérine dans un contexte pathologique. En effet, dans un contexte tumoral, les capillaires néo-formés diffèrent du réseau vasculaire normal par leurs aspects morphologiques, de même que dans l'inflammation où des médiateurs vasodilatateurs induisent une augmentation de la perméabilité. Dans ce contexte, la détection des modifications structurales de la VE-cadhérine et la caractérisation des mécanismes moléculaires impliqués peuvent permettre l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques.

Plu précisément, ce travail a eu pour objectif d'étudier les points suivants:

1/Examiner le statut de phosphorylation sur tyrosine de la VE-cadhérine dans l'inflammation et le cancer et d'identifier les acteurs moléculaires impliqués et les mécanismes potentiels.

2/ Etudier le potentiel d'inhibiteurs de tyrosine kinases pour bloquer cette phosphorylation et envisager le Design de nouveaux inhibiteurs.

3/ Analyser l'intérêt clinico biologique de l'utilisation de la VE-cadhérine comme biomarqueur dans le cancer et l'inflammation.

RESULTATS

CHAPITRE I : EXISTENCE D'UNE PHOPSHORYLATION SUR TYROSINE DE LA VE-CADHERINE DANS L'INFLAMMATION ET LE CANCER: MECANISMES CELLULAIRES ET MOLECULAIRES

I. PHOPSHORYLATION SUR TYROSINE DE LA VE-CADHERINE DANS LE CANCER: MECANISMES CELLULAIRES ET MOLECULAIRES

I. 1. Contexte:

Les fonctions biologiques de la VE-cadhérine ont beaucoup été étudiées chez la souris et en culture cellulaire. Sa régulation par phosphorylation sur tyrosine illustrée en 1999 n'a vu ses mécanismes moléculaires élucidés pour partie que en 2005.

Non encore étudiée dans l'angiogenèse tumorale, nous avons voulu examiner l'existence de cette phopshorylation dans des processus tumoraux afin de savoir si cette VE-cadhérine phosphorylée pouvait etre une cible thérapeutique.

Une premier approche de l'étude a été réalisée sur deux modèles animaux de tumeurs :

1- un modèle de souris transgéniques développant des hépatocarcinomes par expression hépatique d'un transgène résultant d'une fusion entre le promoteur de l'antithrombine et la séquence codante pour l'oncogène T de SV40 développé à l'Institut des vaisseaux et du sang à Paris (G Tobelme, E Dupuis) (Dupuy, 2003).

2- un modèle de tumeurs cérébrales chez le rat où l'imagerie développée dans le groupe de C Rémy (Inserm U836-5, GIN-Grenoble), permet de mesurer la vascularisation in vivo et d'évaluer les paramètres clinico-biologiques de la barrière hémato-encéphalique par IRM .

L'identification des acteurs moléculaires a été réalisée in vitro et en culture cellulaire.

I.2 Article 1

Evidence for *in vivo* VE-cadherin phosphorylation at site Y658 in tumoral angiogenesis: involvment of Syk pathway

Tiphaine Mannic[1,2,3], Adama Sidibé[1,2,3], Carole Le Henaff[5], Séphanie Bouillot[1,2,3], Benjamin Lemasson[3,4,9], Jean-Olivier Contreres[5], Chantal Remy[3,4], Emmanuel Barbier [3,4], Gérard Tobelem[5,6,7,8], Philippe Huber[1,2,3], Evelyne Dupuy [5,6,7,8], Isabelle Vilgrain [1,2,3].

[1]INSERM U882, Vascular Pathophysiology Laboratory 38054 Grenoble, France

[2]CEA, iRTSV, 38054 Grenoble, France.

[3]Joseph Fourier University, Grenoble, France

[4]INSERM, U836, Grenoble Institut des Neurosciences, Grenoble, France

[5] Blood and Vessels Institute ; Paris, France

[6] Inserm U965 Angiogenesis and Translationnal Research Paris, France

[7] Lariboisière Hospital, Paris, France

[8]University Paris7-Denis Diderot,Paris,France

[9]Onco*design* Biotechnology, Dijon, France

Short title: Syk pathway is involved in Y^{658}-VE-cadherin phosphorylation.

Key words: Tyrosine phosphorylation, inflammation, VE-cadherin, tyrosine kinase

Correspondence to:

Isabelle Vilgrain,

INSERM U882

Vascular Pathophysiology Laboratory: Cell-cell interactions, Signaling and Aging.

Institute of Life Sciences Research and Technologies (iRTSV),

CEA Grenoble,

F-38054 Grenoble, France.

ivilgrain@cea.fr

Abstract

Rationale: Increasing evidences suggest that vascular endothelial (VE)-cadherin tyrosine phosphorylation plays an important role in the integrity of endothelial junctions. Objective: Although several tyrosine sites have been mapped *in vitro*, the specific signaling molecules and pathways are not well characterized *in vivo*.

Methods and results: In the current study, we report the presence of a tyrosine phosphorylated form of VE-cadherin at the site Y658 in two animal tumoral models, i) a genetically engineered mouse model of hepatocellular carcinoma (HCC) exhibiting strong vascular remodeling and ii) a rat glioma model with intense vascularization and increased permeability. Furthermore, we show that phosphorylated VE-cadherin was no longer associated to p120-catenin. *In vitro*, tumor necrosis factor (TNF)-α induced in endothelial cells a rapid increase in phosphorylation of VE-cadherin at Y658, an event that was previously correlated with an increase in endothelial monolayer permeability. In addition, we show that the tyrosine kinase Syk was activated in response to TNFα. Biochemical studies revealed that in an *in vitro* kinase assay, Syk could directly phosphorylate a peptide encompassing Y658, GEMDTTSY^{658}DVSV, as well as the recombinant wild type VE-cadherin cytoplasmic domain while the mutated protein Y658F remained unphosphorylated. Moreover, in endothelial cells, knockdown of Syk by siRNA dramatically diminished TNF-α-induced VE-cadherin Y658 phosphorylation and p120 catenin association with VE-cadherin.

Conclusions: Taken together, these observations identify Syk as an important mediator of VE-cadherin Y658 phosphorylation and provide a link between the TNF-α signaling, Syk activation, and the regulation of endothelial adherens junctions in the context of endothelial barrier integrity of pathological vessels.

INTRODUCTION

In normal blood vessels, the integrity of endothelium depends upon a correct organization of adherens junctions, which are ubiquitously distributed along the vascular tree and are expressed in both blood and lymphatic vessels.[1] These structures are formed by transmembrane adhesion proteins of the cadherin family. Endothelial cells express a specific cadherin called vascular endothelial (VE)-cadherin, which is exclusively localized at interendothelial junctions.[1,2] VE-cadherin is a transmembrane, calcium-dependent homophilic adhesion molecule that connects adjacent endothelial cells. A loss of VE-cadherin function results in unstable endothelial junctions and is lethal in embryo at 9.5 days.[3] To maintain endothelial barrier function, VE-cadherin activity is tightly regulated through mechanisms that involve protein phosphorylation and cytoskeletal dynamics. Tyrosine phosphorylation of VE-cadherin and associated catenins was shown to be a characteristic of loosely endothelial monolayers; whereas tyrosine phosphorylation was reduced in confluent cells.[4] VE-cadherin contains 9 tyrosine residues in its cytoplasmic domain, which represent potential phosphorylation sites. Indeed, stimulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) tyrosine kinase receptors has been reported to increase VE-cadherin tyrosine phosphorylation and to reduce VE-cadherin-mediated adhesion[5]. The same effect was observed in cells stimulated by several permeability-increasing agents.[6,7,8] Our recent *in vivo* studies showed that, in adult mice, VE-cadherin tyrosine phosphorylation was weak or undetectable in resting tissues, whereas it was found to be dramatically upregulated in ovaries and uterus under hormonal stimulation.[9] We demonstrated that Src could directly phosphorylate the VE-cadherin cytoplasmic domain *in vitro*. VE-cadherin peptide map analysis from VEGF-stimulated HUVECs and VE-cadherin-CHO cells transfected with active Src revealed that Y^{685} was the unique phosphorylated site.[10] This phosphorylation site was found to be a binding partner for CSK, a negative regulator for Src kinase, that is involved in cell proliferation inhibition.[11] Two other phosphorylation sites were found to have detrimental effects on barrier function, Y658 and Y731, but the tyrosine kinases implicated in the phosphorylation of these latter sites remain to be identified.[12]

VE-cadherin phosphorylation sites have not been identified *in vivo* in inflammation or in tumoral angiogenesis although several *in vitro* studies reported the existence of phospho Y658 or Y731-VE-cadherin in endothelial cells stimulated by inflammatory agents[13,14]. The goal of the present study was to determine the phosphorylation status of VE-cadherin *in vivo* in tumoral tissues and to identify the specific signalling pathways involved in this process.

We demonstrate that, in an hepatocarcinoma mouse model and in a rat xenograft glioma model, VE-cadherin was tyrosine phosphorylated and we identified Y658 as the main phosphorylation site. Furthermore, using the proinflammatory cytokine TNF-α, a potent inducer of endothelial cell permeability could trigger VE-cadherin Y658 phosphorylation. In addition, we demonstrate the direct in endothelial cells, through a Syk signaling pathway. These results point out to a potential role for Syk tyrosine kinase in endothelial junction dysfunction in tumors through VE-cadherin targeting.

MATERIAL AND METHODS

Animals:

Transgenic mouse model of hepatocellular carcinoma (HCC-TG mice). The production of transgenic ASV-B mice, which develop hepatocellular carcinoma, has been previously described.[15] The transgene was integrated on the Y chromosome, so the development of hepatocarcinoma was restricted to male mice, which were backcrossed with C57/BL6 mice at least 10-fold. Three major stages of the temporospatial progression of the HCC-TG mice and angiogenic processes have been previously described: hyperplastic (4–8 weeks), nodular (12 weeks), and diffuse carcinoma (from the 16th week).[15-17]

Intracerebral U-87 MG glioma model. After whole body irradiation, male RH-rnu/run nude rats (Harlan Sprague Dawley, Indianapolis, USA) were inoculated with 5 µl of U-87 MG cell suspension containing 10^5 tumor cells in right striatum.

Animal housing, handling, and all procedures involving mice and rats were performed according to the guidelines governing animal care in France.

Antibodies and reagents : Commercially available antibodies were purchased from the following sources: VE-cadherin goat polyclonal antibody (C19) and mouse monoclonal antibody (clone BV9) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), phosphotyrosine 4G10 mouse monoclonal antibody (Upstate Biotechnology, Waltham, MA), rat monoclonal mouse VE-cadherin 11D4.1 (BD Pharmingen), rabbit polyclonal antibodies VE-cadherin-phospho Y658, Y731 and Y685 (BioSource, CA); Syk mouse monoclonal 4D10 (Millipore, Billerica, MA), rabbit polyclonal Syk-phospho-Y525,526 (Biosource, CA), p120 catenin mouse monoclonal antibody (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ), the horseradish peroxidase-conjugated or cyanin3-conjugated secondary antibodies were from Jackson Laboratories, (Bar Harbor, ME).

Recombinant human Tumor Necrosis Factor (TNF)-α was obtained from (Biosource,CA). Active recombinant tyrosine kinase Syk was purchased from Upstate Cell signalling (Euromedex).

Cell culture*:*

Primary human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were isolated from the umbilical vein as described previously.[20]

Endothelial cells were isolated from normal or HCC mouse livers at 16 week according to Corlu et al.[21] The cells were plated on collagen II coated plates and grown in EBM-2 medium (EC basal medium-2, Clonetics Corp. San Diego, CA) supplemented with 20% FCS.

Syk- small interfering RNA (siRNA) transfection in HUVECs: HUVECs were cultured in M199-20 % FCS. Before transfection, culture medium was replaced by M199-5% FCS without antibiotic for 8 hours. HUVECs *(2 x 10^6 cells)* were transfected using the Amaxa Nucleofector system, according to the manufacturer's instructions, using 50 nM control *SMART* pool siRNA (UGGUUUACAUGUCGACUAA, UGGUUUACAUGUUGUGUGA, UGGUUUACAUGUUUUCUGA, UGGUUUACAUGUUUUCCUA) or Syk SMART pool siRNA (AGAAAUGUGUUGCUAGUUA, CGGAAUGCAUCAACUACUA, GAGCAAAUUGUCCUGAUAG, GCUGCGCAAUUACUACUAU) plus 3µL/mL Dharmafect 2 (Perbio Sciences, Brebières, France) for 48 hours. The cells were then plated in normal culture conditions and used at 36–48 h post-transfection.

Site-directed mutagenesis of VE-cadherin cytoplasmic domain: The DNA sequence coding for the wild type VE-cadherin cytoplasmic domain (missing the first nine amino acids) was inserted into pQE30 (Qiagen, France) as described in.[10] providing a N-terminal His tag. A Y658F mutation was introduced in the cDNA with the QuickChange kit (Stratagene) using a sense primer, 5'-ggacaccaccagcttcgatgttgtcggtgc-3', and antisense primer, 5'-gcaccgacacatcgaagctggtggtgtcc-3', according to the manufacturer's protocol. Mutation was checked by sequencing (Genome Express, Meylan, France). The wild type and mutated proteins were produced in BL21 bacteria (Stratagene) and purified by chromatography on Ni beads.

In vitro kinase assay: Methodology for in vitro kinase assay has been described previously.[10] the synthetic peptide GEMDTTSY^{658}DVSNLNSVRRG (obtained from Eurogentec, Liège, Belgium) was used in this study.

Immunofluorescence, Immunoprecipitation, SDS-PAGE, and Western blot analysis were performed as described previously.[9]

Data analysis: Each experiment was performed at least three times under identical or similar conditions with comparable results.

Abbreviations:

The abbreviations used are: Gd-DOTA: gadolinium- tetraazacyclododecanetetraacetic acid, LSGS: low serum growth supplement, MRI Magnetic Resonance Imaging, PBS, phosphate-

buffered saline; pTyr:Phosphotyrosine; SDS/ PAGE, Sodium dodecyl sulfate,polyacrylamide gel electrophoresis, VE-cadherin; vascular endothelial cadherin

RESULTS

VE-cadherin is phosphorylated on tyrosine 658 in hepatocarcinoma.

To further extend our previous study on VE-cadherin tyrosine phosphorylation in angiogenic tissues and to determine whether this process was implicated in tumoral angiogenesis, we sought to focus on tumoral angiogenesis and vascular remodeling in animal models. We first used transgenic mice developing a hepatocarcinoma (HCC) in a multistep angiogenic and tumor propgression This model was characterized by a strong remodeling of the tumor sinusoids accompanying the HCC progression.

VE-cadherin expression was assessed by immunostaining on liver frozen sections. The vascular network was positively labeled with VE-cadherin antibody, and, consistent with previous observations[15], blood vessels exhibited enlarged, fused and anarchic sinusoids compared to their normal counterparts at 16-weeks (Figure 1A) as previously described[15]. To obtain a preliminary assessment of VE-cadherin tyrosine phosphorylation in HCC, the protein was immunoprecipitated from early stage and diffuse carcinoma tissue, and analyzed by westernblotting. Lysates from the diffuse stage (16-weeks) exhibited a much higher level of phospho-VE-cadherin when compared to the early hyperplastic stage (8-weeks) (Figure 1B). We then used VE-cadherin phosphosites antibodies to identify the phosphorylated tyrosines. Our data revealed remarkably that VE-cadherin was phosphorylated on Y658 and not Y685 or Y731 (Figure 1C). In addition, the level of VE-cadherin phosphorylation at Y658 dramatically increased with tumor progression.

To confirm these data, we next sought to analyze VE-cadherin in normal liver or HCC-derived endothelial cells. The cells were isolated and purified from mouse HCC tissue and grown for 4 days (Figure 1D, upper panel). The HCC-derived endothelial cells expressed VE-cadherin at cell-cell junctions as shown by immunofluorescence labeling typical for adherens junctions, distributed mainly at the periphery of the cells (Figure 1D, lower panel). Analysis of tyrosine phosphorylation of endothelial cells membrane-associated proteins revealed a dramatic increase in the phosphotyrosine signal, especially for one band of high molecular weight (125 kDa) when compared to their normal counterparts (Figure 1E, left panel) Western blots confirmed that HCC-derived endothelial cells and normal liver derived cells expressed VE-cadherin at the expected molecular weight (125 kDa protein). Interestingly, VE-cadherin phosphosite analysis revealed the presence of pY658-VE-cadherin in HCC-derived endothelial cells but not in normal liver-derived cells, while protein extracts

contained similar levels of VE-cadherin. These data demonstrate that Y658 is prominently phosphorylated in HCC tumors-derived endothelial cells, whose phosphorylation status is correlated with hepatocarcinoma progression and reorganization of the vascular network.

VE-cadherin phosphorylation in rat glioma xenografts

We next assessed the VE-cadherin phosphorylation status in an orthotopic rat model characterized by development of aggressive and locally invasive glioblastomas that phenocopy the major characteristics of human glioblastomas.[18,19] These tumors are highly vascular with leaky blood brain barrier as assessed by dynamic contrast enhanced MRI[18,19]. The tumors were localized by MRI (on post-contrast T_1 images) and dissected (T) and the contralateral part of the brain was used as control tissue (NB) (Figure 2A). As shown by VE-cadherin immunostaining, tumors exhibited higher vascular density and larger vessels compared to normal brain, consistent with hypervascularization of the tumor (Figure 2B). The analysis of total tyrosine-phosphorylated proteins in both tissues showed that normal brain exhibited a few phospho-proteins while in the tumoral brain tyrosine phosphorylated proteins were highly detectable ranging from 150 to 37 kDa (Figure 2C). Western blots of immunoprecipitated VE-cadherin showed that tumoral brains exhibited a higher amount of phospho-VE-cadherin, as compared to control tissue (Figure 2D). Using phosphosite antibodies, VE-cadherin was found to be phosphorylated mainly on Y658 and to a lesser extent on Y731 and Y685 (Figure 2E).

TNF-α induces VE-cadherin phosphorylation at the site Y658

TNF-α is a known, potent inducer of permeability in microvasculature, reported to be expressed in several tumoral cells including in HCC derived cell line[23,24] and also released by tumor-associated macrophages.[25]

Thus, we sought to determine the mechanisms involved in VE-cadherin tyrosine phosphorylation in vitro using TNF on endothelial cells (HUVECs). . Increasing concentration of TNF-α (from 10 to 100 ng/mL) induced a dose-dependent phosphorylation of VE-cadherin within 15 min while the level of expression of the protein remained unchanged during this treatment time (Figure 3A). Western blots of whole TNF-α-treated cell lysates with phosphosite antibodies showed that Y658 was the only residue whose phosphorylation level increased in a TNF-α concentration-dependent manner (Figure 3B). These features suggest that VE-cadherin Y658 is a major target in TNF-α activated-

endothelial cells phosphorylation and might be of crucial importance in TNF-α induced-inflammation processes.

Y658 phosphorylation is known to prevent p120-catenin association with VE-cadherin.[12] To further determine the consequence of TNF-α-induced phosphorylation at the site Y658, we next sought to examine the association of VE-cadherin with p120-catenin in TNF-α-activated endothelial cells. We found that, under control conditions VE-cadherin and p120-catenin co-immunoprecipitate. However, upon treatment with TNF, the association of th etwo proteins is largely impaired (Figure 3C).

We next investigated VE-cadherin/p120-catenin association in tumors, focusing on the HCC model. VE-cadherin/p120-catenin association was detected in tumor tissues at the early hyperplastic stage (8 weeks), while p120 catenin was no longer associated with VE-cadherin from the nodular stage (12 week), a time point that coincides with macrophage invasion and the beginning of tumor sinusoid remodeling, till the diffuse stage (16 weeks) (Figure 3D). Both *in vitro* and *in vivo* data on VE-cadherin-p120-catenin association were in agreement with VE-cadherin phosphorylation on Y658. The fact that TNF-α induced VE-cadherin Y658 phosphorylation in endothelial cells and that this phosphosite was detected in tumors, indicates that TNF-α plays a role in tumor endothelial cell activation *in vivo*.

TNF-α induces VE-cadherin Y658 phosphorylation in a Syk-dependent manner

To further extent the study, we sought to identify the potential tyrosine kinase involved in VE-cadherin phosphorylation at site Y658. Because the tyrosine kinase Syk, an important immunoregulatory protein, has been shown to play a major role in endothelial cells in a Syk-/- mouse study[26,27], we sought to determine if Syk was involved in VE cadherin phosphorylation on Y658.

We first evaluated Syk activity upon TNF-α challenge in HUVECs. Using pY525-Syk antibody targeting the active autophosphorylation site, one immunoreactive band was detected corresponding to the expected molecular mass of Syk (72 kDa), which intensity was increased in a TNF-α dose-dependent manner (Figure 4A), suggesting that Syk was activated in the TNF-α pathway in endothelial cells.

To examine the role of Syk kinase in TNF-α-induced-VE-cadherin phosphorylation, we generated a siRNA Syk to knockdown Syk activity in HUVECs. The transfected cells were then submitted to TNF-α challenge. The VE-cadherin level was not significantly different in siRNA Syk cells when compared to control cells, while the level of Syk expression was abrogated. In the same time, TNF-α-induced VE-cadherin Y658

phosphorylation was abolished in siRNA Syk treated cells (Figure 4B). Together, these observations indicate that VE-cadherin is significantly phosphorylated at the site Y658 in response to TNF-α-treatment in HUVECs in a Syk-dependent pathway.

To confirm these results, we designed an *in vitro* kinase assay using the commercially available active Syk and the recombinant VE-cadherin cytoplasmic domain, either wild type (CD-VE-cad^{WT}) or site-directed mutated on Y658 (Y658F) (CD-VE-cad^{Y658F}) produced in the laboratory. A kinetic study in the presence of CD-VE-cad^{WT} or CD-VE-cad^{Y658F} showed a Syk-mediated time-dependent phosphorylation of the VE-cadherin cytoplasmic domain at the residue Y658 as detected with the pY658-VE-cadherin antibody (Figure 4C). In contrast, when incubated with the CD-VE-cad^{Y658F}, Syk did not phosphorylate the point-mutated protein, which confirmed the data obtained with the phosphosite antibody (Figure 4D). As a control, we observed that the mutation Y658F did not impair the tyrosine phosphorylation of the domain by purified active Src kinase as shown by a kinetic kinase assay and the detection of the Y685 site antibody (Figure 4E). Finally, we confirmed that the site Y658 was a target for Syk *in vitro*, using an *in vitro* kinase assay with the peptide encompassing the unique site Y658, and γ^{32}P-ATP which showed a time and dose-dependent phosphorylation of the peptide (Figure 4F). Altogether, our results show that Syk directly phosphorylates the VE-cadherin cytoplasmic domain on Y658 *in vitro*, and is required for VE-cadherin phosphorylation on Y658 in TNF-□-induced endothelial cells. We conclude that Syk is responsible for direct phosphorylation of VE-cadherin on Y658 in TNF-α-activated cells.

DISCUSSION

VE-cadherin-mediated endothelial cell-cell junctions play a critical role in maintaining endothelial cell barrier function, accordingly, the breakdown of the endothelial cell barrier leads to vascular permeability and remodeling, which are associated with a number of disease processes including cancer, inflammation, and ischemic injury.[29,30] Over the last ten years, the importance of the processes of tyrosine phosphorylation of adherens junctions proteins have emerged leading to the concept that the quiescent endothelium exhibits lower tyrosine phosphorylated proteins as compared to activated endothelium in inflammation or angiogenesis.[1] More recently, several tyrosine sites in VE-cadherin cytoplasmic domain have been identified in cell culture upon treatment with several mediators involved in angiogenesis or inflammation.[1,5,9]

Our previous observation that VE-cadherin was tyrosine phosphorylated in mouse ovary and uterus during hormonally induced angiogenesis, prompted us to search for its status in tumor mouse models previously documented for their strong vascular remodeling and increased permeability[15,18]. We examined the HCC model which displays marked tumoral angiogenesis, mainly characterized by a strong remodeling of the tumor sinusoids, and a GBM model with increased permeability. We demonstrate for the first time that in the two tumor models used in this study, VE-cadherin was mainly phosphorylated at site Y658, an event that may be related to modifications in cell-cell junctions in tumor vessels.[28] Interestingly in HCC, VE-cadherin was phosphorylated from the nodular stage characterized by a strong macrophage invasion and the beginning of the sinusoids remodeling[15]. These results are in agreement with our previous data showing that VE-cadherin was not phosphorylated in quiescent adult mouse tissues but only in angiogenic ovaries and uterus upon hormonal stimulation.[9] It may be suggested that the phosphorylation status of VE-cadherin in tumors might represent a signature of activated endothelial cells and might promote, in part, the tumor vascular remodeling.

Our *in vivo* data showed that the predominant site of phosphorylation of VE-cadherin in tumors was the tyrosine Y658. The phosphorylation of this site has been originally studied *in vitro* using a phosphomimetic tyrosine-to-glutamic acid mutation, which induced an increase in monolayer permeability. Furthermore, Y658 phosphorylation was demonstrated to be a regulator of p120-binding to VE-cadherin, whose association is critical for VE-cadherin junctional activity.[12,13] Our *in vivo* observations that VE-cadherin was phosphorylated on Y658 and was no longer a binding partner for p120 strongly suggest that the observed

increased vascular hyperpermeability of tumoral blood vessels might be a consequence of tyrosine phosphorylation of VE-cadherin at site Y658. These *in vivo* results highlight the importance of phosphoY658 in the regulation of VE-cadherin function.

Interestingly, we found only one VE-cadherin phosphosite in these tumors while both Y658 and Y731 VE-cadherin phosphosites have been observed *in vitro* in response to several effectors including ICAM-1 engagement, and Cilengitide, an angiogenesis inhibitor.[13,14] It is likely that the kinase responsible for the phosphorylation of Y658 be different from the kinase responsible for the phopshorylation of Y731, even though the identity of the latter kinase is not yet documented. Indeed, among the nine tyrosine phosphorylation sites in VE-cadherin cytoplamic domain, the Y658 and Y731 have been shown to play a role in permeability by site directed mutagenesis, but were not attributed to a specific signaling pathway. The use of inhibitors and phospho VE-cadherin antibodies are indirect methods to identify the tyrosine kinase responsible for specific VE-cadherin phosphorylation sites. A pharmacological study using both Src and Pyk2 inhibitors suggested that these two tyrosine kinases were the actors leading to Y658 and Y731 phosphorylations.[13] Conversely, in pulmonary endothelial cells, the tyrosine kinase fyn was suggested to be involved in TNF-α-mediated VE-cadherin phosphorylation. These studies suggest that the relationship between tyrosine kinase signaling and cadherin function is not yet well understood and is likely to be complex.

We demonstrated that TNF-α participate in the mechanism regulating VE-cadherin tyrosine phosphorylation which is consistent with several reports showing that TNF-α̃mediated paracellular movement of macromolecules is dependent upon VE-cadherin phosphorylation processes.[31,32] Although TNF-α̃ has been shown to activate several protein-tyrosine kinases, c-Src[33-35], p53/p56 lyn[36], PyK2[37,38], and Etk/Bmx[39], here we demonstrated that the protein-tyrosine kinase Syk, is activated by TNF-α. These results are consistent with previous reports showing that Syk was involved in TNF-α signaling.[31] Because Y658 is also phosphorylated in tumors, we suspect that TNF-α is a potential mediator of endothelial activation and hyperpermeability in tumor vessels by triggering a signaling pathway implicating Syk. Using kinase assays and VE-cadherin Y658F point mutation, we demonstrated a direct phosphorylation of VE-cadherin by Syk *in vitro* as well as the silencing of this phosphorylation by Syk siRNA knockdown *in cellulo*. This direct relationship between Syk and the major endothelial cell-cell adhesion molecule indicates the involvement of Syk in cell-cell adhesion. Indeed, Syk-deficient ($Syk^{-/-}$) mice showed a lethal phenotype associated with severe petechiae, diffuse hemorrhage, and morphologic abnormalities were revealed by electron microscopy. [26,40] Interestingly, a recent study performed on breast cancer cells

(MCF7 cells), showed that Syk localized at MCF7 cell–cell junctions and induced E-cadherin tyrosine phosphorylation *in cellulo*.[41] Even though the tyrosine site is not already mapped in E-cadherin, altogether, these findings support the idea that Syk is a key player in adhesion processes in cancer and inflammation and might represent a therapeutic target.

Several clinical studies are on the way using an inhibitor of Syk which has been shown active in a variety of *in vitro* and *in vivo* models.[42-44] For instance, a significant clinical benefits at 12 weeks in a population of patients with active rhumatoid arthritis receiving methotrexate therapy has been described.[44] Because vascular normalization of blood vessels, has emerged as a strategy to treat cancer[46], the Syk–mediated VE-cadherin phosphorylation might be one important step to target in order to strengthen the cohesion of endothelial cells together and to optimize the blood flow for chemotherapy delivery.

AKNOWLEDGMENTS

This work was supported by INSERM (U-882) and Commissariat à l'Energie Atomique, Direction des Sciences du Vivant/iRTSV, Association pour la Recherche contre le Cancer, Ligue Nationale contre le Cancer, and Institut National du Cancer.

We aknowledge Anne Corlu, Inserm 522, Rennes for advise in preparing liver cells

T. M. was a recipient of a grant from Arthritis Courtin Foundation

REFERENCES

1. Wallez Y, Huber P. Endothelial adherens and tight junctions in vascular homeostasis, inflammation and angiogenesis.Biochim Biophys Acta. 2008 Mar;1778(3):794-809.

2-Vestweber D. VE-Cadherin. The Major Endothelial Adhesion Molecule Controlling Cellular Junctions and Blood Vessel Formation. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2008 ;28(2):223-32.

3 Gory S, Vernet M, Laurent M, Dejana E, Dalmon J, Huber P. The vascular endothelial-cadherin promoter directs endothelial-specific expression in transgenic mice. Blood. 1999 Jan 1;93(1):184-92.

4. Wallez Y, Vilgrain I, Huber P. Angiogenesis: the VE-cadherin switch. Trends Cardiovasc Med. 2006 ;16(2):55-9.

5. Esser S, Lampugnani MG, Corada M, Dejana E, Risau W Vascular endothelial growth factor induces VE-cadherin tyrosine phosphorylation in endothelial cells. J Cell Sci. 1998 Jul;111 (Pt 13):1853-65.

6- Andriopoulou P, Navarro P, Zanetti A, Lampugnani MG, Dejana E. Histamine induces tyrosine phosphorylation of endothelial cell-to-cell adherens junctions. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1999 Oct;19(10):2286-97.

7-Rabiet MJ, Plantier JL, Rival Y, Genoux Y, Lampugnani MG, Dejana E. Thrombin-induced increase in endothelial permeability is associated with changes in cell-to-cell junction organization. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1996 Mar;16(3):488-96.

8-Hudry-Clergeon H, Stengel D, Ninio E, Vilgrain I. Platelet-activating factor increases VE-cadherin tyrosine phosphorylation in mouse endothelial cells and its association with the PtdIns3'-kinase. FASEB J. 2005, 19(6):512-20.

9-Lambeng N, Wallez Y, Rampon C, Cand F, Christé G, Gulino-Debrac D, Vilgrain I, Huber P. Vascular endothelial-cadherin tyrosine phosphorylation in angiogenic and quiescent adult tissues. Circ Res. 2005 ;96(3):384-91

10. Wallez Y, Cand F, Cruzalegui F, Wernstedt C, Souchelnytskyi S, Vilgrain I, Huber P. Src kinase phosphorylates vascular endothelial-cadherin in response to vascular endothelial growth factor: identification of tyrosine 685 as the unique target site. Oncogene. 2007, 26(7):1067-77.

11. Baumeister U, Funke R, Ebnet K, Vorschmitt H, Koch S, Vestweber D.Association of Csk to VE-cadherin and inhibition of cell proliferation. EMBO J. 2005;24(9):1686-95.

12. Potter MD, Barbero S, Cheresh DA. Tyrosine phosphorylation of VE-cadherin prevents binding of p120- and beta-catenin and maintains the cellular mesenchymal state. J Biol Chem. 2005;280(36):31906-12.

13. Chiasson CM, Wittich KB, Vincent PA, Faundez V, Kowalczyk AP. p120-catenin inhibits VE-cadherin internalization through a Rho-independent mechanism. Mol Biol Cell. 2009 Apr;20(7):1970-80.

13. Allingham MJ, van Buul JD, Burridge K. ICAM-1-mediated, Src- and Pyk2-dependent vascular endothelial cadherin tyrosine phosphorylation is required for leukocyte transendothelial migration. J Immunol. 2007 ;179(6):4053-64.

14 Alghisi GC, Ponsonnet L, Rüegg C.The integrin antagonist cilengitide activates alphaVbeta3, disrupts VE-cadherin localization at cell junctions and enhances permeability in endothelial cells. PLoS One. 2009;4(2):4449.

15- Dupuy E, Hainaud P, Villemain A, Bodevin-Phèdre E, Brouland JP, Briand P, Tobelem G. Tumoral angiogenesis and tissue factor expression during hepatocellular carcinoma progression in a transgenic mouse model. J Hepatol. 2003 ;38(6):793-802.

16. Hainaud P, Contrerès JO, Villemain A, Liu LX, Plouët J, Tobelem G, Dupuy E.The role of the vascular endothelial growth factor-Delta-like 4 ligand/Notch4-ephrin B2 cascade in tumor vessel remodeling and endothelial cell functions. Cancer Res. 2006 ;66(17):8501-10.

17. Bonnin P, Villemain A, Vincent F, Debbabi H, Silvestre JS, Contreres JO, Levy BI, Tobelem G, Dupuy E. Ultrasonic assessment of hepatic blood flow as a marker of mouse hepatocarcinoma. Ultrasound Med Biol. 2007;33(4):561-70.

18. Marianela Candolfi, James F Curtin, W. Stephen Nichols, Akm G Muhammad, Gwendalyn D King, G. Elizabeth Pluhar, Elizabeth A McNiel, John R Ohlfest, Andrew B Freese, Peter F Moore, Jonathan Lerner, Pedro R Lowenstein, and Maria G Castro. Intracranial glioblastoma models in preclinical neuro-oncology: neuropathological characterization and tumor progression. J Neurooncol, 85(2):133–148, Nov 2007.

19.Csanad G Varallyay, Leslie L Muldoon, Seymur Gahramanov, Yingjen J Wu, James A Goodman, Xin Li, Martin M Pike, and Edward A Neuwelt. Dynamic mri using iron oxide nanoparticles to assess early vascular effects of antiangiogenic versus corticosteroid treatment in a glioma model. J Cereb Blood Flow Metab, 29(4):853–860,

20. Garnier-Raveaud S, Usson Y, Cand F, Robert-Nicoud M, Verdetti J, Faury G. Identification of membrane calcium channels essential for cytoplasmic and nuclear calcium elevations induced by vascular endothelial growth factor in human endothelial cells. Growth Factors. 2001;19(1):35-48.

21. Corlu A, Ilyin G, Cariou S, Lamy I, Loyer P, Guguen-Guillouzo C. The coculture: a system for studying the regulation of liver differentiation/proliferation activity and its control. Cell Biol Toxicol. 1997;13(4-5):235-42.

22. Kato K, Takada T, Fukusato T. Expression of vascular endothelial-cadherin in human hepatocellular carcinoma tissues. Hepatol Res. 2007;37(6):444-53.

23. Balkwill F. Tumor necrosis factor and cancer Nat Rev Cancer. 2009 May;9(5):361-71.

24. R Romieu, V Lacabanne, M Kayibanda, B Antoine, M Bennoun, S Chouaib, JG Guillet and M Viguier Critical stages of tumor growth regulation in transgenic mice harboring a hepatocellular carcinoma revealed by distinct patterns of tumor necrosis factor-alpha and transforming growth factor-beta mRNA production International Immunology, 1997 Vol 9, 1405-1413,

25. Siveen KS, Kuttan G. Role of macrophages in tumour progression. Immunol Lett. 2009;123(2):97-102

26. Yanagi S, Inatome R, Ding J, Kitaguchi H, Tybulewicz VL, Yamamura H. Syk expression in endothelial cells and their morphologic defects in embryonic Syk-deficient mice. Blood. 2001 Nov 1;98(9):2869-71.

27. Inatome R, Yanagi S, Takano T, Yamamura H. A critical role for Syk in endothelial cell proliferation and migration. Biochem Biophys Res Commun. 2001;286(1):195-9.

28. Baluk P, Hashizume H, McDonald DM. Cellular abnormalities of blood vessels as targets in cancer. Curr Opin Genet Dev. 2005;15(1):102-11

29. Carmeliet P, Collen D. Molecular basis of angiogenesis. Role of VEGF and VE-cadherin. Ann N Y Acad Sci. 2000;902:249-62

30. Dejana E, Tournier-Lasserve E, Weinstein BM. The control of vascular integrity by endothelial cell junctions: molecular basis and pathological implications. Dev Cell. 2009;16(2):209-21.

31. Angelini DJ, Hyun SW, Grigoryev DN, Garg P, Gong P, Singh IS, Passaniti A, Hasday JD, Goldblum SE. 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. 2006;291(6):L1232-45.

32. Alcaide P, Newton G, Auerbach S, Sehrawat S, Mayadas TN, Golan DE, Yacono P, Vincent P, Kowalczyk A, Luscinskas FW. p120-Catenin regulates leukocyte transmigration through an effect on VE-cadherin phosphorylation. Blood. 2008 Oct 1;112(7):2770-9.

33. Abu-Amer, Y., F. P. Ross, K. P. McHugh, A. Livolsi, J. F. Peyron, S. L. Teitelbaum. 1998. Tumor necrosis factor- activation of nuclear transcription factor-B in marrow macrophages is mediated by c-Src tyrosine phosphorylation of IB. *J. Biol. Chem. 273*:*29417*

34. Huang, W. C., J. J. Chen, C. C. Chen. 2003. c-Src-dependent tyrosine phosphorylation of IKK is involved in tumor necrosis factor--induced intercellular adhesion molecule-1 expression. *J. Biol. Chem. 278*:*9944*.

35. Huang, W. C., J. J. Chen, H. Inoue, C. C. Chen. 2003. Tyrosine phosphorylation of I-B kinase by protein kinase C-dependent c-Src activation is involved in TNF--induced cyclooxygenase-2 expression. *J. Immunol. 170*:*4767*.

36. Yan, S. R., M. J. Novak. 1999. Src-family kinase-p53/Lyn p56 plays an important role in TNF-α-stimulated production of O_2^- by human neutrophils adherent to fibrinogen. *Inflammation 23*:*167*

37. Fuortes, M., M. Melchior, H. Han, G. J. Lyon, C. Nathan. 1999. Role of the tyrosine kinase pyk2 in the integrin-dependent activation of human neutrophils by TNF. *J. Clin. Invest. 104*:*327*.

38. Han, H., M. Fuortes, C. Nathan. 2003. Critical role of the carboxyl terminus of proline-rich tyrosine kinase (Pyk2) in the activation of human neutrophils by tumor necrosis factor: separation of signals for the respiratory burst and degranulation. J. Exp. Med. 197:63

39. Pan, S., P. An, R. Zhang, X. He, G. Yin, W. Min. 2002. Etk/Bmx as a tumor necrosis factor receptor type 2-specific kinase: role in endothelial cell migration and angiogenesis. *Mol. Cell. Biol. 22*:*7512*

40. Yanagi S, Kurosaki T, Yamamura H The structure and function of nonreceptor tyrosine kinase p72syk expressed in hematopoietic cells. Cell Signal. 1995 Mar;7(3):185-93

41. Larive RM, Urbach S, Poncet J, Jouin P, Mascré G, Sahuquet A, Mangeat PH, Coopman PJ, Bettache N. Phosphoproteomic analysis of Syk kinase signaling in human cancer cells reveals its role in cell-cell adhesion. Oncogene. 2009 Jun 18;28(24):2337-47.

42. Buchner M, Fuchs S, Prinz G, Pfeifer D, Bartholomé K, Burger M, Chevalier N, Vallat L, Timmer J, Gribben JG, Jumaa H, Veelken H, Dierks C, Zirlik K. Spleen tyrosine kinase is

overexpressed and represents a potential therapeutic target in chronic lymphocytic leukemia. Cancer Res. 2009 ;69(13):5424-32

43. Weinblatt ME, Kavanaugh A, Burgos-Vargas R, Dikranian AH, Medrano-Ramirez G, Morales-Torres JL, Murphy FT, Musser TK, Straniero N, Vicente-Gonzales AV, Grossbard E. Treatment of rheumatoid arthritis with a Syk kinase inhibitor: a twelve-week, randomized, placebo-controlled trial. Arthritis Rheum. 2008 ;58(11):3309-18.

44. Podolanczuk A, Lazarus AH, Crow AR, Grossbard E, Bussel JB. Of mice and men: an open-label pilot study for treatment of immune thrombocytopenic purpura by an inhibitor of Syk. Blood. 2009 Apr 2;113(14):3154-60.

45.Ruzza P, Biondi B, Calderan A. Therapeutic prospect of Syk inhibitors. Expert Opin Ther Pat. 2009

46. Jain RK. Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. Science. 2005 ;307(5706):58-62.

LEGENDS FOR FIGURES

Figure 1: VE-cadherin in mouse liver hepatocellular carcinoma.

A. VE-cadherin immunostaining in normal and 16 weeks (wk)-aged transgenic mouse livers. Scale bar: 150 µm. The sinusoidal network is dramatically remodeled in the tumor. **B.** VE-cadherin phosphorylation was evaluated by immunoprecipitation from HCC tissue lysates (stages 8 and 16 weeks) and westernblotting using phosphotyrosine (pTyr) antibody and reprobed with VE-cadherin (VE-cad) antibody. **C.** Western blot analysis of hepatocarcinoma tissue lysates (stages 8, 12, 16 weeks) using pY685, pY658, pY731-VE-cadherin and VE-cadherin antibodies. **D.** Upper panel: phase contrast microscopy of liver HCC-derived endothelial cells obtained as described in Materials and Methods. Scale bar: 300 µm. Lower panel: VE-cadherin immunostaining of liver-derived endothelial cells. Scale bar: 50 µm. **E**. Protein extracts from normal (N) or transgenic (HCC) liver-derived endothelial cells were analyzed by SDS-PAGE and Western blotting using the pTyr(left), pY685-VE-cadherin and VE-cadherin (right) antibodies.

Figure 2: VE-cadherin in xenografted human glioma in rat

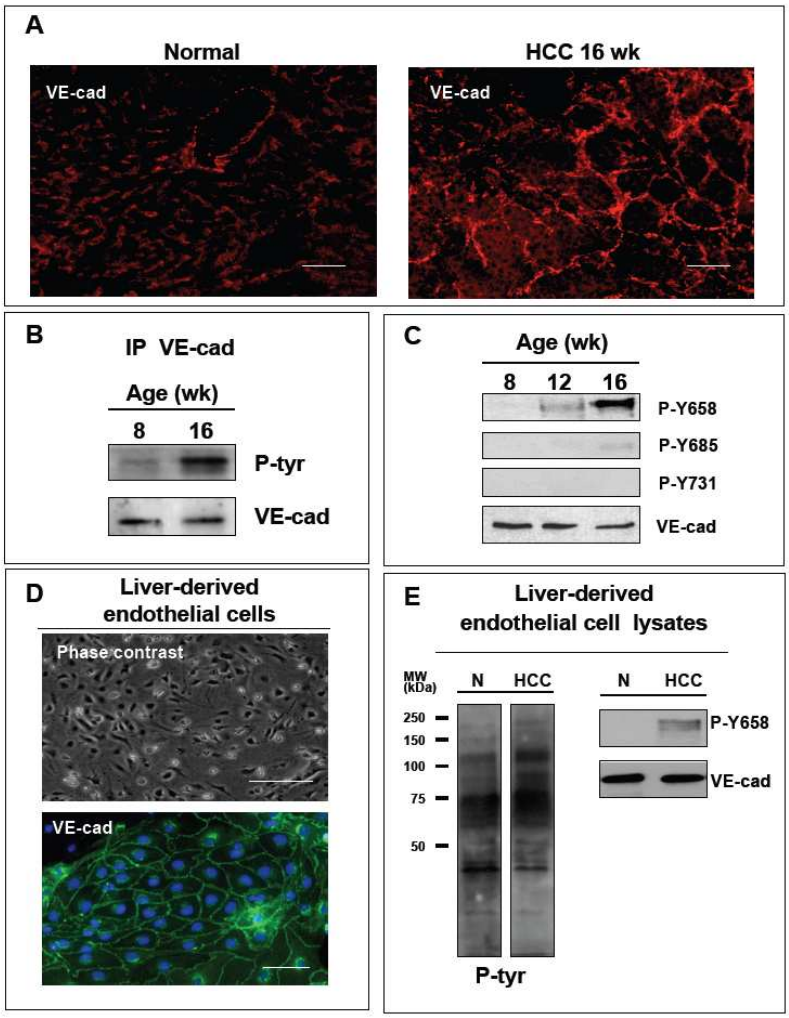
A. Post Gd-DOTA T_1magnetic resonance image of rat brain (NB: Normal brain, T: Tumor) **B.** VE-cadherin immunostaining of rat brain frozen sections. Scale bars: 200 µm. **C**. Tyrosine phosphorylated proteins from normal and tumoral brain were analyzed by SDS-PAGE and western-blotting using pTyr antibody. Molecular weight marker scale is on the left. **D**.VE-cadherin was immunoprecipitated from tissue lysates and subjected to SDS- (PAGE) and western blot with pTyr and VE-cadherin antibodies. **E**. Cell lysates were analyzed by SDS-PAGE and western blotting with the pY685, pY658 and pY731-VE-cadherin antibodies and reprobed with VE-cadherin antibody.

Figure 3: VE-cadherin phosphorylation on Y658 in TNF-α-treated HUVECs:

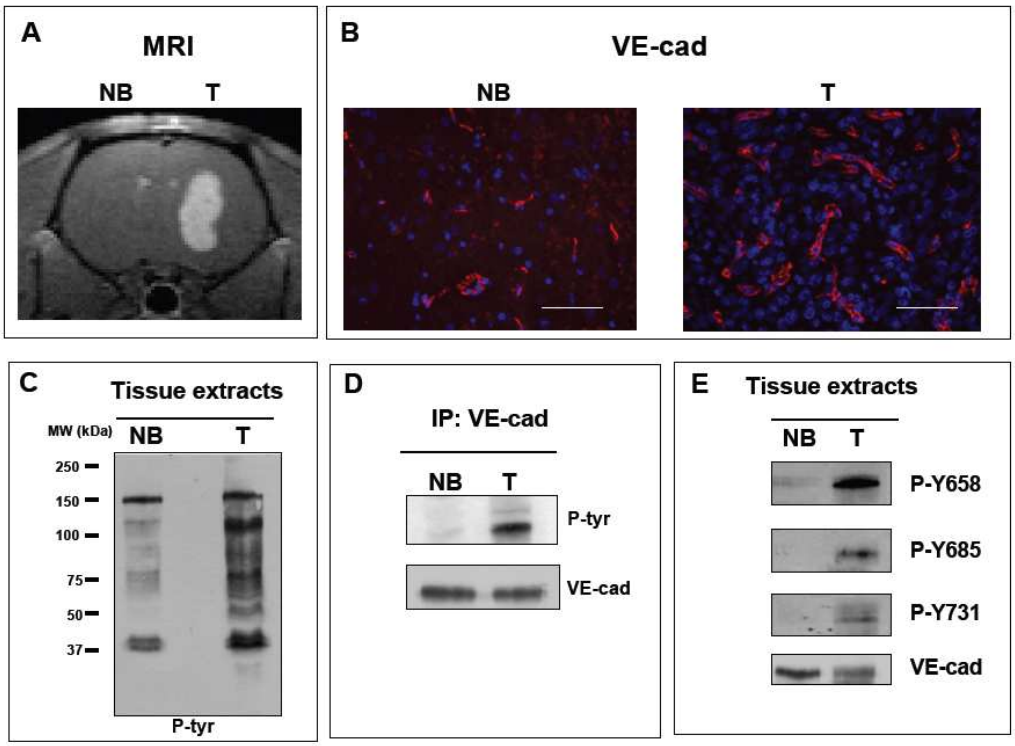
A. Confluent HUVECs were serum starved for 12 hours before stimulation with increasing concentrations of TNF-α (10 to 100 ng/ml). Immunoprecipitation of VE-cadherin was performed from cell lysates and analyzed by SDS-PAGE and westernblotting using ptyr and VE-cadherin antibodies. **B**. VE-cadherin phospho-site analysis: cell lysates from TNF-α-treated cells (0 to 50 ng/ml) were analyzed by SDS-PAGE and western blotting with the pY685, pY658 and pY731-VE-cadherin antibodies. **C**,**D: V**E-cadherin coimmunoprecipitation with p120-catenin was immunoprecipitated and subjected to SDS–polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE).

Figure 4: TNF-α induces VE-cadherin phosphorylation in HUVECs in a Syk-dependent manner

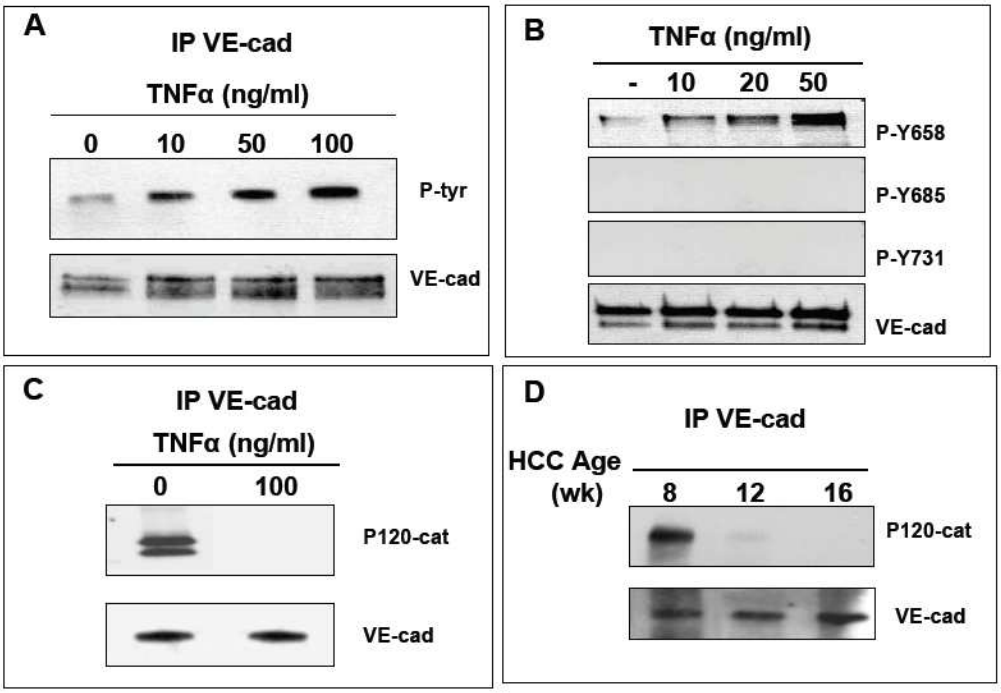
A. Confluent HUVECs, were serum starved for 12 hours before stimulation with increasing concentrations of TNF-α. Total cell lysates (20 µg) were analyzed by SDS-PAGE and western blotting using pY^{525}Syk antibody as well as β-tubulin antibody for loading control. **B**. HUVECs were transfected with either control siRNA (CTL siRNA) or Syk siRNA (Syk siRNA) as described in Materials and Methods, and were treated with TNF-α 100 ng/ml (+TNF) or PBS (-TNF). The cell lysates were subjected to SDS-PAGE and Western blot analysis with antibodies directed against indicated proteins. Western blot of cell lysates revealed that expression of VE-cadherin and β-actin were not affected by transfection of control or Syk siRNAs. Transfection with Syk siRNA knocked down Syk expression as expected. **C**. Recombinant VE-cadherin cytoplasmic domain (CD-VE-cad^{wt}) was incubated at 37°C for 0 to 20 min with $2x10^{-2}$ unit of active Syk. Reaction products were separated by SDS–PAGE and analyzed Western blotting with the indicated antibodies. Coomassie staining was used as loading control. **D** Similar experiment using the mutated VE-cadherin cytoplasmic domain (CD-VE-cadY658F). **E**. Similar experiment using CD-VE-cadY658F as substrate and Srk kinase instead of Syk. **F**. *In vitro* phosphorylation of the synthetic peptide MDTTSY^{658}DVSN by Syk kinase. Upper panel: increasing amounts of peptide were incubated at 37°C for 20 min in the presence of Syk kinase and [γ-^{32}P]ATP. Bottom panel: 20 µg of peptide were incubated for 0 to 20 min in presence of Syk kinase ($2x10^{-2}$ unit) and [γ-^{32}P]ATP. The reaction products were analyzed by SDS–PAGE and the radioactive peptides were visualized by autoradiography.



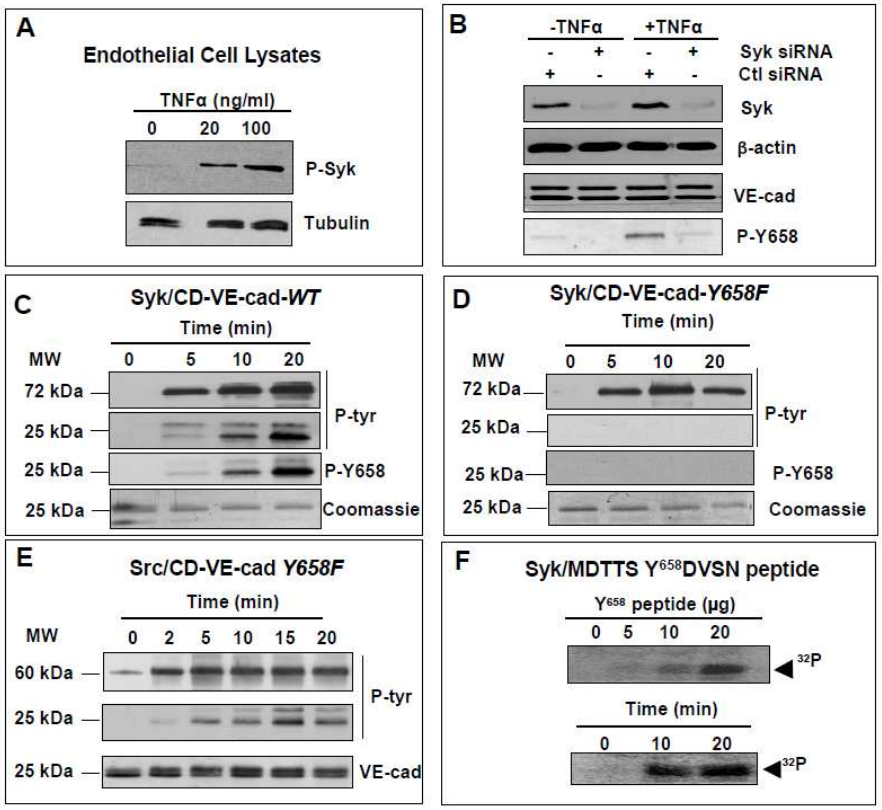
Mannic et al. Figure 1



Mannic et al . Figure 2



Mannic et al. Figure 3



Mannic et al. Figure 4

I.3 Discussion : Phosphorylation sur tyrosine dans le réseau vasculaire tumoral

- **Etude dans les hépatocarcinomes:**

De façon intéressante, nous montrons dans cette étude l'existence d'une forme phosphorylée de la VE-cadhérine dans les tumeurs de foies des souris adultes. Dans ce modèle, tous les animaux transgéniques développent une progression tumorale parfaitement reproductible selon la séquence suivante : hyperplasie cellulaire hépatocytaire précoce jusqu'à la 8e semaine de vie, nodules dysplasiques de la 8e à la 12e semaine, hépatocarcinome diffus à partir de la 12e semaine désorganisant totalement l'architecture hépatique. L'hyperangiogenèse objectivée par plusieurs marqueurs endothéliaux précède le développement de l'hépatocarcinome. L'analyse de la vascularisation de tissus hépatiques murins réalisée par immunofluorescence avec un anticorps anti-VE-cadhérine montre un remodelage du système vasculaire hépatique. Dans ce modèle, de nombreux acteurs de l'angiogenèse ont été identifiés , d'une part, le VEGF qui a un rôle crucial au cours de l'angiogenèse (**Ferrara, 1998**), mais aussi d'autres molécules telles que les éphrines, et le système delta-notch (**Dupuy, 2006**)
Outre, la stimulation de cellules endothéliales par ces agents de l'angiogenèse, l'activation entre l'endothélium par les macrophages et les cytokines inflammatoires n'est pas à exclure.. Cependant, malgré la présence de tous ces stimulis, un seul site de phosphorylation de la VE-cadhérine a été détecté , la tyrosine Y658, rendant le processus complexe a expliquer au plan tissulaire. La mise enjeu de kinases mais aussi de phosphatases peut conduire à un équilibre dont la résultante est la seule détection du site Y658.

- **Etude dans les tumeurs cérébrales chez le rat:**

Ces tumeurs implantées chez le rat présentent des anomalies de la barrière neuromeningée visibles et mesurables en IRM (collaboration avec C Remy à Grenoble à l'Institut des Neurosciences), de même que des modifications de perméabilité. Dans ce modèle de tumeurs cérébrales, il s'est avèré que la VE-cadherine est phosphorylée sur tyrosine, ce qui n'est pas le cas dans le tissu sain et qui confirme nos données antérieures montrant que la VE-cadhérine n'est pas phosphorylée dans les tissus adultes où l'endothélium est quiescent (**Lambeng, 2005**).

Le site majoritaire de phosphorylation identifié dans la VE-cadhérine est aussi la tyrosine 658, même si les facteurs médiateurs impliqués dans ce modèle tumoral ne sont pas identiques à ceux trouvés dans HCC. Dans les tumeurs cérébrales, l'expression de VEGF, FGF, angiopoietine a largement été documentée. Les paramètres de mesure de volume sanguin, de flux et de perméabilité réalisés dans l'équipe de C Rémy, identifie une masse tumorale richement vascularisée et perméable au Gadolinium, molécule utilisée pour les IRM. Ces modifications de perméabilité in vivo sont à mettre en relation avec l'interaction VE-cadhérine-p120 qui est modifiée suite à la phosphorylation sur le site Y658, et pointent en avant l'importance de ce site pour le contrôle de l'homéostasie vasculaire.

Cette interaction avec p120 est un mécanisme primordial pour le maintien de la jonction adhérente composée de VE-cadhérine. La protéine p120 a longtemps été considérée comme un senseur de la VE-cadhérine dans les cellules endothéliales mais aussi de la E-cadhérine dans les cellules épithéliales (**Iyer, 2004, Reynolds, 2004**). En 2005, l'équipe de Xiao a pu mettre en évidence le rôle de la protéine p120 dans l'internalisation de la VE-cadhérine dépendante de la clathrine. En effet, en fusionnant le domaine cytoplasmique de la VE-cadhérine avec le récepteur de l'IL2 (InterLeukine 2), l'internalisation de la protéine augmente de façon accrue et colocalise avec l'internalisation de la VE-cadhérine endogène.. Par la suite, ils ont réalisé des essais d'internalisation avec cette chimère ainsi que des tests de biotynilation qui ont conduit à la conclusion que la p120 inhibe l'internalisation de la VE-cadhérine dépendante de la clathrine de façon très spécifique (**Xao, 2005**). Cette approche montre encore l'importance du domaine intracellulaire de la VE-cadhérine, capable de provoquer l'internalisation dépendante de la clathrine mais aussi de cibler ensuite les compartiments intracellulaires correspondants.

Toujours concernant le domaine cytoplasmique de la VE-cadherine, c'est par mutagenèse dirigée qu'a été montrée l'importance des sites Y658 et Y731 dans la liaison de la VE-cadhérine à ses partenaires cytoplasmiques. Ainsi, lorsqu'elle sont phopshorylées, les tyrosines Y658 et Y731 ne se lient plus à p120 et la β-caténine respectivement. Très récemment, c'est l'étude de la transmigration des leucocytes qui a permis de mettre en évidence un rôle majeur de la protéine p120 et du site phosphorylé Y658 de la VE-cadhérine (**Alcaide, 2008**). Ces différentes études corroborent nos observations de la phosphorylation du site Y658 corrélée avec une dissociation de la protéine p120-caténine et une désorganisation du réseau vasculaire.

- **Implication du TNF alpha et rôle de la tyrosine kinase Syk**

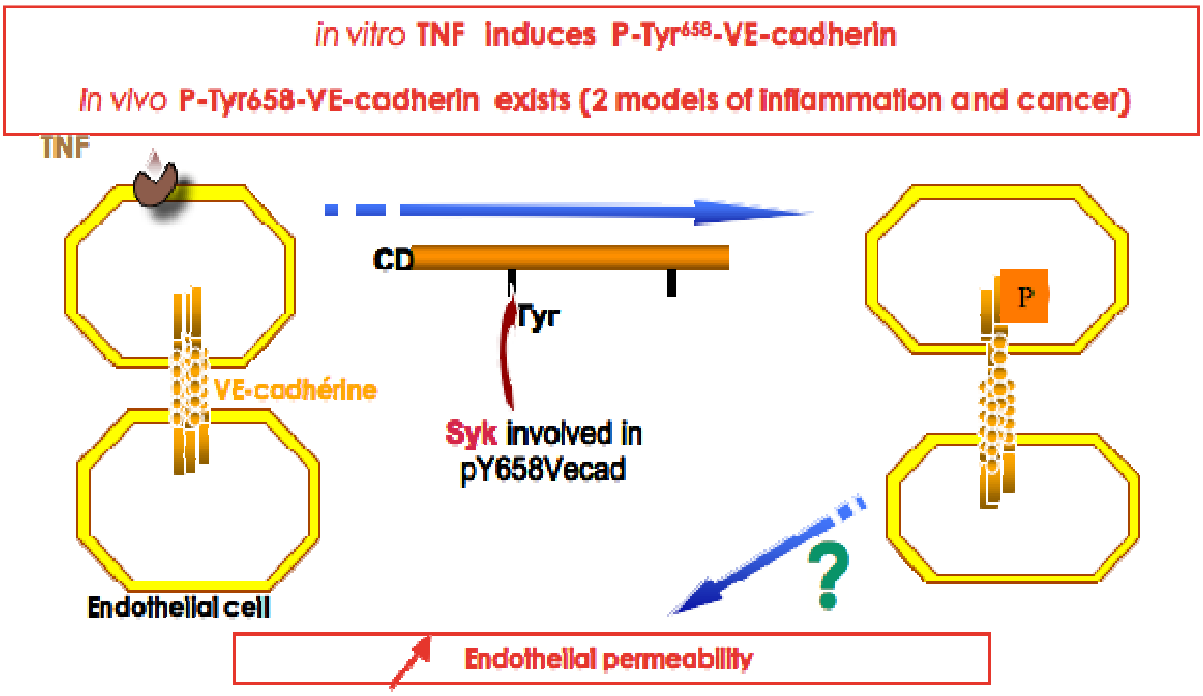
L'étude de mécanismes moléculaires de la phosphorylation du site Y658 ont été réalisés en culture cellulaire avec le TNFα, cytokine pro-inflammatoire largement impliquée dans les mécanismes communs à l'inflammation et au cancer ainsi que dans les mécanismes de transmigration leucocytaire et de perméabilité endothéliale (cf & II.2 introduction). Cette cytokine utilisée sur des cellules endothéliales en culture a permis de mettre en évidence la phosphorylation du site 658 de la VE-cadhérine, en corrélation avec une augmentation de la perméabilité endothéliale. L'existence de la phosphorylation sur tyrosine de la VE-cadhérine en réponse au TNF a été démontrée en 2002 (**Nwariaku, 2002**), mais les sites n'étaient pas identifiés. Depuis la production et la commercialisation des anticorps antiphospho-sites, ces outils ont permis l'identification du site Y658 en réponse au TNF. Cependant, ces outils ne permettent l'identification des kinases impliquées. Une tyrosine kinase a particulièrement attiré notre attention dans cette étude, c'est la tyrosine kinase Syk dont l'invalidation génique a montré une létalité embryonnaire avec des défauts vasculaires et des hémorragies, illustrant un rôle majeur de cette kinase dans l'homéostasie vasculaire. Nous avons pu montrer qu'elle est responsable de la phosphorylation sur la Y658 de la VE-cadhérine, notamment par des expériences de SiRNA et de mutation ponctuelle du domaine cytoplasmique de la VE-cadherine.

Le rôle et la signalisation induite par Syk sont moins bien connus dans les cellules endothéliales. Son rôle est d'ailleurs controversé et semble différent en fonction du tissu incriminé. Par exemple, au niveau des cellules épithéliales tumorales mammaires, Syk est décrit comme un régulateur négatif de la progression tumorale (**Coopman, 2006**), alors que dans les cellules hématopoïétiques et plus particulièrement les neutrophiles, elle a un rôle activateur et est nécessaire à l'adhésion du neutrophile sur les cellules endothéliales (**Kasper, 2006**). Dans les cellules endothéliales, il a été montré que Syk est nécessaire à la migration et la prolifération. En effet, l'utilisation d'un dominant négatif de Syk empêche la migration et la prolifération des cellules endothéliales (**Inatome, 2001**). De plus, Syk peut être activée par la protéine kinase C-δ en réponse à un agent inflammatoire, la thrombine (**Bijli, 2008**). Très récemment il a été montré que la production via le TNFα d'une interleukine importante liée à l'agressivité de la Polyarthrite Rhumatoïde, l'IL 32, nécessite l'activation de Syk, et, ultérieurement, de la voie PKC δ/ Jun dans les fibroblastes synoviaux (**Mun, 2009**). Même si les voies de signalisation liées à l'activation de Syk sont loin d'êtres éclaircis, l'activation de

Syk par la protéine Kinase C δ en réponse à l'histamine a été montrée. Il en est peut être de même dans les cellules endothéliales stimulées par le TNF-α .

L'exemple de la tyrosine kinase Syk est fort intéressant, en effet, des traitements à base de molécules qui visent à inhiber son action (Fostamatinib®) ont été montrés efficaces dans la Polyarthrite Rhumatoïde et les allergies, c'est-à-dire des suractivations de voies de signalisation de l'inflammation (**Weinblatt, 2008, Masuda, 2008, Lee, 2008).**

Ces résultats conduisent à un modèle possible de dissociation endothéliale en réponse au TNF-α qui établit un lien certain entre les mécanismes de perméabilité endothéliale liés à l'inflammation résiduelle observée au sein du réseau endothélial tumoral.



Schématisation du mécanisme de phosphorylation de la VE-cadhérine sur le site Y658.

II. PHOSPHORYLATION SUR TYROSINE DE LA VE-CADHERINE DANS L'INFLAMMATION:

II. 1 Contexte:

La réaction inflammatoire est naturelle et très utile à l'organisme. Elle accompagne la réaction immunitaire, la rend plus spécifique et contribue à l'élimination de l'agent pathogène et à la réparation des tissus lésés en favorisant le renouvellement cellulaire. Cette réaction est strictement contrôlée par de nombreuses protéines de l'inflammation. Les médiateurs circulants qui sont actifs à la suite d'une cascade de réactions peuvent agir directement sur l'endothelium vasculaire par l'intermédiaire de récepteurs membranaires spécifiques.

Nous avons réalisé une étude dans le contexte des angioedèmes (AE) bradykiniques où la dé-régulation du système protéasique kallicréine-kinines conduit à un déclenchement soudain de crises d'œdème facial ou laryngé dont la sévérité nécessite la mise en place d'outils de diagnostic précoce. Au plan moléculaire, une cascade d'activation de protéases conduit à la libération de bradykinine qui agit sur les cellules endothéliales par fixation sur son récepteur B2 et déclenche une modification de la perméabilité endothéliale. Les mécanismes moléculaires mis en jeu sont mal connus. Le but de cette étude a été de mieux comprendre l'impact des effecteurs impliqués dans l'angioedème (kallicréine-kinines) sur l'endothélium et de determiner si au plan moléculaire, la VE-cadhérine pouvait etre modifiée et présenter un intérêt en tant que marqueur de sévérité de la maladie.

II.2 Article 2

Hereditary angioedema: Key role for kallikrein and bradykinin in VE-cadherin cleavage and oedema formation.

Laurence Bouillet MD, PhD [a,b,c,d], Tiphaine Mannic,PhD [a,b,c], MélanieArboleas [a,b,c], Mariela Subileau [a,b,c] , Christian Massot MD [d], Christian Drouet PhD [c,e,f], Denise Ponard, PharmD [g] Philippe Huber, PhD [a,b,c],Isabelle Vilgrain PhD [a,b,c]

[a]INSERM, U882, Vascular Pathophysiology Laboratory: Cell-cell interactions, Signaling and Aging , F-38054 Grenoble, France.

[b]CEA, Institute of Life Sciences Research and Technologies (iRTSV), F-38054 Grenoble, France.

[c]Joseph Fourier University, F-38054 Grenoble, France.

[d] Internal Medicine Department, Reference Center for Angioedema, Grenoble University Hospital, France

[e] GREPI/TIMC CNRS UMR 5525

[f] Angioedema laboratory, Reference center for angioedema, Grenoble University Hospital, France

[g] Immunology laboratory, Grenoble University Hospital, France

Corresponding author

Laurence Bouillet, MD, PhD,

iRTSV-APV

Inserm U 882

CEA-Grenoble,

17 rue des Martyrs,

38 054 Grenoble cedex 9

Telephone: (33)438786783

Fax (33) 438 78 49 64

E-mail: lbouillet@chu-grenoble.fr

Declaration of all sources of funding: Laurence Bouillet has received research support from the Marcel Simon fellowship, from the French National Society of Internal Medicine (SNFMI) and JERINI pharmaceutical, Invalidenstrasse 130, D-10115 Berlin/Germany. Tiphaine Mannic has received grant support from the Courtin Arthritis Foundation. Philippe Huber has fundings from CEA and INSERM, Isabelle Vilgrain has funding from CNRS

Word count: 1050

Capsule Summary

In Hereditary angioedema (HAE), because of C1-inhibitor deficiency, plasma kallikrein and bradykinin are released during attacks leading to the emergence of a truncated human VE-cadherin moiety in patients' serum. This is a potential biomarker of an HAE attack.

Key words

Hereditary angioedema, vascular permeability, oedema, bradykinin, kallikrein, VE-cadherin

To the Editor:

Hereditary angioedema (HAE) is characterized by recurrent episodes of edema that can be life-threatening if not treated properly [1,2]. It is an autosomal dominant inherited disease, caused by C1 Inhibitor (C1Inh) deficiency due to mutations in the *SERPING1* gene. C1Inh, is the major serine protease inhibitor (SERPIN), whose main function is the control of activation of the contact phase, fibrinolysis, complement and coagulation [3]. Because of C1Inh deficiency in HAE, the plasma proteolytic cascades are activated during an attack (plasma kallikrein (KK) and coagulation factor XIIa) and several vasoactive substances are generated. Among these, bradykinin (BK), has been shown to be the predominant mediator of enhanced vascular permeability in HAE attacks acting through ~~upon~~ binding to its cognate receptors on endothelial cells [3,4].

Microvascular permeability is tightly controlled by a series of complex interactions between junctional proteins that contribute to the maintenance of apical-basal polarity, as noted by Prado et al [5]. Changes in endothelial barrier function accompany most of the inflammatory conditions that are associated with many systemic disease states. In the endothelium, adherens junctions are formed by the transmembrane adhesive protein VE-cadherin, as noted by Vestweber [6]. The integrity of the endothelial cell-cell junction depends on the adhesive function and cell surface expression of VE-cadherin as well as the ability of VE-cadherin to bind to the underlying cytoskeleton [6]. Previous studies have demonstrated that disruption of cell-cell junctions depends on VE-cadherin tyrosine phosphorylation or cleavage, as noted by Wallez et al and Hermant et al [7,8].Therefore, we explored whether VE-cadherin was involved in the pathogenesis of HAE.

VE-cadherin is expressed at endothelial cell-cell junctions at the periphery of the cells (see Figure 1A, 1B). VE-cadherin Western Blot analysis (using mouse monoclonal antibody to the extracellular domain of human VE-cadherin (clone BV9)) of cell lysates allowed

determination of the molecular mass of the whole protein (125 kDa) and its extracellular domain (90 kDa) (see Figure 1C) [9]. VE-cadherin serum level was measured in a 54 years old female HAE type I patient with low plasma C1-inhibitor level (12% normal range) and a *de novo* mis-sense mutation in the C1-inhibitor gene (Pro454Leu). The blood samples were taken during an attack (one from the oedematous right arm) and between attacks (one before and one after an episode). The 90 kDa VE-cadherin extracellular domain was detected in the serum of the patient during the acute attack (see Figure 1D, lane 2) while it was barely detectable before and after the attack (see Figure 1D, lanes 1 and 3, respectively). Standard scanning and image intensity analysis performed on 4 independent immunoblots showed a significant increase ($p<0.01$) in the average density of the low MW anti-VE-cadherin band observed during the attack, as compared to the baseline situation (see Figure 1E). The emergence of this split product and its extent are significantly associated ($p<0.001$) with the increase in plasma kininogenase activity (64.1 ± 4.6 nmol/mL/min before the attack, 396.9 ± 28.5 during the attack and 56.6 ± 5.1 after the attack (see Figure 1F)) [10].

To explore one possible molecular mechanism leading to VE-cadherin cleavage from the endothelium, we investigated in a cell culture permeability assay the effects of BK and kallikrein (KK), two powerful mediators of an HAE attack. Using a FITC-dextran cell permeability assay, we demonstrate that BK (10^{-7}M) and KK (10^{-7}M) increased human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) permeability to the same extent as EGTA (1 mM), used as a positive control (see Figure 2A). Release of VE-cadherin from HUVEC was measured after 2 to 4h BK (10^{-7}M) stimulation or 0 to 120 min KK (10^{-7}M) treatment. BK stimulation induced a time-dependent release of two VE-cadherin fragments that corresponded to a molecular mass of 90 kDa. These fragments are almost undetectable in untreated cells (see Figure 2B). In a similar manner, KK induced 90 and 75 kDa VE-cadherin release within 15 min, which increased up to 120 min (see Figure 2C). The 75 kDa fragment

was not seen in plasma. We hypothesized that when active kallikrein is added to endothelial cells, its protease activity in inducing VE-cadherin cleavage is greater than that of kallikrein in plasma.

VE-cadherin release during protease incubation was faster than after BK stimulation, which is in agreement with a direct proteolytic action of KK on VE-cadherin. In support of this concept, the amino-acid sequence of the VE-cadherin extracellular domain contains two putative cleavage sites for the protease KK at the peptide bonds R^{411}-T^{412} and R^{565}-T^{566} (sequence ID P03952) that could lead to the observed 75 and 90 kDa fragments respectively. We thus hypothezised that kallikrein could directly cleave the VE-cadherin from the microvasculature during an HAE attack in vivo, leading to release of the 90 kDa fragment into the patient's blood. To test this hypothesis, we performed an *in vitro* proteolytic assay using purified human plasma KK and an endothelial cell lysate containing a high amount of VE-cadherin as substrate. The reaction was run at 37°C for 0 to 120 min. KK induced a time-dependent decrease in both the 125 and 90 kDa forms of VE-cadherin (see Figure 2D). In addition, after KK challenge, VE-cadherin immunostaining showed several intercellular openings between adjacent cells (see Figure 2E). Altogether, these results support the idea that the mediators of HAE attack induce VE-cadherin cleavage, an event that might contribute to HAE increased endothelial cell permeability.

Previous studies have demonstrated that disruption of cell-cell junctions depends upon intracellular kinases and/or phosphatases. Indeed, VE-cadherin tyrosine phosphorylation is a general mechanism involved in weakening of the endothelial cell barrier resulting from cell stimulation by growth factors and inflammatory cytokines, as noted by Wallez et al [7]. BK receptors are G protein-coupled receptors that can activate the intracellular tyrosine kinase pathways. We found that BK induced VE-cadherin tyrosine phosphorylation in HUVECs within 5 to 10 min (data not shown), suggesting that a link between VE-cadherin

phosphorylation and cleavage cannot be excluded, since the phosphorylation occurs within a few minutes, while the truncated form of VE-cadherin was detected in the culture medium after 30 min.

In conclusion, the detection of a soluble VE-cadherin in the patient's serum during an HAE attack might have potential clinical interest as a biomarker to assess disease severity.As we have shown that both BK and KK have a direct effect on permeability, it is possible that a combination of a KK inhibitor (ecallantide) and a B2 receptor antagonist (Icatibant) could be used to treat a severe attack.

Laurence Bouillet MD, PhD, [a,b,c,d]

Tiphaine Mannic,PhD, [a,b,c]

Manuela Subileaua,[b]

Christian Massot MD, d

Christian Drouet PhD, [c,,e,f]

Denise Ponard,[g]

Philippe Huber, PhD,[a,b,c]

Isabelle Vilgrain PharmD, PhD[a,b,c]

[a]INSERM, U882, Vascular Pathophysiology Laboratory: Cell-cell interactions, Signaling and Aging , F-38054 Grenoble, France.

[b]CEA, Institute of Life Sciences Research and Technologies (iRTSV), F-38054 Grenoble, France.

[c]Joseph Fourier University, F-38054 Grenoble, France.

[d] Internal Medicine department, Reference Center for Angioedema, Grenoble university Hospital, France

[e] GREPI/TIMC CNRS UMR 5525

[f] Angioedema laboratory, Reference center for angieodema, Grenoble university hospital, France

[g] Immunology laboratory, Grenoble university hospital, France

REFERENCES

1. Cicardi M, Zingale L. Clinical manifestation of hereditary angioedema. J Allergy Clin Immunol 2004; 114: S55-9

2. Bouillet L, Ponard D, Drouet C, Massot C. Non-allergic angioedema: update Rev Med Interne. 2002;23(6):533-41.

3.Davis AE III. The physiopathology of hereditary angioedema. Clin Immunol 2005; 114: 3-9

4. Nussberger J, Cugno M, Amstutz C, Cicardi M, Pellacani A, Agostoni A. Plasma bradykinin in angioedema. Lancet 1998; 351: 1693-97

5. Prado GN, Taylor L, Zhou X, Ricupero D, Mierke DF, Polgar P. Mechanisms regulating the expression, self maintenance and signalling-function of the bradykinin B2 and B1 receptors. J Cell Phys 2002; 193: 275-86

6. Vestweber D. VE-CADHERIN. The major endothelial adhesion molecule controlling cellular junctions and blodd vessel formation. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2008; 28: 223-32

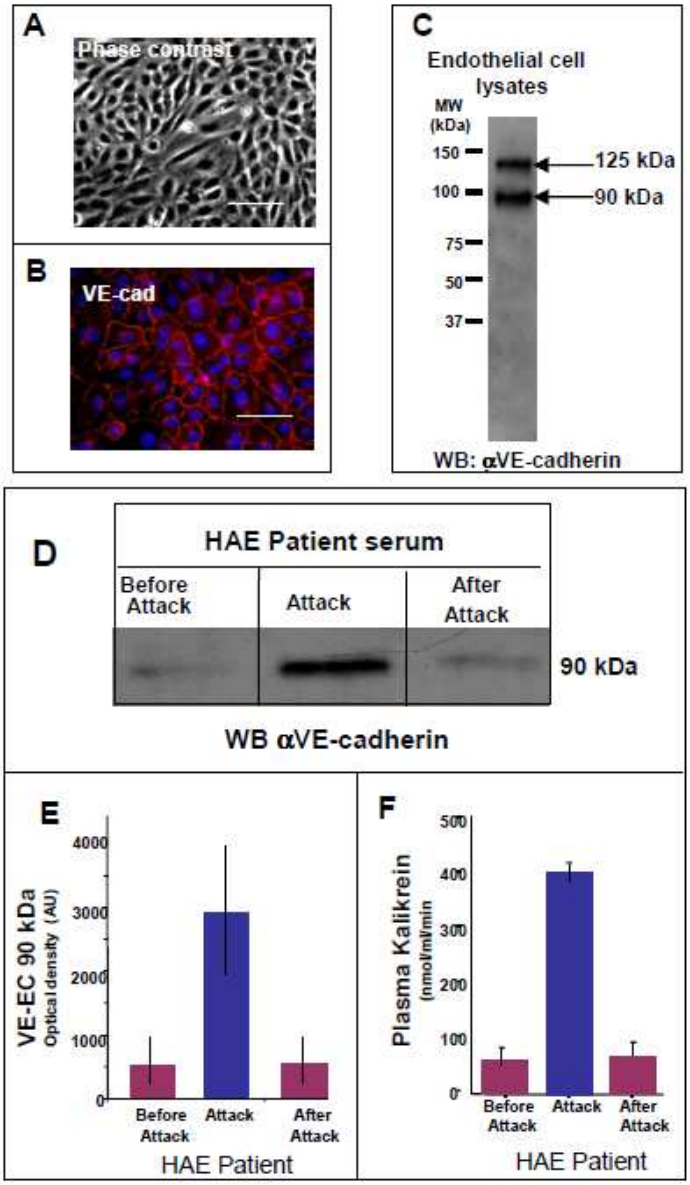
7. Wallez Y, Vilgrain I, Huber P. Angiogenesis : the VE-cadherin swith. Trends Cardiovasc Med. 2006 ;16(2):55-9.

8. Hermant B, Bibert S, Concord E, Dublet B, Weidenhaupt M, Vernet T, et al. Identification of proteases involved in the proteolysis of vascular endothelium cadherin during neutrophil transmigration. J Biol Chem. 2003 18;278(16):14002-12.

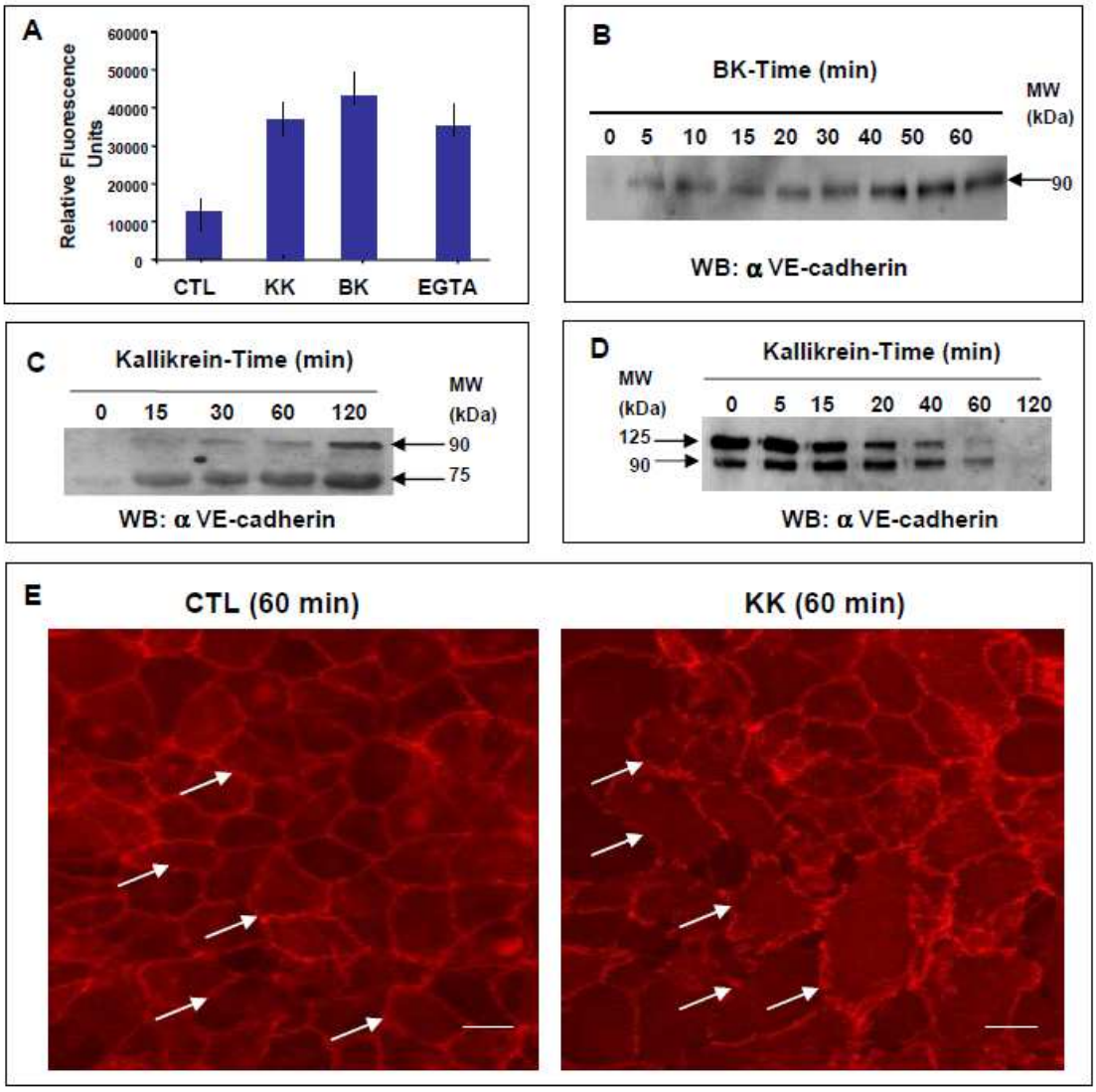
FIGURE LEGENDS

Figure 1: VE-cadherin extracellular domain in HAE patient sample. **A**, Phase contrast microscopy of cultured endothelial cells Scale bar: 50 □m. **B,** VE-cadherin immunostaining. Scale bar: 50 □m. **C,** VE-cadherin immunoblot on HUVECs. **D,** VE-cadherin immunoblot of HAE patient serum samples out of attack (lane 1), during the attack (lane 2) and after the attack (lane 3). **E,** Densitometric analysis of VE-cadherin immunoblots expressed as absorbance values (mean ± 2 SD, n=4). **F,** plasma kallikrein (KK) levels (mean ± 2SD, n=4).

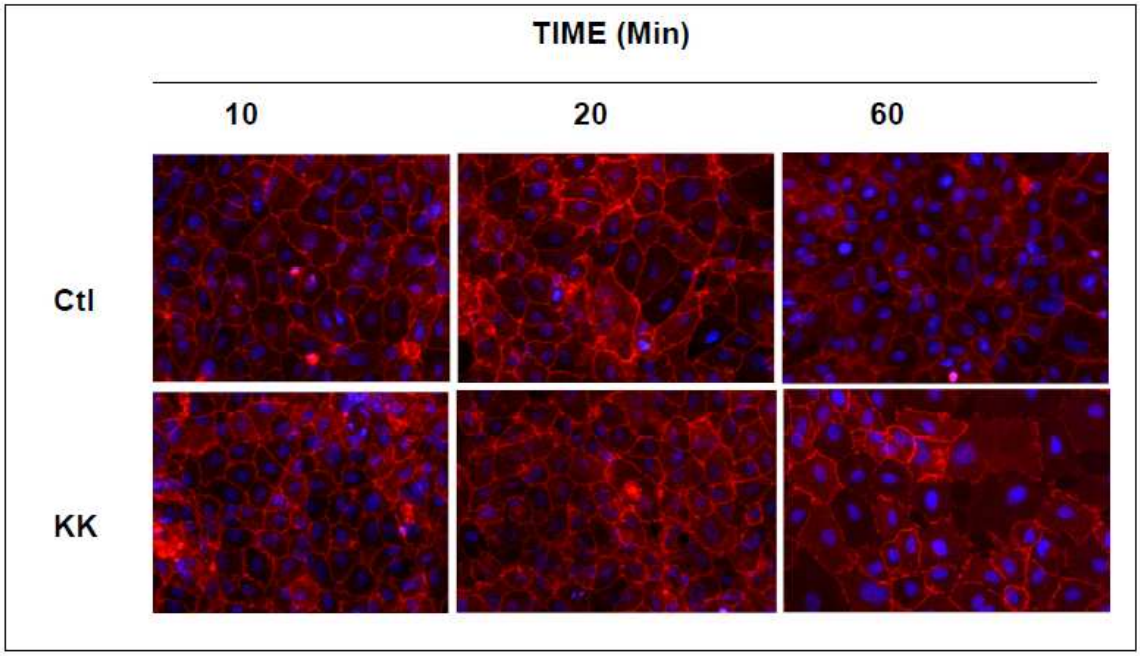
Figure 2: Bradykinin induced increased endothelial permeability through a process involving VE-cadherin proteolytic cleavage. **A,** *In Vitro* Vascular Permeability Assay, on endothelial cells treated for 4 hours, with either BK 10^{-7}M, KK(10^{-7}M) or EGTA 1mM (positive control) (mean ± SD, n=3). **B,** VE-cadherin content of conditionned media from unstimulated cells, BK-stimulated HUVECs (10^{-6} M) for 2 to 4 hours (HUVEC extracts was loaded as positive control (5 µg). (n=3).**C,** VE-cadherin content of conditionned media from KK (0.6 units) treated cells. **D**, *In vitro* VE-cadherin (0.5 µg) cleavage by KK (0.6 U) (n=3).**E.** VE-cadherin immunostaining after KK treatment (0.60 U/for 60 min) (n=4) Scale bar: 50 □m.

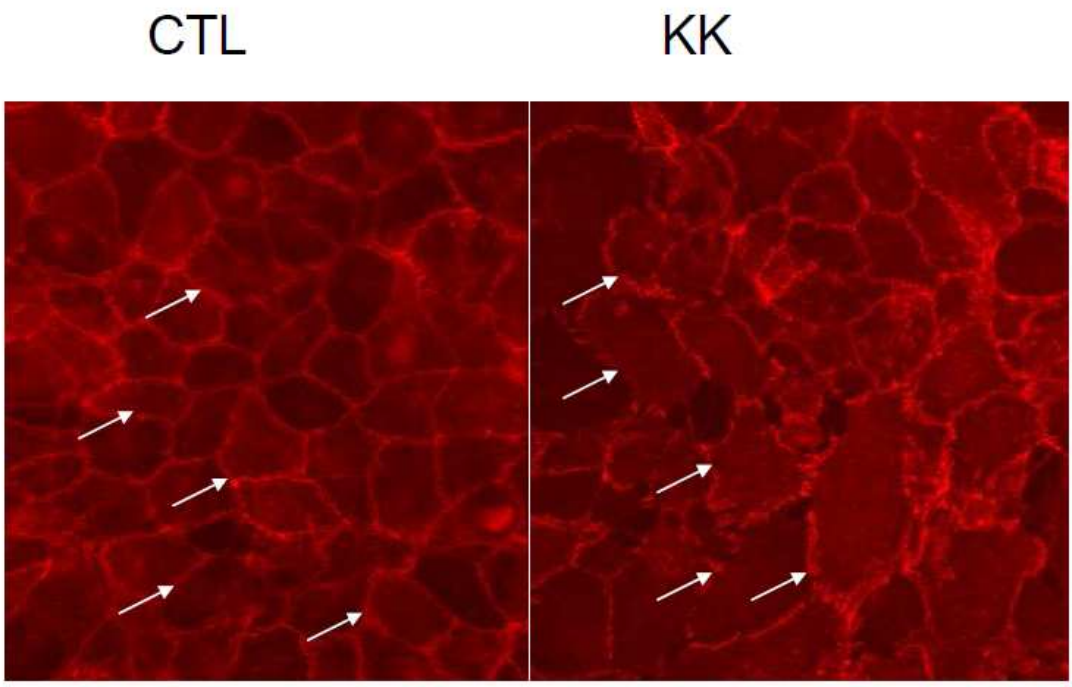


Bouillet al. Figure 1



Bouillet et al Figure 2





Bouillet Figure 2bis

II.3. Discussion

Les angioedèmes (AE) bradykiniques résultent de la dé-régulation du système protéasique kallicréine-kinines consécutive soit à l'absence de protéine inhibitrice du système (C1Inhibiteur): AE héréditaires de type I et II, soit à un excés du facteur Hageman (protéine initiatrice de l'activation) : AE héréditaire de type III, soit à une diminution des enzymes dégradant la bradykinine (enzyme de conversion de l'angiotensine, aminopeptidase P): AE sous inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine. Le caractère soudain de déclenchement des crises d'AE de même que leur sévérité nécessitent la mise en place d'outils de diagnostic précoce.

Au plan moléculaire, la bradykinine libérée agit sur les cellules endothéliales par fixation sur son récepteur B2 et déclenche une modification de la perméabilité endothéliale et l'œdème. Les mécanismes moléculaires mis en jeu sont mal connus. Nous avons pu démontrer: 1/la présence du domaine extracellulaire de la VE-cadhérine (90 Kda) dans les milieux ce culture de cellules endothéliales après action de la bradykinine et la kallicréine. 2/ un clivage in vitro de la VE-cadhérine par la kallicréine. 3/ la détection du fragment 90 kDa dans les sérums de patients ayant un AEH corrélée à l'activité kininogénase, 4/ la phosphorylation de la VE-cadhérine en induite par la Bdk sur le site Y658. Ces résultats permettent de proposer un mécanisme moléculaire d'augmentation de la perméabilité endothéliale dans l'AE par modification de la VE-cadhérine, protéine adhésive majeure responsable de l'intégrité de l'endothélium vasculaire.

Nous avons poursuivi cette étude par des expériences en culture cellulaire de l'influence du TNF–α sur le clivage de la VE-cadhérine. Dans un premier temps, nous avons analysé des milieux de cultures de cellules endothéliales apres traitement au TNF-α afin de savoir si un fragment de VE-cadhérine pouvait y être retrouvé. Les milieux prélevés entre 0 à 90 minutes ont été analysés par western-blot avec un anticorps dirigé contre le domaine extracellulaire de la VE-cadhérine. Un fragment de VE-cadhérine qui migre à 90 kDa et qui correspond bien au domaine extracellulaire de la VE-cadhérine est retrouvé. La libération de ce fragment est augmentée en fonction du temps de stimulation des cellules avec le TNF–α et n'est pas present dans le milieu de cellules non stimulées.

Dans un second temps et pour amorcer la réflexion sur la relation potentielle entre la phosphorylation de la VE-cadhérine et son clivage, des concentrations croissantes de Sorafenib (capable d'inhiber la phosphorylation de la VE-cadhérine sur la tyrosine Y658 en réponse au TNFα, cf chapire 2) ont été ajoutées aux cellules HUVECs et le milieu de ces

cellules a ensuite été analysé. Un contrôle négatif a été effectué en utilisant du DMSO qui est le produit de solubilisation du sorafenib. En réponse au TNF, une importante augmentation de la quantité de VE-cadhérine clivée est retrouvée dans le milieu de culture et la bande correspondant à ce domaine extracellulaire de la VE-cadhérine est partiellement diminuée lorsque les cellules sont prétraitées avec le Sorafenib (concentrations croissantes de 10, 20 et 40 µM).

Figure 1 : Etude du clivage de la VE-cadhérine in vitro. Les cellules HUVECs sont stimulées avec le TNFα et les mileux de culture prélevés et analysés avec l'anticorps BV9. A) Etude de la cinétique d'apparition du fragment clivé à 90 kDa de la VE-cadhérine après stimulation avec le TNFα. B) Etude de l'effet du sorafenib sur le clivage de la VE-cadhérine (concentrations croissantes de 10, 20 et 40µM)

Au total, nous montrons pour la première fois le clivage de la partie adhésive de la protéine par des protéases impliquées dans l'AE. Ces données associées à la détection du domaine extracellulaire dans les sérums de patients valorisent l'utilisation de cette protéine comme marqueur de sévérité ou de suivi thérapeutique de l'angioedème bradykinique**.** La VE-cadhérine largement étudiée au plan moléculaire, présente ici un intérêt potentiel en clinique dans le cadre d'une pathologie inflammatoire rare mais qui peut être mortelle et pour laquelle les marqueurs biologiques sont manquants. L'étude de cette protéine dans plusieurs pathologies étendra le champ d'utilisation potentielle en clinique d'un dosage de VE-cadherine. Par ailleurs l'étude des mécanismes moléculaires du clivage de la VE-cadhérine sont encore peu avancés. Il y a fort à penser que les processus de phosphorylation et clivage sont liés, car des études cinétiques nous ont montré que la phosphorylation sur tyrosine précède la détection de la forme clivée dans des cellules traitées par la bradykinine mais aussi le TNF et le VEGF. Depuis longtemps, il est connu que ces agents augmentent la perméabilité, mais du fait de la compléxité des diverses voies de signalisation intracellulaire , aucun lien direct entre proteases et kinases n'a encore été directement émis.

CHAPITRE II : INHIBITEURS POTENTIELS DE LA PHOSPHORYLATION SUR TYROSINE DE LA VE-CADHERINE

INHIBITEURS POTENTIELS DE LA PHOSPHORYLATION SUR TYROSINE DE LA VE-CADHERINE

II.1 Contexte:

- **Inhibiteurs de tyrosine kinases**

Dans les cellules humaines cancéreuses, les RTK sont souvent hyperexprimés ainsi que d'autres activités tyrosine kinases, dès 1988, il a été démontré que certains inhibiteurs des tyrosines kinases pouvaient être assez spécifiquement réduire la croissance tumorale ou empêcher la mort cellulaire. Un grand développement de ces inhibiteurs a vu le jour et certains sont utilisées en cliniques (thérapies ciblées).

Ainsi le Sorafenib est une molécule qui inhibe la kinase Raf, mais aussi d'autres tyrosine kinases comme le récepteur duVEGF 2 et 3, le PDGF (Platelet-Derived Growth Factor) et c-kit. Cette molécule est utilisée dans les cancers du rein primaires (carcinomes avancés du rein) et le cancer du foie essentiellement. Il a été mis sur le marché en 2006 et autorisé à la vente en Europe en 2007 pour le cancer du foie.

Il existe d'autres molécules issues de composés appelés flavonoïdes connues pour avoir un effet inhibiteur sur les tyrosines kinases, il s'agit de la génistéine et de ses dérivés. La genistéine a été reconnue efficace dans le traitement du cancer de l'estomac induisant l'apoptose des cellules cancéreuse (**Zhou, 2004, Cui, 2005**). Ces mécanismes passent aussi par un effet sur l'angiogenèse (**Gu, 2005**). Ces molécules sont souvent hétérocycliques, extraites de plantes et se comportent comme des compétiteurs de l'ATP nécessaire à la tyrosine kinase.

- **Antiangiogènes et Inhibiteurs de tyrosine kinase angiogèniques**

En 1998, l'équipe du Dr.Folkman a identifié deux antiangiogènes, l'angiostatine et l'endostatine, inhibiteurs de la croissance endothéliale, qui réduisent le volume tumoral. Depuis 2003, de nombreuses molécules ont été découvertes capables d'inhiber l'angiogenèse et sont actuellement à l'étude afin de mettre en évidence les mécanismes de signalisation impliqués dans cette inibition. Les inhibiteurs de kinases angiogènes, préviennent la formation et la croissance des vaisseaux sanguins qui « nourrissent » la tumeur.

- **Intérêt de développer des inhibiteurs de phosphorylation de la VE-cadherine:**

La VE-cadhérine phosphorylée est dissociée de ses partenaires cytoplasmiques et n'assure plus une bonne cohésion endothéliale. Empêcher cette phopshorylation pourrait permettre un bon rétablissement de la cohésion des capillaires tumoraux et un flux sanguin plus régulier pour optimiser une meilleure délivrance de la chimiothérapie adjuvante au sein de la tumeur. En effet les antiangiogèniques ne sont jamais administrés seul mais toujours en association avec la chimiothérapie.

II.2. Résultats expérimentaux:

Nos données in vivo démontrant l'existence de la phosphorylation de la VE-cadhérine dans plusieurs pathologies cancéreuses ou inflammatoires associées à des processus d'hyperangiogenése avec capillaires modifiés , ou de perméabilité accrue (angiodeme), nous amènent à penser qu'un dévelopement d'inhibiteurs de cette phosphorylation pourrait cibler cette vasculature modifiée. Des travaux ont été réalisés utilisant de l'angiostatine, des peptides synthetiques mimant les site de phosphorylation, du Sorafenib et des dérivés de la genisteine (collaboration Pr A Boumendjel, Chimie, UJF Grenoble).

- **Effet de l'angiostatine**

L'angiostatine à été testée sur des cultures de cellules endothéliales HUVECs en présence ou en absence de VEGF. Dès une mn de traitement, le VEGF augmente fortement le niveau de phosphorylation sur tyrosine par rapport aux cellules non stimulées, ce qui atteste la fonctionnalité du récepteur de VEGF (Figure 1 A,B). La phosphorylation de la VE-cadhérine suivie après immunoprécipitation et westernblot, est stimulée par le VEGF alors que l'ajout de concentrations croissantes d'angiostatine (0,1, 0,75, 1 et 2,5 µg/ml) inhibe de façon dose-dépendante cette phosphorylation (Figure 1C)

- **Effets de peptides**

Comme nous avons mis en évidence au préalable que la VE-cadhérine est phosphorylée sur le site Y685 en réponse au VEGF, nous avons testé l'effet du peptide synthétique contenant la tyrosine Y685 et celui contenant la tyrosine 645 sur des cellules endothéliales traitées au VEGF. Alors que le peptide Y645 n'affecte la phosphorylation VEGF dependante de la VE-cadhérine, le peptide 685 semble entrer en compétition et en partie bloquer l'effet du VEGF sur la VE-cadhérine (Figure 1D).

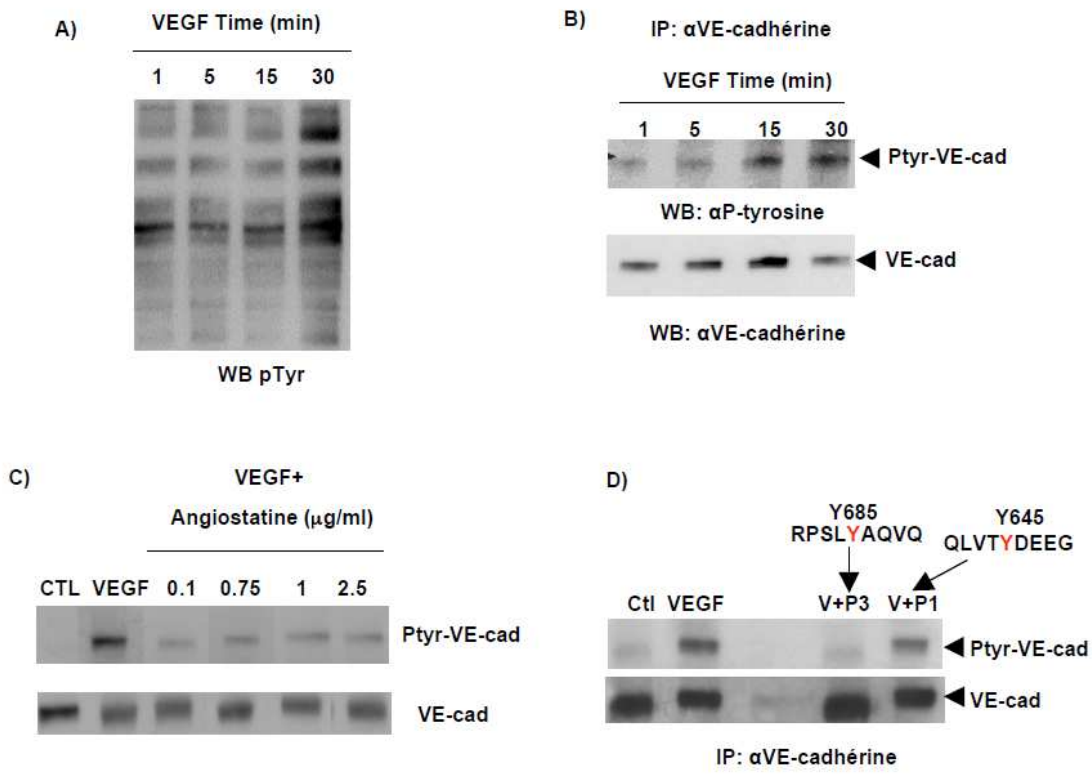


Figure 1 : Effet de l'angiostatine sur la phosphorylation sur tyrosine de la VE-cadhérine en réponse au VEGF. A : Cinétique de phosphorylation des protéines dans les cellules HUVECs en réponse au VEGF (1, 5, 15 et 30 minutes, à 100ng/ml). B : Immunoprécipitation de la VE-cadhérine et immunoblotting anti-phosphotyrosine et VE-cadhérine dans les cellules HUVECs après stimulation au VEGF (A). (C) : Meême expérience que la précedente après stimulation des cellules pendant 30 minutes avec le VEGF et traitement au préalable avec l'angiosatine (fragment K1-4 à 0,1, 0, 75, 1 et 2,5 µg/ml)

- **Effets du Sorafenib**

Le Sorafenib réduit la perméabilité endothéliale dans le modèle de tumeurs cérébrales de rat (chapitre I). Dans ce modèle, le TNF-α est la cytokine incriminée dans la phosphorylation du siteY658 de la VE-cadhérine et nous avons montré que la kinase responsable est la tyrosine kinase Syk (chapitre I, publication #1). Des cellules traitées par des concentrations croissantes de Sorafenib (10, 20 et 40 µM), puis stimulées par le TNF-α présentent une inhibition de la phosphorylation de la VE-cadhérine sur le site Y658. (Figure 2 A). Dans une cinétique de phosphorylation in vitro par Syk du domaine cytoplasmique de la VE-cadhérine sauvage ou muté Y658F en présence de Sorafenib, aucune modification n'est observée (Figure 2 D). De même, l'autophosphorylation de Syk n'est pas affectée par des concentrations croissantes de Sorafenib (10, 20, 40µM). Ces résultats nous permettent de conclure que l'inhibition observée

sur les cellules stimulées par le TNF-α n'est pas due à une inhibition directe de la tyrosine kinase Syk. Une kinase intermédiaire dans l'activation de Syk en réponse au TNF est sans doute la cible du Sorafenib, peut être la PK-C.

Le TNF induit le clivage de la VE-cadhérine (Figure 2B) et ce phénomène est inhibé de façon dose-dependante par le Sorafenib (Figure 2C) . Ces données suggèrent quil peut exister un lien entre phosphorylation et clivage de la VE-cadhérine en réponse au TNF

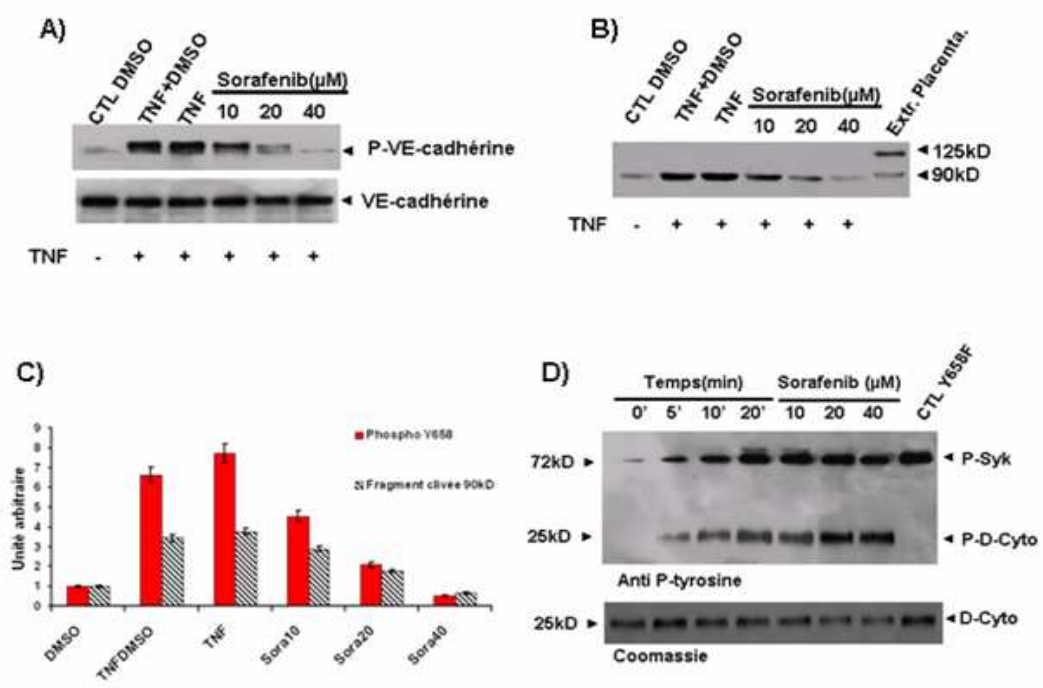


Figure 2 : Effet de Effet du Sorafenib sur la phosphorylation et le clivage de la VE-cadhérine induite par TNFα. A) Phosphorylation de la VE-cadhérine après traitement des HUVEC aux TNF/Sorafenib, B) Clivage du domaine extracellulaire de la VE-cadhérine dû au traitement des HUVEC aux TNF/sorafenib, C) comparaison des profils de phosphorylation et de clivage de la VE-cadhérine, D) Effet du Sorafenib sur l'activité tyrosine kinase de Syk in vitro ; cinétique de 0 à 20 min et test de différentes concentrations du Sorafenib pendant 20min, Y658F sert de contrôle négatif.

- **Effets de dérivés de la genistéine**

Nous avons reçu 5 composés différents avec lesquels nous avons pu effectuer des tests cellulaires en présence de VEGF. Les composés ont été incubés à 10µg/ml avec les cellules endothéliales et une analyse de la phosphorylation sur le site Y658 de la VE-cadhérine a été réalisée avec un anticorps anti-phosphosite Y685. Une inhibition presque totale de cette phosphorylation induite par le VEGF est observée pour le composé B, ce qui n'est pas le cas (composés MA et A) ou dans une moindre mesure pour les composés KA et C (Figure 3 A).

L'analyse du profil de phosphorylation globale des protéines sur tyrosine révèle une diminution générale par le composé B (Figure 3 B). Dans un test d'auto-phosphorylation de Src in vitro, le composé B induit une diminution de l'activité de Src détectée par l'antiphosphosite 418 Src de façon dépendante de la concentration.

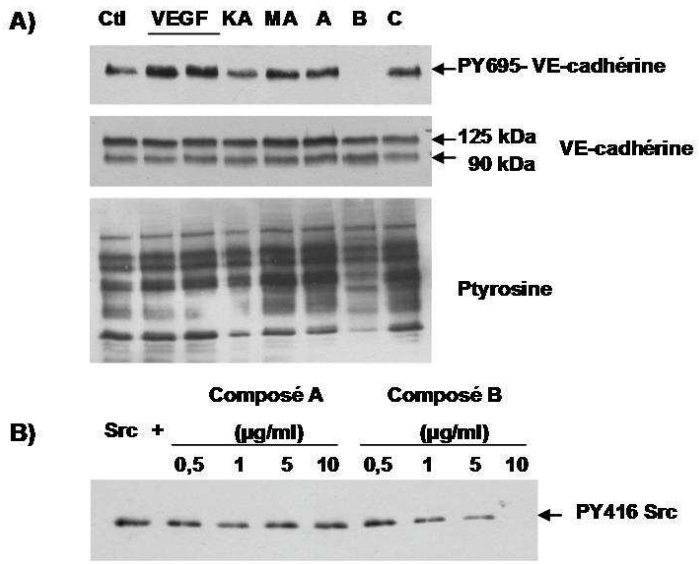


Figure 3 : Effet de composés dérivés de la génistéine sur la phosphorylation de la VE-cadhérine induite par le VEGF. : A) Phosphorylation de la VE-cadhérine sur le site Y^{685} et phosphorylation globale des protéines après traitement des HUVEC aux VEGF/composés KA, Ma A, B et C. B) Effet des composés A et B sur l'activité tyrosine kinase de Src *in vitro* pendant 20 min

Au total, parmi les inhibiteurs testés, angiostatine, peptide et composé B se sont avéré avoir un effet sur la VE-cadhérine. La viabilité cellulaire n'a été affectée par aucun d'entre eux. Ces résultats préliminaires semblent prometteurs pour l'optimisation de la spécifité de ces produits, de leur introduction dans la cellule.

II.3. Dicussion et conclusion

Depuis plusieurs années, les mécanismes d'action de plusieurs molécules utilisées en thérapie anti-angiogéne, et anticancéreuses ont suscité de nombreuses recherches.

L'inhibition de la phosphorylation de la VE-cadhérine a été montrée de façon indirecte par l'utilisation de composés testés pour leurs effets anti-angiogéniques. Ainsi certaines molécules extraites de plantes ont été documentées :

- le resveratrol, composé phénolique retrouvé dans le raisin et certains autres fruits a été montré inhibiteur de l'angiogenèse, en 2003 par l'équipe de Kuo, par l'inhibition de la

réponse au VEGF et de la tyrosine kinase Src. Les concentrations efficaces sont de l'ordre du micromolaire. (**Lin, 2003**).

- les catéchines dont les epigallocathéchines gallates (EGCG) représentent 40%, issues du thé vert, inhibent l'angiogenèse par inhibition de la phosphorylation du récepteur au VEGF, par diminution de l'expression et de la phosphorylation de la VE-cadhérine.(**Tang, 2003**). Plus récemment, la même équipe a pu mettre en évidence une dissociation du récepteur au VEGF avec son ligand, montrant par la même occasion une réduction du signal mitotique et angiogénique (**Rodriguez, 2006**).

-le capsiate et de ses dérivés, composés issus des piments rouges, inhibent de façon générale l'angiogenèse (**Min, 2004**). En 2008, ils ont montré que cette inhibition passe par la compétition avec le site de fixation à l'ATP de la tyrosine kinase Src dans la voie de signalisation du VEGF, impliquant par la même la phosphorylation sur tyrosine de la VE-cadhérine (**Pyun, 2008**).

- le composé M475271, inhibiteur puissant de Src, est capable d'inhiber la phosphorylation sur tyrosine de la VE-cadhérine et d'augmenter par la même son association avec ses partenaires caténines intracellulaires (**Ali, 2005**).

Toutes ces études d'inhibition de l'angiogenèse avec des molécules utilisées ou non à des fins thérapeutiques semblent avoir une action spécifique sur la phosphorylation de la VE-cadhérine sur tyrosine et /ou sur les effecteurs directs ou indirects de cette réaction. Ces données montrent l'importance de cette modification covalente de la VE-cadhérine dans des contextes pathologiques tels que l'inflammation et/ou le cancer.

Nous avons testé d'autres molécules afin de trouver celle qui pourrait inhiber de façon spécifique la phosphorylation de la VE-cadhérine sur tyrosine, étape clé dans les mécanismes d'angiogenèse ou plus généralement de perméabilité endothéliale.

Nous avons pu mettre en évidence que des composés décrits pour être inhibiteurs de tyrosine kinases ou de l'angiogenèse, sont capables de bloquer la phosphorylation sur tyrosine de la VE-cadhérine dans des cellules endothéliales en culture (Angiostatine, Sorafenib et dérivé de la génistéine) sur le site Y658 (Sorafenib en réponse au TNF-α), sur le site Y685 (composés dérivés de la génistéine en réponse au VEGF) ou plus généralement (angiostatine en réponse au VEGF).

Ces composés sont donc des outils potentiels de développement de futures molécules inhibitrices de la phosphorylation sur tyrosine de la VE-cadhérine. Ainsi le peptide contenant la tyrosine Y685 est un bon compétiteur du fait que Src présente une bonne affinité pour ce substrat (**Wallez, 2007**). Il reste toutefois à développer des techniques de perméabilisation ou

de vectorisation du peptide contenant laY685 et de meilleure solubilisation du composé B afin d’optimiser les concentrations efficaces sur la phosphorylation de la VE-cadhérine.

CHAPITRE III : VE-CADHERINE BIOMARQUEUR DANS LE CANCER

VE-CADHERINE : BIOMARQUEUR DANS LE CANCER

III.1. Contexte

Comme indiqué dans l'introduction paragraphe VII, l'intérêt des biomarqueurs en cancérologie est devenu primordial. Dans le cadre des cancers et des pathologies dysimmunitaires, les événements associés à l'atteinte de l'endothélium vasculaire sont: les vascularites, les phénomènes thrombotiques, l'athérosclérose, la dissémination des tumeurs (à proximité ou générale). L'intérêt de biomarqueurs est donc aussi primordial car les atteintes de l'endothélium peuvent être fonctionnelles ou structurales, réversibles ou non. Les moyens d'exploration de l'endothélium vasculaire utilisent des dosages plasmatiques, des techniques immunohistologiques, des mesures des cellules endothéliales circulantes.

La VE-cadhérine : biomarqueur de l'angiogenèse tumorale?

Très peu de publications dans la littérature rapportent l'intérêt d'un dosage de VE-cadhérine sérique dans des pathologies où il y a modification des cellules endothéliales (angiogenèse tumorale, inflammation). Une étude réalisée en 2004, montre que le taux de VE-cadhérine plasmatique est corrélé avec l'athérosclérose liée aux affections cardiovasculaires (**Soeki, 2004**). Une étude réalisée en 2008 par l'équipe d'A. Villasante montre que la VE-cadhérine sérique est augmentée chez des patientes présentant un syndrome d'hyperovulation sévère. Cette pathologie est observée suite à une stimulation ovarienne utilisée par exemple au cours de la Fécondation *In Vitro* (FIV). Les cas sévères incluent un développement de conditions critiques associées à des ascites, une augmentation des ovaires, des effusions pleurales et péricardiques, de l'hypovolémie et de l'hypotension avec oligurie (**Schenker, 1978, Balasch, 1998**) (**Villasante, 2008**).

De part l'exclusivité de son expression dans l'endothélium, la VE-cadhérine modifiée dans la voie VEGF peut représenter in vivo la signature d'un endothélium activé. Ainsi nous avons émis l'hypothèse que le dosage de la VE-cadhérine sérique ou plasmatique dans les pathologies cancéreuses ou inflammatoires pouvait être le reflet d'un remodelage endothélial.

Nous avons évalué la présence de VE-cadhérine circulante chez des patients porteurs de glioblastomes, tumeurs hyperangiogénique et nous avons montré qu'elle est transportée par les lipoprotéines, que son dosage nécessite la présence de détergents pour dissocier les entités , et que son taux circulant avant thérapie pourrait prédire la sensibilité ou la résistance à la chimiothérapie dans le gliome .

III.2 Article 3

Human Lipoproteins, a new serum compartment for tracking biomarkers: an illustrative study of soluble VE-cadherin in malignant gliomas

Francine Cand[1,2,3], Laurent Pelletier[3,4,5] Ph.D, Tiphaine Mannic[1,2,3], PhD, Sandra Boccard[1,2,3], PhD, François Laporte[5,6], Jean-Luc Laffont[5,6], Anne-Sophie Gauchez[5,7], Daniele Gulino-Debrac[1,2,3], Ph.D., Philippe Huber[1,2,3], Ph.D., François Berger[3,4,5], M.D., Ph.D., Isabelle Vilgrain[1,2,3], Ph.D.

[1]INSERM, U882, Vascular Pathophysiology Laboratory: Cell-cell interactions, Signaling and Aging , F-38054 Grenoble, France.

[2]CEA, Institute of Life Sciences Research and Technologies (iRTSV), F-38054 Grenoble, France.

[3]Joseph Fourier University, F-38054 Grenoble, France.

[4]INSERM U836, Grenoble Neurosciences Institute, F-38700 Grenoble, France.

[5]Grenoble MICHALON Hospital, 38043 Grenoble Cedex, France.

[6]Grenoble MICHALON Hospital, -Department of Integrative Biology, Unit of Functionnal Nutrition-Lipids-Lipoproteins. BP 217. 38043 Grenoble Cedex, France.

[7]Grenoble MICHALON Hospital, -Department of Integrative Biology, Unit of biomarkers in oncology. BP 217. 38043 Grenoble Cedex, France.

Short title: Soluble VE-cadherin is carried by lipoproteins

Key Words: glioma, lipoproteins, surrogate biomarkers, VE-cadherin

Address for correspondence :

Isabelle Vilgrain,

INSERM Unité 882,Institute of Life Sciences Research and Technologies (iRTSV), Joseph Fourier University, CEA Grenoble, 17, rue des Martyrs 38054 Grenoble Cedex 9. France E-mail : Isabelle Vilgrain : ivilgrain@cea.fr

Abstract

BACKGROUND

While no validated biomarkers for glioma are currently known, in the present study, we reasonned that the vascular angiogenic phenotype of these tumors could be exploited for peripheral diagnosis. We studied the soluble Vascular Endothelial (VE)-cadherin, a protein exclusively expressed in endothelial adherens junctions.

METHODS

Soluble VE-cadherin serum level was evaluated by westernblotting and sandwich ELISA using VE-cadherin monoclonal antibody (mAb BV9). Fifty-eight patients newly diagnosed glioma who underwent radiochemotherapy were enrolled in this study and retrospectively classified as being responders or not to a 3-months-treatment temozolomide. Serum samples were collected prior treatment. Data were analyzed using logistic regression and receiver operating characteristics (ROC) curve analysis.

RESULTS

We demonstrate with the use of an improved method comprising predilution of human serum in a detergent-containing buffer, the presence of a truncated form of VE-cadherin (sVE-cadherin) in serum from glioma patients (90 kDa). Of importance, sVE-cadherin was found associated with serum lipoproteins and the detergent allowed to separate both entities to increase protein detectability. In addition, lipoprotein-associated VE-cadherin level segregated the patient's potential to be responders or not to anti-tumor therapy, (area under the ROC curve 0.837 ; p=0.0024).

CONCLUSIONS

We show for the first time that the lipoprotein compartment of serum --- which is most often ignored in proteomic analysis contains proteins that can unexpectedly serve as biomarkers for disease. This finding may open completely new avenues of biomarker research. Second, we demonstrate, validate and deploy one candidate marker (soluble VE-cadherin) for clinical use in the setting of gliomas**.**

INTRODUCTION

Glioma is consisted of the majority of primary brain cancers in adults with a very poor prognosis.[1] The tumors are characterized by rapid cell growth, extensive neovascularization and diffuse cellular infiltration of normal brain structures. The World Health Organization (WHO) has developed a classification scheme for astrocytomas and oligodendrogliomas that rates (grades) gliomas from the least malignant to the most aggressive tumor type. The grading scale encompasses the various histopathological delineations and ranks them from Grades I thru IV. The most aggressive tumors have been assigned Grade IV or glioblastoma multiforme. The diagnosis of gliomas is usually suggested by magnetic resonance imaging (MRI) or computed tomography (CT). The standard therapy for newly diagnosed maligant glioma involves surgical resection when feasible, radiotherapy and chemotherapy.[2] However, either de novo or acquired chemoresistance occurs frequently. Tumor relapse is mainly detected by the radiological status when clinical symptoms occurr during the follow up investigated every 3 months during therapy.[3] A major effort to improve the control of glioma entails the use of a peripheral serum biomarker potentially relevant to provide accurate predictions of the outcome after standard or novel treatments.

Recently, our understanding of the molecular pathogenesis of malignant glioma has emerged. Malignant transformation in gliomas results from the sequential accumulation of genetic aberrations and the deregulation of growth-factor signalling pathways leading to the up regulation of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and angiogenesis, a hallmark of malignant glioma, making these tumors especially attractive targets for angiogenesis inhibitors.[4,5] Angiogenesis activation requires vascular-endothelial(VE)-cadherin adhesive properties, a cadherin family member specifically expressed in endothelial cells and strictly located at cell-to-cell junctions. [6-8] As the other members of the cadherin family, VE–cadherin is able to mediate a homotypic type of cellular interaction in a Ca^{2+}-dependent manner. The role of VE-cadherin in angiogenesis has been demonstrated in VE-cadherin deficient mice.[9-11] The ectodomain-based-interactions are reinforced by interactions involving the cytoplasmic domain of VE-cadherin which binds, to catenins (p120, b-catenin, plakoglobin, a-catenin).[6] By establishing these multiple interactions, VE- cadherin is a crucial determinant for the maintenance of endothelial barrier function.[12] Tyrosine phopshorylation of the protein upon VEGF or pro-inflammatory cytokines endothelial cells stimulation is a mechanism involved in reorganization of adherens junctions.[13-17] In addition, proteolytic cleavage of VE-cadherin is an other mechanism invoved in adherens junction stability. Indeed, we previously reported the role of proteases in the cleavage of VE-cadherin in neutrophil transmigration.[18,19] These

findings suggest that the proteolytic release of soluble VE-cadherin represents an important mechanism for the regulation of VE-cadherin functions.

In most solid tumors, the newly formed vessels are plagued by structural and functional abnormalities.The tumor vasculature contains immature, highly-permeable, chaotic vessels with heterogeneous blood flow rates. In addition, the capillary endothelial cells lining the inner surface of tumor capillaries, normally a smooth, tightly-packed sheet, have gaps between them, causing vessel leakiness.[20] While no validated bioperipheral biomarkers for glioma are currently known, in the present study, we reasonned that the vascular angiogenic phenotype of these tumors could be exploited for peripheral diagnosis. Because phenotypic and functional characteristics distinguish tumor vessels from the mature vasculature in normal tissues, VE-cadherin structural changes (ie: the cleavage) seemed plausible in glioma tumoral vasculature. Thus, we addressed the question whether soluble VE-cadherin could be a potential candidate biomarker for clinical use in the setting of gliomas and we evaluated the relationship between soluble VE-cadherin and response to chemotherapy .

METHODS

Patients

Fifty-eight patients with advanced glioma were enrolled from January to September 2004 in Grenoble Hospital (France). All patients gave informed consent. The blood samples were obtained before initiation of therapy. The protocol was approved by the local ethics committee. All patients were diagnosed with a primary brain tumor: malignant oligodendrogliomas (grade III), glioblastomas or malignant oligo-astrocytomas (in accordance with the WHO)[1]. Patients underwent chemotherapy with temozolomide alone (Temodal®), or radiochemotherapy with temozolomide associated to radiotherapy following the Stupp protocol[2]. Response to therapy was investigated using MRI following the cairncross criteria[3]. The minimum criterion for response was a 50% decrease in the size of the enhancing tumor on consecutive CT or MRI scans performed at least 1 month apart. Therapeutic response was observed in 27 patients (25 oligodendroglioma, 2 glioblastoma multiform) median age 42.15 (range 23-65). 31 patients were resistant to chemotherapy (5 anaplastic oligodendroglioma, 9 anaplastic astrocytomas and 17 glioblastomas multiform), median age 51.9 (range 19-84).

Laboratory Analysis:

Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) were obtained and grown as described in.[21]

Immunofluorescence was performed as previously described.[15]

Lipoproteins were isolated as previously described.[22]

VE-cadherin ELISA: We designed an ELISA with the mouse monoclonal VE-cadherin antibody (clone BV9) which recognizes the extracellular domains EC3-EC4 of human VE-cadherin.[23] Polyvinyl microtiter wells were coated overnight at 37 °C with 100 µl of proteinG Sepharose purified BV9 monoclonal antibody (10 µg/ml) in 0.1 M sodium carbonate buffer, pH 9.6. After 3 washes with PBS and 0.05% Tween 20, the non specific binding sites plates were saturated with 1% human serum albumin for 1h at 37°C, washed with PBS and 0.05% Tween 20 and incubated with 100 µl of serum dilution at 37°C for 3h. After 3 washes with PBS and 0.05% Tween 20, bound VE cadherin was detected by adding 100 µl of rabbit anti-CAD 3 (1 mg/ml) for 1 h at 37°C. Wells were then washed five times with PBS and 0.05% Tween 20. 100 µl/well of anti-rabbit IgG biotin was added for 1h at 37°C. Then 100 µl/well of freshly diluted of streptavidin alkaline phosphatase-conjugate was added for 1 h at 37°C. Wells were then washed five times with PBS and 0.05% Tween 20, and 100 µl/ well of *p*-nitrophenyl phosphate was added for 15 - 25 min at room temperature. The absorbance values of each well were measured at 405 nm using an automated microplate reader (Benchmark

microplate reader, Bio-Rad Laboratories, Hercules, California) with compatible software (Microplate Manager 5.2, Bio-Rad). All assays were performed in respective duplicate samples.

Serum lipid profile. The biochemical evaluation was carried out in the hospital laboratory following the criteria of the World Health Organization Lipid Reference Laboratories. The serum concentrations of cholesterol, HDL-cholesterol and triglycerides were assayed on a Roche/Hitachi Modular P analyzer with commercial enzymatic tests from Roche Diagnostics according to the manufacturer's specifications. LDL-cholesterol was calculated using the Friedwald formula: {total cholesterol} - {HDL cholesterol} - 1/5 (triglycerides).

Statistical analysis. Data are expressed as mean (SE) or 95% CI, and all *p* values of less than 0.05 from two-sided tests (Mann-Whitney *U* tests) were considered to indicate statistical significance. We also conducted receiver-operator characteristic curve (ROC) analysis to evaluate the diagnostic ability of sVE-cadherin.

RESULTS

Detection of circulating VE-cadherin in serum from glioma patient

The detection of soluble VE-cadherin in serum was performed using BV9 antibody that typically labelled VE-cadherin at endothelial cell-cells junctions (Figure 1A, left panel), and detected the whole protein (125 kDa) and its extracellular domain (90 kDa) in cells lysates by westernblotting (Figure 1A, right panel). Glioma patient serum analysis was first performed by SDS-PAGE to assess the molecular weight of the sVE-cadherin after dilution of the samples for appropriate protein separation by SDS-PAGE. Because of the lipidic aspect of the serum, the sample was diluted in a detergent containing buffer Triton X100 0.5%. In the absence of detergent, a faint 90 kDa band was detected in the serum diluted 1 to 50, while detergent dilution significantly improved sVE-cadherin detection accuracy up to dilution 1 to 500 (Figure 1B).

These data show for the first time the presence of a circulating form of human VE-cadherin in a glioma patient serum which detection was highly improved when the serum was serially prediluted in a non denaturing surfactant containing buffer. Notably, the 90 kDa correspond to the extracellular domain of the protein, no other fragments were detected.

Evidence that lipoproteins are carriers of sVE-cadherin in human serum

From the above data, we hypothesized that sVE-cadherin, was somehow associated to an entity that impeded its accurate detection, when performed in the absence of surfactant. We thus examined whether sVE-cadherin was associated with lipid entities such as lipoproteins in the serum. The most classical methods for lipoprotein separation are precipitation procedures, ultracentrifugation, electrophoresis[21,24,25]. Out of these, we have chosen ultracentrifugation and precipitation procedures. After ultracentrifugation, analysis of isolated serum lipids by flottation showed that the 90 kDa VE-cadherin, was mainly detected in the lipidic fraction while it was barely detectable in the 105,000g pellet (P) (Figure 2C). Lipoproteins from the same serum were isolated by a precipitation procedure and analyzed by coomassie staining and western blotting after dilution in detergent containing buffer (Figure 2D). VE-cadherin was clearly detected as the 90 kDa fragment. The lipoproteins-depleted serum (S-Lipo) was analyzed by SDS-PAGE, coomassie staining, Westernblotting and compared to the whole serum (S), both samples were diluted in PBS with or without Triton X-100. The diluted sample gave a good protein separation exhibiting the most abundant protein, albumin (68 kDa). In addition to increase the VE-cadherin detectability, the use of the detergent for the serum dilution increased also the detectability of several proteins ranging from 160 kDa to 25 kDa as seen by coomassie staining which was not the case for the lipoprotein depleted serum

(S-Lipo) (Figure 2E left panel). Westernblot analysis of the same fractions with BV9 antibody showed that in contrast to whole serum, VE-cadherin was barely detectable in S-Lipo. Furthermore, the detection of the immunoreactive band was not improved by detergent (Figure 2E right panel). Altogether, these data demonstrated that sVE-cadherin is concentrated in the serum lipoprotein fractions, and that detergent is required for accurate detection.

Soluble VE-cadherin level in responders and non-responders glioma patients.

To obtain a preliminary assessment of VE-cadherin in the setting of gliomas, we analyzed glioma patients that were retrospectively classified as being responders or non responders to radio-chemotherapy. The serum were collected before chemotherapy and/or radiotherapy. Illustrative westernblot are presented in Figure 1F. The sVE-cadherin 90 kDa fragment was immunodetected with BV9 mAb as well as the polyclonal CAD3 antibody in the serum from responders group while it was barely detectable in the non responders group. The coomassie staining of protein pattern was performed as a control of gel loading (Figure 1F, lower panel). This result suggested that the level of soluble VE-cadherin could discriminate responders and non-responders glioma patients.

To extend these data, we thus attempt to develop a sandwich-ELISA system that could be used in the presence of detergent with the BV9 mAb for the capture and the CAD3 antibody as a tracer. We performed preliminary experiment for the quantification of the human recombinant VE-cadherin CAD 1-4 fragment in the presence of detergent. Linear standard curves were obtained with Triton X-100 concentrations from 0.005% to 0.5%, suggesting that the VE-cadherin-ELISA could be performed in the presence of detergent (Figure 2A). The linearity of the VE-cadherin assay was then performed with a glioma patient serum sample diluted from 1:50 to 1:500, in buffer with Triton 0.5%. Optical densities for VE-cadherin level were linear with dilution up 1:200, with a limiting dilution of 1:500 (Figure 2B). In addition, analysis of 6 serum from the two clinical groups by ELISA gave comparable results to those obtained by westernblot (Figure 2 C). We thus concluded that this ELISA was suitable for the analysis of lipoprotein-associated VE-cadherin level in 58 glioma patients retrospectively classified as responders or non responders to radio-chemotherapy. Figure 2D shows that the level of sVE-cadherin was significantly lower in the non responders group (OD: 0.669±0.104 AU) as compared to the responders (OD: 0.975±0.098 AU $p<0001$). Receiver-operating characteristic (ROC) curve analysis to classify responders or non responders patients for chemoresistance yielded an area-under-the-curve of 0.837 (95% confidence interval 0.71-0.87; maximal accuracy 0.875) (Figure 2E). As we showed that sVE-

cadherin was carried by serum lipoproteins, the serum lipid profile of the two clinical groups was analyzed. As shown in Figure 2F, the serum lipid profile, including total cholesterol (TC), triglycerides (TG), high-density (HDL-C) and low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C), was not significantly different between the two groups and could not account for the differences observed in serum VE-cadherin levels.

DISCUSSION

Malignant gliomas are highly vascularized tumors for which discovering new serum biomarkers that may provide prognostic information, as well as guidance in making decisions about optimal therapy is a main challenge. VE-cadherin is a key player in angiogenesis. Eventhough the protein functions are well known in vivo and in cellulo studies, it has never been assessed as a potential biomarker in glioma. The goal of the present study was to determine whether sVE-cadherin, could be a potential serum biomarker for clinical use in the setting of gliomas. We demonstrate here for the first time the presence of a 90 kDa circulating form of human VE-cadherin in glioma patient serum corresponding to the extracellular domain of the protein. The technique used here in to detect sVE-cadherin in serum was electrophoresis and westernblot from a small serum sample which clearly identify the protein, and give a direct confirmation of the molecular weight of the circulating soluble protein. In addition, the technique, does not require the depletion of major serum proteins from serum samples as compared to classical proteomic techniques. Importantly, we demonstrated that serum pre-dilution in a detergent-containing buffer dramatically increased the detectability of the protein. Indeed, our results provide evidence that human lipoproteins are carriers for sVE-cadherin. This observation sheds a new light for the detection of solubles proteins in serum or plasma. We further believe that the techniques for detecting, optionally quantifying, soluble proteins, more particularly soluble angiogenesis-related proteins, need to take into account dissociating proteins from lipids that may be associated thereto. Based on these results, we postulated that the lipoproteins is a new compartment of potential interest for tracking biomarkers as it has never been considered as a carrier of proteomic markers in cancer patients. Thus, beside the finding of an individual protein (sVE-cadherin), the exploration of the hydrophobic compartment in serum will give a tremendous improvment in the finding and quantification of peripheral reliable proteomic biomarkers which could be used in oncology. Indeed, the lipidic compartment may provide a proteomic signature of the tumor by carrying proteins coming from the tumor itself, providing quite a direct access to the tumor concentrated at the periphery.

We demonstrate for the first time that sVE-cadherin could be used as a clinical serum biomarker, more particularly in glioma for which progression is strongly dependent on the development of a new vascular network and angiogenesis. In gliomas, several biomarkers studies using various techniques, such as karyotype, microsatellite analysis, fluorescent in situ hybridization and chromosome comparative genomic hybridization have been conducted over

the last years.[26,27]. Recent proteomic studies have identified potential proteins such as MMP9, cathepsin D, YLK40, a member of the "mammalian chitinase–like proteins, or GFAP. These proteins are not specifically related to endothelial cells, and their quantification remain to be validated either for diagnosis, prognosis or treatment outcome.[28-31]

In glioma, only tissue biomarkers look promising to date including loss of chromosomes 1p/19q in oligodendrogliomas and expression of O-6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT).[32] The MGMT promoter hypermethylation indeed has recently emerged as a powerful determinant of chemotherapy sensitivity in glioblastomas. However, the epigenetic silencing of the *MGMT* gene testing is on the way to develop a reliable, clinically validated assay for using formalin-fixed, paraffin-embedded brain tumor resections and methylation-specific PCR**.**

The present study demonstrated that sVE-cadherin could discriminate the responders and non-responders glioma patients. These differences were easily detected by westernblotting and ELISA when diluting serum in detergent buffer, suggesting that sVE-cadherin assay could be a potential non-invasive test for the patient for pre-operating diagnosis of response to chemotherapy. These differences in sVE-cadherin level were not detectable using the commercially available ELISA kit. It might be explained by the presence of lipidic entities that impaired an accurate detection. This retrospective study requires further studies to analyze whether this encouraging finding can be extended to other populations for prospective validation. Furthemore, in glioma, targeting of active angiogenesis is an attractive adjuvant therapeutic approach and association of anti-angiogenic agents with chemotherapy and/or radiotherapy has been demonstrated to increase therapeutic response. [33] However, the increasing clinical use of antiangiogenic drugs, has revealed the growing need to discover and validate surrogate biomarkers of benefit and toxicity.[34] The next challenge will be to optimize and to standardize sVE-cadherin assays to extend the study in several different clinical trials and in other cancers. In this respect, we anticipate that in future studies, lipoproteins compartment will reveal novel biomarkers and that sVE-cadherin will be validated to assess tumoral angiogenesis, to monitor tumor progression, or to follow response to therapy and/or to predict outcome to VEGF-targeted therapy.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by INSERM (U-882) and Commissariat à l'Energie Atomique, Direction des Sciences du Vivant/iRTSV, Association pour la Recherche contre le Cancer, Ligue Nationale contre le Cancer, and Institut National du Cancer.

Tiphaine Mannic was a recipient from Arthritis Courtin Foundation

REFERENCES

1. Lopes S, VandenBerg R, Scheithauer W. The World Health Organization classification of nervous system tumors in experimental neuro-oncology. 1993. In A.J. Levine and H.H. Schmidek, eds. Molecular Genetics of Nervous System Tumors Wiley-Liss, New York, 1-36.
2. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. N Engl J Med. 2005;352 (10):987-96.
3. Bauman G, Pahapill P, Macdonald D, et al. Low grade glioma: a measuring radiographic response to radiotherapy. Can J Neurol Sci. 1999;26(1):18-22.
4. Maderna E, Salmaggi A, Calatozzolo C, et al. Nestin, PDGFRbeta, CXCL12 and VEGF in Glioma Patients: Different Profiles of (Pro-Angiogenic) Molecule Expression Are Related with Tumor Grade and May Provide Prognostic Information. Cancer Biol Ther. 2007;6(7).
5. Jain RK, di Tomaso E, Duda DG, et al. Angiogenesis in brain tumours. Nat Rev Neurosci. 2007;8:610-22.
6. Wallez Y, Huber P. Endothelial adherens and tight junctions in vascular homeostasis, inflammation and angiogenesis. Biochim Biophys Acta. 2008;1778(3):794-809.
7. Gory S, Vernet M, Laurent M, et al. The vascular endothelial-cadherin promoter directs endothelial-specific expression in transgenic mice. Blood. 1999; 93(1):184-92.
8. Vittet D, Buchou T, Schweitzer A, et al. Targeted null-mutation in the vascular endothelial-cadherin gene impairs the organization of vascular-like structures in embryoid bodies. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997;94(12):6273-8.
9. Legrand P, Bibert S, Jaquinod M, et al. Self-assembly of the vascular endothelial cadherin ectodomain in a Ca2+-dependent hexameric structure. J Biol Chem. 2001; 276(5):3581-8.
10. Bibert S, Ayari H, Riveline D, et al. Establishment of cell-cell junctions depends on the oligomeric states of VE-cadherin. J Biochem. 2008;143(6):821-832.
11. Hewat E, Durmort C, Jacquamet L, et al. Architecture of the VE-cadherin hexamer. J Mol Biol. 2007;365(3):744-51.
12. Wright T, Leach L, Shaw P, et al. Dynamics of vascular endothelial-cadherin and beta-catenin localization by vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis in human umbilical vein cells. Exp Cell Res. 2002; 280(2):159-68.

13. Hudry-Clergeon H, Stengel D, Ninio E, et al. Platelet-activating factor increases VE-cadherin tyrosine phosphorylation in mouse endothelial cells and its association with the PtdIns3'-kinase. FASEB J 2005; 6, 512-20.
14. Lambeng N, Wallez Y, Rampon C, et al.Vascular endothelial-cadherin tyrosine phosphorylation in angiogenic and quiescent adult tissues. Circ Res 2005; 96(3):384-91.
15. Wallez Y, Cand F, Cruzalegui F, et al. Src kinase phosphorylates vascular endothelial-cadherin in response to vascular endothelial growth factor: identification of tyrosine 685 as the unique target site. Oncogene 2007; 26 (7):1067-77.
16. Potter MD, Barbero S, Cheresh DA. Tyrosine phosphorylation of VE-cadherin prevents binding of p120- and beta-catenin and maintains the cellular mesenchymal state. J Biol Chem. 2005; 280(36):31906-12.
17. Baumeister U, Funke R, Ebnet K, et al. Association of Csk to VE-cadherin and inhibition of cell proliferation. EMBO J. 2005 May 4;24(9):1686-95.
18. Herren B, Levkau B, Raines EW, et al . Cleavage of beta-catenin and plakoglobin and shedding of VE-cadherin during endothelial apoptosis: evidence for a role for caspases and metalloproteinases. Mol Biol Cell. 1998;9(6):1589-601.
19. Hermant B, Bibert S, Concord E, et al. Identification of proteases involved in the proteolysis of vascular endothelium cadherin during neutrophil transmigration. J Biol Chem. 2003; 278:14002-12.
20. Baluk, P., Hashizume, H., and McDonald, D. M. Cellular abnormalities of blood vessels as targets in cancer. Curr Opin Genet Dev, *15:* 102-111, 2005.
21. Faury G, Garnier S, Weiss AS, et al. Action of tropoelastin and synthetic elastin sequences on vascular tone and on free Ca2+ level in human vascular endothelial cells. Circ Res. 1998; 82:328-36.
22. Garcia-Parra M, Mejiade, Gardia M et al. A new method for lipoprotein isolation by precipitation. 1977, In, "Protides of Biological Fluids." Proceedings of 25th Colloquium Brugge, Editor: H. Peeters, Pergamon Press, New York, 411-415.
23. Corada, M, Liao F, Lindgren M, et al. Monoclonal antibodies directed to different regions of vascular endothelial cadherin extracellular domain affect adhesion and clustering of the protein and modulate endothelial permeability. Blood, 2001; 97(6):1679-84.
24. Havel R, Eder H, Bragden J. Distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. J. Clin. Invest. 1955; 34: 1345-53.
25. Noble P. Electrophoretic separation of plasma lipoproteins on agarose gel. J. Lipid Res.1955; 9: 693-700.

26. Jouanneau E. Angiogenesis and gliomas: current issues and development of surrogate markers Neurosurgery. 2008 ; 62(1):31-50.
27. Titulaer K, Mustafa A, Siccama I, et al. A software application for comparing large numbers of high resolution MALDI-FTICR MS spectra demonstrated by searching candidate biomarkers for glioma blood vessel formation. BMC Bioinformatics. 2008;9:133.
28. Hormigo A, Gu B, Karimi S, et al. YKL-40 and matrix metalloproteinase-9 as potential serum biomarkers for patients with high-grade gliomas. Clin Cancer Res. 2006;12(19):5698-704.
29. Fukuda ME, Iwadate Y, Machida T, et al. Cathepsin D is a potential serum marker for poor prognosis in glioma patients. Cancer Res. 2005;65(12):5190-4.
30. Jung CS, Foerch C, Schänzer A,et al. Serum GFAP is a diagnostic marker for glioblastoma multiforme. Brain. 2007;130:3336-41.
31. Brommeland T, Rosengren L, Fridlund S, et al. Serum levels of glial fibrillary acidic protein correlate to tumour volume of high-grade gliomas. Acta Neurol Scand. 2007;116(6):380-4.
32. Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, et al. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. N Engl J Med 2005; 352:997–100336.
33. Jain RK. Lessons from multidisciplinary translational trials on anti-angiogenic therapy of cancer. Nat Rev Cancer. 2008 8(4):309-16.
34. Bertolini F, Mancuso P, Shaked Y, Kerbel RS. Molecular and cellular biomarkers for angiogenesis in clinical oncology. Drug Discov Today. 2007;12(19-20):806-12.

LEGENDS FOR FIGURES

Figure 1 : Soluble VE-cadherin is carried by lipoproteins

A. VE-cadherin detection using BV9 antibody: Left panel: Confluent cells were fixed in acetone, and incubated with a VE-cadherin primary antibody, and then visualised with a cyanin-3 coupled anti-mouse secondary antibody. Right panel: HUVECs extracts analyzed by SDS-PAGE and westernblotting with the anti-VE-cadherin mAb (BV9). The arrow on the right indicates the migration of the VE-cadherin whole protein and its extracellular domain.

B. Effet of detergent on the detection of sVE-cadherin in human serum from glioma patients. Left panel: serial dilution of serum samples in PBS buffer without surfactant (from 1:50 to 1:500) –Right panel: serial dilution of serum samples in 0.5% Triton X-100-containing PBS buffer. SDS-PAGE and immunoblotting with VE-cadherin mAb (BV9). The arrow on the right indicates the migration of the VE-cadherin extracellular domain. The molecular weight markers are indicated on the left.

C. 400 ml of serum were ultracentrifuged (105,000g) for 60 min at 4°C. After serum ultra centrifugation, the lipids at the top of the tube the sample (visibles) and the pellet (not visible) were resuspended in 40 ml of PBS containing 0.5%Triton X-100. A 5ml aliquot of each fraction was diluted serially 1to 50 in PBS with 0.5%Triton. The serum (S) prior to centrifugation was loaded on the left lane (dilution 1:500 in PBS with 0.5%Triton X-100). SDS-PAGE and immunoblot analysis of the fractions with the VE-cadherin mAb (BV9)(0.2 mg/ml). The arrow on the right indicates the migration of the VE-cadherin extracellular domain .

D. Analysis of lipoproteins : Lipoproteins were prepared by precipitation according to[28]. After centrifugation, the pellet was diluted in PBS with 0.5% Triton X-100 and analyzed by SDS-PAGE and westernblotting. Coomassie staining of 5ml of lipoproteins diluted 1 to 50 and 1to 25 in in PBS with 0.5% Triton is shown on the left panel . Immunoblot analysis of the same fractions with the VE-cadherin mAb (BV9)(0.2 mg/ml) is shown on the right panel.The arrow on the right indicates the migration of the VE-cadherin extracellular domain .

E. Serum and lipoprotein-depleted serum analysis: Coomassie staining of 5ml of whole serum diluted 1to 500 (S) in PBS with (+) or without (-) Triton. Coomassie staining of 5ml of the same serum without lipoproteins (S-Lipo) diluted 1to 200 in PBS with (+) or without (-) Triton. The molecular weight markers are indicated on the left. Immunoblot analysis of the same fractions with the VE-cadherin mAb (BV9)(0.2 mg/ml) is shown on the right panel.

F. Glioma patient sera collected before any therapy were retrospectively classified in two clinical groups: patients responders and non-responders to chemotherapy. Glioma patient sera were serially (1 to 200) in PBS with 0.5% Triton as described in Figure 1B, and analyzed by SDS PAGE and westernblotting using VE-cadherin mAb (BV9) or polyclonal CAD3 antibody. The arrow on the left indicates the migration of the VE-cadherin extracellular domain. Coomassie staining of serum samples was used as a control of gel loading. The molecular weight markers are indicated on the left. The arrow on the left indicates the migration of the human serum albumin.

Figure 2: Soluble VE-cadherin serum level discriminate responders and non-responders glioma patients

A. Effect of detergent on sandwich ELISA using the recombinant human CAD 1-4 fragment: the ELISA was performed as described in Methods. The standard CAD 1-4 curve was obtained with serial dilutions of the fragment in buffer A Tris 50 mM, HCl pH 8, 100 mM NaCl, 5 mM CaCl2, 0.1% BSA containing either 0.005, or 0.01, or 0.5% % Triton X100. The absorbance values of each well were measured at 405 nm using an automated microplate reader

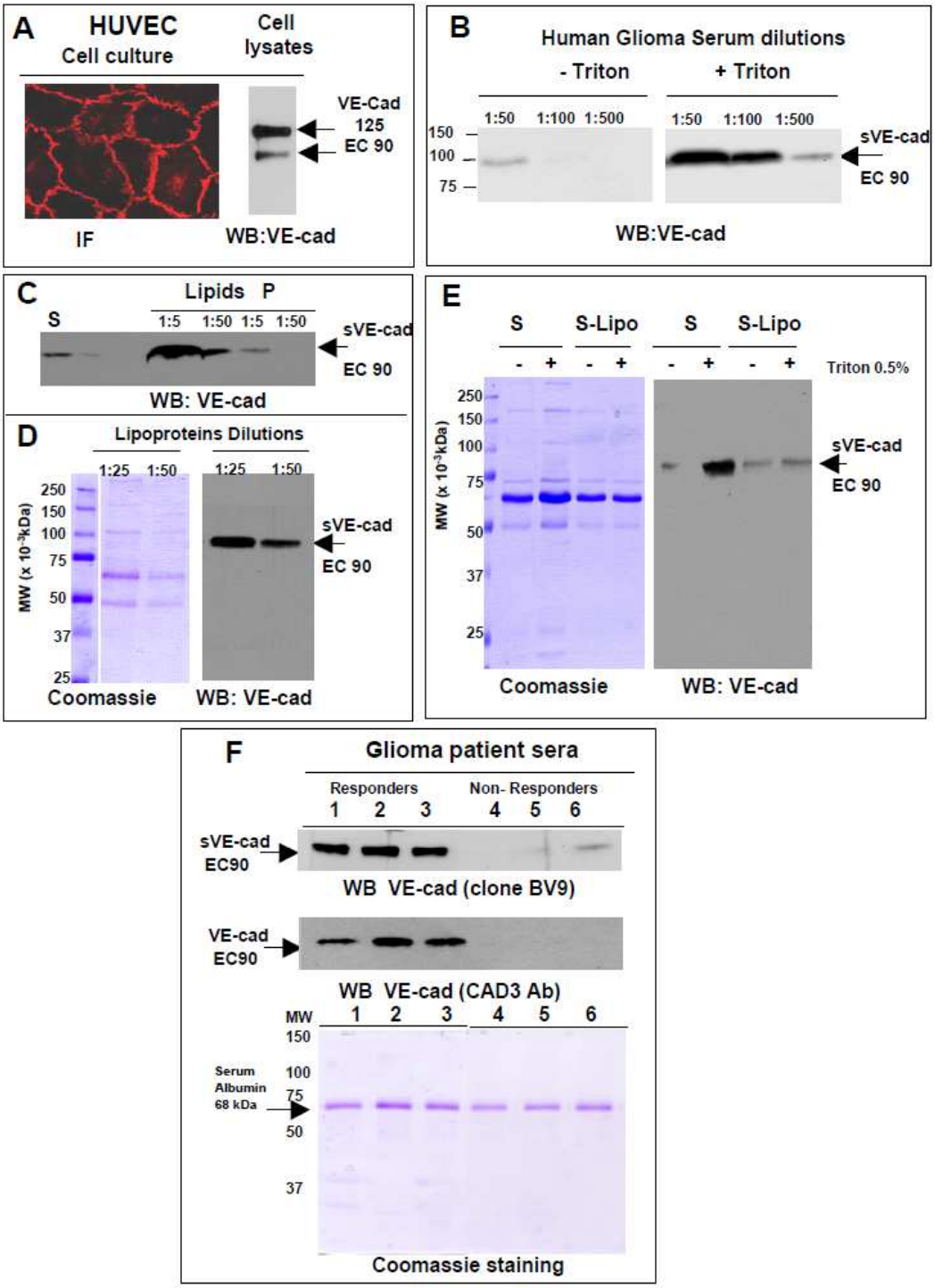
B: Linear response curves from VE-cadherin ELISA on serum glioma patient diluted in PBS with 0.5% % Triton X100. The assay was performed in triplicate on each dilution and the results are expressed as the means ± SD of optical densities at 405 nm

C: Comparison of western blot analysis of VE-cadherin and ELISA on glioma patient serum: three responders and non-responders patients serum were diluted 1 to 100 in PBS with 0.5% Triton-X100 and assayed with VE-cadherin ELISA and analyzed by SDS-PAGE and westernblotting with BV9 Ab. The triplicate ELISA values for each patient were average ±Sd.

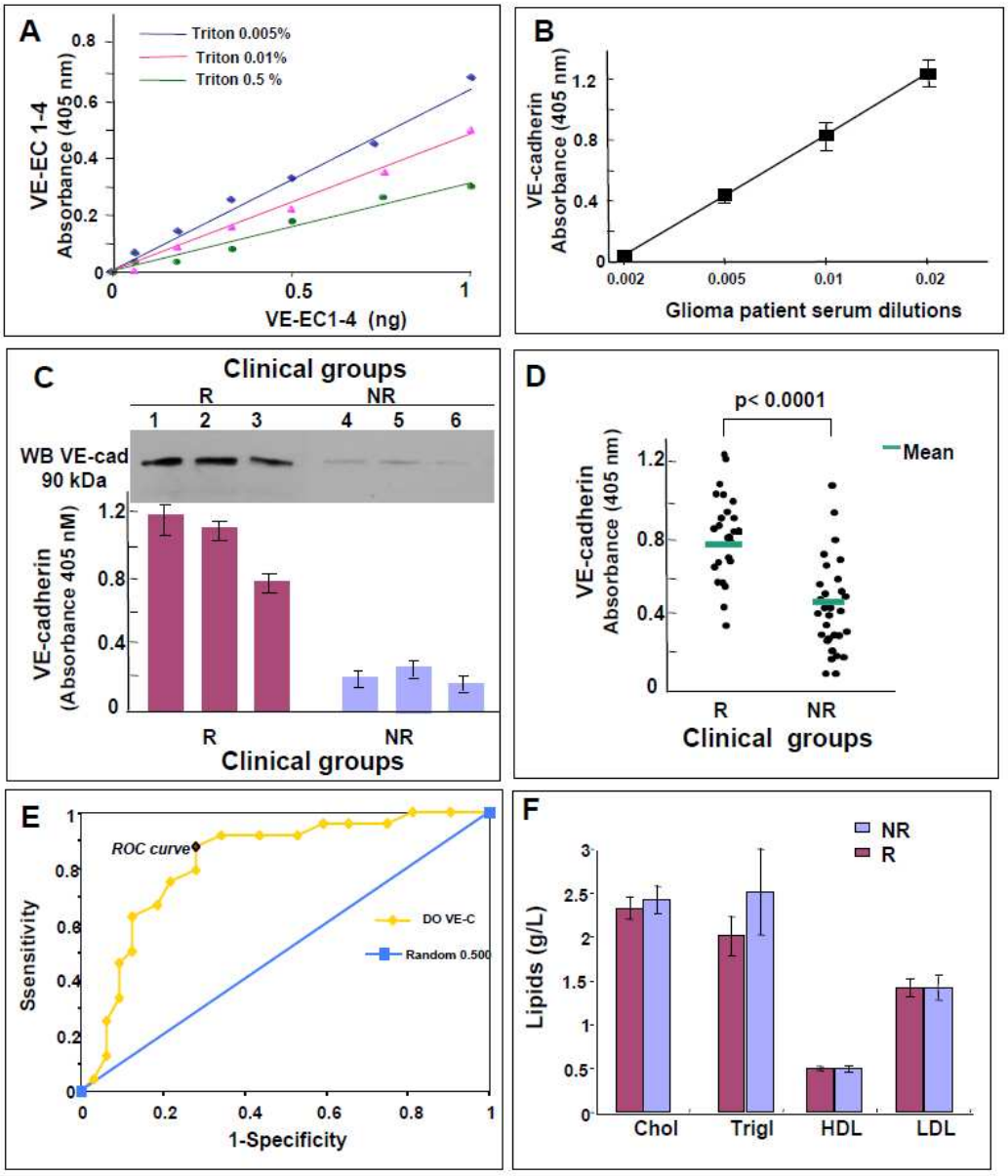
D: ELISA analysis of sera from 58 glioma patients from responders (R) and non responders (NR) groups were assayed for with VE-cadherin ELISA after dilution 1 to 100 in PBS with 0.5% Triton X100. The symbols are the means of the triplicate ELISA values for each aliquot (left= responders, right = non responders). Different symbols represent different patient. Horizontal bars indicate median values. There was a significant difference in the seroreactivity to VE-cadherin between responders and non responders glioma patients (P<0.001 unpaired t-test) Statistical analysis were performed using Mann-Whitney test.

E : Receiver Operating Characteristic (ROC) curve analysis of VE-cadherin in glioma showing the ability of serum VE-cadherin to differentiate responders from non responders patients. AUC, area under curve=0.837 (p=0.0024)

F: The serum concentrations of cholesterol, HDL-cholesterol and triglycerides were assayed on a Roche/Hitachi Modular P analyzer with commercial enzymatic tests from Roche Diagnostics according to the manufacturer's specifications. LDL-cholesterol was calculated using the Friedwald formula: {total cholesterol} - {HDL cholesterol} - 1/5 (triglycerides). The serum lipid profile, is illustrated for the two groups of glioma patients , responders R and non-responders (NR).



Cand . Figure 1



Cand . Figure 2

III.3. Discussion

Dans les tissus normaux, la balance entre les agents pro et anti-angiogeniques maintient parfaitement l'architecture et l'homéostasie de l'endothélium. Dans les glioblastomes, l'angiogenèse est très active dans les tumeurs les plus agressives. Le traitement standard repose sur une exérèse chirurgicale complète si possible, suivie d'une radiothérapie et d'une chimiothérapie au Temozolomide. Cependant, malgré le traitement la médiane de survie est de l'ordre de 15 mois. Ces tumeurs malignes caractérisées par leur potentiel infiltrant et leur résistance aux chimiothérapies actuelles, présentent en effet un fort taux de récidives locales. La détection de la réponse ou non du patient avant le traitement serait une aide énorme pour le clinicien dans son approche thérapeutique. En effet, de nouvelles thérapies dites ciblées sont apparues depuis quelques années basées sur une meilleure compréhension des mécanismes de l'oncogenèse et de l'angiogenèse. Par ailleurs, à part l'imagerie cérébrale, il n'existe pas pour les gliomes de marqueurs sériques faciles à doser sur prélèvement sanguin pour suivre l'évolution de la pathologie. De ce fait, trouver des biomarqueurs de prédiction de la réponse ou de suivi de la maladie est un enjeu énorme dans les gliomes. Ainsi, de nombreuses recherches de biomarqueurs ont été réalisées, utilisant diverses techniques.

Les agents de chimiothérapie conduisent à une alkylation de l'ADN, en position O^6 de la guanine. Cette alkylation est une lésion chimique de l'ADN souvent désignée par l'expression « adduit d'alkylation ». Cette modification de l'ADN aboutit à la mort cellulaire. Dans le traitement des glioblastomes multiformes et d'astrocytomes anaplasiques le témozolomide (TEMODAL®), est transformé dans l'organisme en ion méthyldiazonium qui a la capacité de méthyler l'ADN. Comme pour la plupart des agents anticancéreux, des mécanismes de résistance ont été identifiés parmi lesquels celui passant par l'enzyme MGMT (O^6-Méthyl-Guanine-Méthyl-Transférase), enzyme suicide qui va transférer le groupement Méthyl de l'ADN vers sa propre structure. La MGMT est ensuite dirigée vers le protéasome pour être dégradée. Pour ces raisons, les tumeurs exprimant fortement une MGMT fonctionnelle sont moins sensibles aux traitements par l'agent alkylant. En explorant avant le traitement le statut MGMT du patient, les cliniciens pourraient adapter la posologie et/ou le médicament administré (**Hegi, 2005**). Bien que fort prometteur, ce marqueur épigénétique nécessite d'être adapté à des applications cliniques de routine.

D'autres études récentes ont proposé la détection de certaines protéases comme la protéase MMP9 (Matrix MetalloProtease 9) et la cathepsine D, mais de la protéine GFAP qui pour le

diagnostic, le pronostic ou même l'évaluation de la réponse à un traitement (**Hormigo, 2006, Fukuda, 2005 et Jung, 2007**). Ces marqueurs sont actuellement en cours de validation.
Dans ce contexte, bien que non investiguée encore en oncologie biologique, nous avons analysé la VE-cadhérine dans les gliomes en émettant l'hypothèse qu'elle pourrait être un marqueur potentiel d'une angiogenèse à distance. Les glioblastomes répondant aux critères de tumeurs hyperangiogéniques, et la VE-cadhérine étant exclusivement endothéliale, cette protéine paraissait pertinente à étudier.

Nous montrons pour la première fois la présence de la VE-cadhérine dans le sérum des patients atteints de glioblastomes. C'est le domaine extracellulaire de la protéine qui est détecté de 90 kDa. L'analyse du sérum a d'abord été réalisée par électrophorèse et westernblot, ce qui a permis de déterminer la taille de la protéine et d'observer la présence dans tous les sérums des patients d'une seule forme tronquée. Du fait de son poids moléculaire, cette protéine n'aurait pas pu être détectée par les techniques de protéomique classiques. De plus, nous montrons que la détectabilité de la protéine est favorisée par la dilution de sérum en présence de détergent, rarement utilisé en protéomique. Ceci est expliqué par le fait que nous avons trouvé que la protéine est essentiellement vehiculée par les lipoprotéines humaines contenues dans le sérum. Cette donnée est relativement nouvelle car il peut paraître surprenant de voir une glycoprotéine associée à des entités lipidiques. Cependant du fait de leur abondance dans le sérum, un effet de masquage est peut-être simplement la raison. Cette observation nous a permis d'éclairer un nouveau mode de détection optimisé des protéines solubles et plus particulièrement des protéines relatives à l'angiogenèse dans le sérum, en les dissociant des lipides. A partir de cette constatation, nous avons émis l'hypothèse que les lipoprotéines pourraient constituer un nouveau compartiment pour des biomarqueurs qui ne sont habituellement pas détectable par les techniques courantes de protéomiques.
Dans notre étude, nous montrons que le dosage de la VE-cadhérine pourrait être un paramètre predictif de la détection des patients qui seront répondeurs ou non à la chimiothérapie (Temodal dans cette étude). Cette distinction n'a pas été révélée en utilisant le kit ELISA commercial (Bender), ce qui peut s'expliquer par la différence d'extraction et de traitement de l'échantillon. En effet, le kit commercial ne permet pas l'exploitation du compartiment lipidique, le tampon utilisé ne contenant pas de détergent. D'autre part, le kit ne permettait pas d'identifier la taille de la ou des proteines VE-cadhérines circulantes. Il est connu que la protéine est susceptible à la protéolyse sous l'action de protéases comme l'élastase, la cathepsine G dans des cellules en culture **(Herren, 1998, Luplertlop, 2006, Hermant, 2003,**

Xia, 2003). Les leucocytes et les cellules tumorales peuvent ainsi sécréter de grandes quantités de ces enzymes, ce qui pourrait induire le clivage de la VE-cadhérine et participer à l'extravasation cellulaire. De même, il a été montré que au cours du passage de cellules T à travers une monocouche endothéliale ou par stimulation avec la thrombine, des enzymes de la famille des ADAM (A Disintegrin And Metalloprotéase) (ADAM-10 -10), sont capables de cliver la VE-cadhérine (**Schulz, 2008**). Les proteases impliquées ainsi que le site de coupure de la protéine dans les gliomes restent à être identifiés. La diminution du taux circulant de VE-cadhérine chez les non-répondeurs est peut être la resultante d'une hypersecretion de protéases dans ces tumeurs ou l'angiogenèse est très active. Des expériences futures seront nécessaires pour étayer cette hypothèse.

Le dosage de la VE-cadhérine pourrait être ainsi un test non invasif de détection de la réponse à la chimiothérapie en cancérologie. Cette étude rétrospective devra être complétée par d'autres travaux afin d'étendre ces résultats à différentes cohortes de patients pour une validation prospective. Des études dans le cancer du sein, du rein et colo-rectal sont en cours en collaboration avec le Centre Leon-Bérard (Lyon).

DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSIONS

Les cellules endothéliales forment la principale barrière permettant le passage sélectif, du sang aux tissus, de certaines molécules et de certaines cellules. Cette perméabilité très sélective est due, en grande partie, à une régulation forte des jonctions intercellulaires complexes (serrés ou adhérentes), établies entre les cellules endothéliales, grâce à des molécules d'adhérence. La VE-cadhérine est la glycoprotéine transmembranaire responsable des jonctions adhérentes homotypiques des cellules de l'endothélium vasculaire via des interactions homophiliques. Elle assure l'intégrité de l'endothélium vasculaire. Au cours de certains processus physiologiques comme l'angiogénèse normale, l'inflammation ou dans certaines pathologies comme le cancer, la VE-cadhérine se trouve phosphorylée dans sa partie cytoplasmique et son domaine extracellulaire peut être clivé. Les études réalisées au cours de cette thèse ont mis en avant la complexité de la signalisation endothéliale *via* la VE-cadhérine au cours de mécanismes de cancérisation et d'inflammation.

I. PHOSPHORYLATION SUR TYROSINE DE LA VE-CADHERINE DANS L'INFLAMMATION ET LE CANCER

La phosphorylation du domaine cytoplasmique est une des modifications covalentes très étudiées dans la physiopathologie de la VE-cadhérine. Les sites tyrosines Y658, Y685, Y731 ont été démontrés phosphorylables et modifiant les propriétés adhésives de la protéine conduisant à une rupture de la jonction endothéliale. Selon le site de phosphorylation, différents types de protéines peuvent s'associer ou se dissocier de la VE-cadhérine. C'est le cas de Csk (C-terminal src kinase) qui s'associe par son domaine SH2 à la VE-cadhérine phosphorylée sur Y685. Des exemples de dissociation sont celles de p120 et de la β-caténine quand la VE-cadhérine est phosphorylée respectivement sur Y658 et Y731 Toutes ces modifications conduisent spécifiquement au déclenchement ou à la poursuite d'une voie de signalisation donnée, ce qui peut avoir pour conséquence l'internalisation, la dégradation ou au contraire l'expression de la VE-cadhérine, la prolifération, la migration cellulaire.

Ces phosphorylations ont été montrées in vivo dans l'angiogénèse normale et et in vitro en réponse à des agents inflammatoires et le VEGF **(Esser, 1998, Kevil, 1998, Nwariaku, 2002, Andriopoulou, 1999).**

Il a été montré au laboratoire, l'existence de la phosphorylation sur tyrosine de la VE-cadhérine *in vivo* au cours de l'angiogenèse physiologique lors de la stimulation ovarienne (Lambeng, 2005). Dans ce travail de thèse, j'ai pu montré que la phosphorylation de la VE-cadhérine est aussi un événement qui se produit dans des tissus tumoraux dans des modèles

animaux de tumeurs, des hépatocarcinomes de souris et des tumeurs cérébrales de rat où le remodelage vasculaire est important. Ces données montrent qu'au cours de modifications physiopathologiques de l'endothélium vasculaire, la modification covalente de la VE-cadherine est un événement dont il faut décrypter les mécanismes à des fins de ciblage thérapeutique potentiel. Le site essentiellement détecté dans ces modèles est la tyrosine Y658, qui n'implique pas la tyrosine kinase Src dont nous avons préalablement montré qu'elle éatit responsable de la phosphorylation du site Y685 dans la voie VEGF (Wallez, 2007).

L'un des médiateurs importants de l'inflammation, abondamment exprimé et sécrété par les cellules immunitaires est le TNF-α qui induit la perméabilité endothéliale et la phosphorylation de la VE-cadhérine. J'ai montré par des expériences de stimulation des cellules humaines de veine ombilicale (HUVEC) avec TNF-α, que cette phosphorylation était sur le site Y658 de la VE-cadhérine. J'ai pu identifier la kinase responsable de cette phosphorylation qui est une kinase dont l'invalidation génique donne un phénotype endothélial (Syk). De plus, elle est activée par le TNF-α dans les cellules endothéliales. La détection du site Y658 avec des anticorps antiphosphosite a été confortée par les résultats de phosphorylation de peptides, contenant les différentes tyrosines phosphorylables de la VE-cadhérine par Syk active. Le peptide contenant la tyrosine Y658 est le seul a être phosphorylé par Syk. Il en a été de même avec le domaine cytoplasmique de la VE-cadhérine démontrant une phopshorylation directe par Syk sur le site Y658, et sa non-phosphorylation lorsqu'il est muté Y658F. Des expériences par siRNA montrent qu'une diminution de l'expression de Syk conduit à une forte diminution de la phosphorylation sur le siteY658 de la VE-cadhérine en réponse au TNFα sans affecter la phosphorylation de la tyrosine Y685 en réponse au VEGF. Ces résultats sont à rapprocher des du rôle biologique de la tyrosine kinase Syk dans l'endothélium montré par invalidation génique. Le phénotype léthal dû à un défaut de morphogenèse vasculaire et de maintien de l'intégrité vasculaire, est peut etre en lien avec la modulation des fonctions adhésives de la VE-cadhérine par phosphorylation. Ces données epérimentales apportent un faisceau d'arguments suggérant une cascade de phosphorylation qui pourrait enchainer les étapes suivantes TNF/Syk/VE-cadY658. Il se trouve que des inhibiteurs de Syk sont déjà utilisés en thérapie mais l'impact sur la VE-cadhérine n'est pas encore connu. Il serait intéressant dans la suite de cette étude, de pouvoir traiter nos modèles murins avec ces inhibiteurs et d'analyser la statut de phosphorylation de la VE-cadhérine, de même que de réaliser des test in vivo de perméabilité vasculaires avant et après traitement.

Au plan cellulaire, depuis la commercialisation des anticorps antiphosphosites de la VE-cadherine, plusieurs études récentes ont identifié des sites de phosphorylation de la VE-

cadhérine dans divers mécanismes. En particulier, dans la transmigration leucocytaire, les sites Y658 et Y731 ont été identifiés et attribués à l'activité des tyrosine kinases de Src ou Pyk 2 (Allingham, 2007). C'est par l'utilisation d'inhibiteurs de ces tyrosine kinases que les auteurs concluent à l'implication de la kinase Src dans la phosphorylation du site Y658 et la tyrosine kinase Pyk2 pour le site Y731. Ces données sont en contradiction avec les données du laboratoire montrant que Src phosphoryle que le site Y685, mais les études pharmacologiques sur cellules entières ne permettent pas d'exclure l'existence d'une kinase en aval de Src et activée par celle-ci.

Une autre étude montre la phosphorylation sur sérine (S665) de la VE-cadhérine en réponse à VEGF, un événement qui précède l'internalisation de la VE-cadhérine par recrutement de la β-arrestine (Gavard, 2006). Ici, les auteurs proposent un modèle dans lequel le VEGF contrôle la voie de signalisation Src/Vav2/Rac/PAK. Il est possible que des kinases relai soient impliquées dans ces cascades et ceci illustre la complexité des mécanismes de phosphorylations qui régulent les propriétés adhésives de la VE-cadhérine.

Dans le futur, des études plus approfondies devront permettre de faire la lumiére sur les mécanismes moléculaires régissant la phosphorylation de la VE-cadhérine.

II. INHIBITEURS POTENTIELS DE LA PHOSPHORYLATION SUR TYROSINE DE LA VE-CADHERINE

La mise en évidence de la phosphorylation de la VE-cadhérine en pathologie nous a conduits à étudier des molécules d'intêrêt dont les effets pourraient restaurer un endothélium agressé ou en remodelage. Notre étude a permis de démontrer que des molécules agissant en inhibant certaines tyrosine kinases (tels que le Sorafenib, ou des dérivés de la génistéine), ou en interférant dans les processus d'angiogenèse, comme l'angiostatine, sont des inhibiteurs potentiels de la phosphorylation sur tyrosine de la VE-cadhérine.

Le Sorafenib (NEXAVAR®) est un inhibiteur de plusieurs kinases, administré à des stades très avancés de certains cancers. Ce composé administré aux modèles de tumeurs cérébrales chez le rat diminue la croissance tumorale en 7 jours. De plus, il agit sur plusieurs voies de signalisation simultanément notamment certaines activées par le TNF-α, donc il était intéressant de tester l'effet de cette molécule sur la phosphorylation de la VE-cadhérine induite par le TNF-α. Ainsi, j'ai montré que le Sorafenib est capable d'inhiber la phosphorylation de la VE-cadhérine et de limiter son clivage dans des cellules endothéliales stimulées par le TNF-α. Par contre le Sorafenib n'a pas d'effet inhibiteur sur la tyrosine

kinase Syk qui phosphoryle la VE-cadhérine sur le site Y658 (A Sidibé, Master 2). Ces résultats nous permettent de conclure que l'inhibition observée sur les cellules stimulées par le TNF-α n'est pas due à une inhibition de la tyrosine kinase Syk. Donc l'effet cellulaire sur le clivage et la phopshorylation de la VE-cadhérine suggère qu'une autre tyrosine kinase en amont de Syk peut etre impliquée dans ce processus. La PK-C a été rapportée comme étant activatrice de Syk. Il resterait à démontrer par une étude pharmacologique et de siRNA, une cascade impliquant TNF-α/PK-C/Syk/ VE-cadherine Y658/ clivage. Cependant, cela n' écarte pas l'hypothèse de regulation par phosphorylation de la protéase clivant la VE-cadhérine.

Le sous produit de synthèse des flavonoides (composé B) s'est révélé inhibiteur de l'autophosphorylation de Src et de la phosphorylation du site Y685 de la VE-cadhérine en réponse à VEGF. Ce composé semble présenter un potentiel intéressant, cependant ses conditions de solubilisation restent à être optimisées pour une meilleure entrée dans la cellules.

Les molécules testées ayant des effets déjà établis sur certaines activités enzymatiques, il serait souhaitable de pouvoir trouver l'inhibiteur spécifique de la VE-cadhérine. Ainsi l'utilisation des peptides mimétiques restent une idée intéressante où il est cependant nécessaire de pouvoir développer un moyen de faciliter l'entrée de ces composés dans la cellule. Des procédés de vectorisation de peptides sont déjà connus, ils seraient donc potentiellement applicables à la VE-cadhérine. Cette approche pourrait aboutir également à l'obtention d'un peptide minimal qui serait encore substrat de Src et qui pourrait être plus facile d'utilisation.

Les inhibiteurs de la phosphorylation de la VE-cadhérine sur tyrosine sont donc non seulement des outils pour une étude in vivo mais aussi in vitro pour élucider l'importance de cette phosphorylation dans le clivage de de la VE-cadhérine. Au total, ces inhibiteurs pourraient, après optimisation, permettre de participer à la normalisation de la vasculature tumorale, ou à la reduction de la perméabilité endothéliale dans le cancer et l'inflammation respectivement.

III. LA VE-CADHERINE : BIOMARQUEUR DANS LE CANCER ET L'INFLAMMATION

Dans ce travail, nous montrons pour la première fois, que la VE-cadhérine est présente dans le sérum de patients atteints de glioblastomes et que sa détectabilité est augmentée par la dilution du sérum en presence de détergents, car elle est véhiculée par les lipoprotéines.

La recherche de biomarqueurs en cancérologie a fait l'objet de nombreuses études depuis plus de 30 ans avec des techniques qui se sont de plus en plus sophistiquées pour en arriver à la spectrométrie masse. La haute technicité des méthodes actuelles n'a pas permis l'identification claire de nouveaux marqueurs du fait de la complexité de la composition du plasma et du sérum. Peut être que la détection des protéines solubles associées au compartiment lipidique sanguins permettra l'emergence de nouvelles signatures protéomiques en cancérologie.

Le dosage de la VE-cadhérine dans le contexte du gliome pourrait prédire la réponse au traitement de chimiothérapie. Cet aspect clinique semble intéresssant pour le praticien qui pourrait orienter sa thérapie. D'un point de vue plus fondamental, les mécanismes de clivage dans ce type de cancer restent à être élucidés et pourraient orienter vers d'autres cibles thérapeutiques.

La détection de la VE-cadhérine sérique dans les gliomes nous a interpelés car cette protéine a en fait été très peu souvent dosée. Des publications rapportant son utilisation en tant que biomarqueur sont vraiment très peu nombreuses et nous nous sommes demandés si elle pouvait aussi être détectable dans des pathologies inflammatoires où l'endothélium vasculaire est modifié comme dans l'angiodème à Bradykinine. Cette pathologie bien que rare, se manisfeste par des oedèmes locaux qui peuvent être très graves si laryngés. Contrairement au gliome, dans l'angiodème l'activation d'une cascade de protéases est bien connue et nous avons apporté des évidences qui suggèrent que la VE-cadhérine est un substrat de l'une d'entre elles : la kallikreine. Les taux de VE-cadhérine varie chez un même patient en crise et hors crise. De futures études nécessiteront l'optimisation du dosage et la détermination de valeur seuil dans chaque pathologie en association avec d'autres marqueurs sériques.

Au plan fondamental, on peut aussi se poser la question de l'impact de ces molécules de VE-cadhérines tronquées et circulantes sur l'endothelium vasculaire. Il pourrait être envisagé de purifier de la VE-cadhérine de serum de patient en crise et de tester son effet sur monocouche

de cellules endothéliales en cultures. Par imagerie, l'intégrité du tapis cellulaire pourrait être examiné, de même que des mesures dee permerabililté pourraient etre réalisées.

En conclusion, les travaux de cette thèse ont permis de mettre en évidence des modifications structurales de la VE-cadhérine (phosphorylation et clivage) dans l'inflammation et de l'angiogenèse tumorale. Beaucoup de travaux rapportés dans la littérature concernant la VE-cadhérine sont des études en culture cellulaire ou chez la souris, et peu de données ont été trouvées concernant la physiopathologie de l'endothélium. Nos approches biochimiques ont essayé de decrypter des voies de signalisation potentielles aboutissant à ces modifications de la VE-cadherine, avec un lien avec des pathologies où la cellule endothéliale subit des remodelage suite à l'action de médiateurs cellulaires spécifiques. Il apparaît donc important dans un futur proche que des outils technologiques puisse être développés concernant ces formes modifiées de la VE-cadherine pour que des applications à visée diagnostic et de suivi thérapeutique soient transférables en clinique.

BIBLIOGRAPHIE

Adams, R. H., Wilkinson, G. A., Weiss, C., Diella, F., Gale, N. W., Deutsch, U., Risau, W. and Klein, R. (1999). Roles of ephrinB ligands and EphB receptors in cardiovascular development: demarcation of arterial/venous domains, vascular morphogenesis, and sprouting angiogenesis. *Genes & Development* **13**, 295-306.

Adamson, P., Wilbourn, B., Etienne-Manneville, S., Calder, V., Beraud, E., Milligan, G., Couraud, P. O. and Greenwood, J. (2002). Lymphocyte trafficking through the blood-brain barrier is dependent on endothelial cell heterotrimeric G-protein signaling. *FASEB J* **16**, 1185-94.

Aggarwal, B. B., Aiyer, R. A., Pennica, D., Gray, P. W. and Goeddel, D. V. (1987). Human tumour necrosis factors: structure and receptor interactions. *Ciba Found Symp* **131**, 39-51.

Aird, W. C. (2007). Phenotypic heterogeneity of the endothelium: II. Representative vascular beds. *Circ Res* **100**, 174-90

Aird, W. C. (2007). Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms. *Circ Res* **100**, 158-73.

Ali, N., Yoshizumi, M., Fujita, Y., Izawa, Y., Kanematsu, Y., Ishizawa, K., Tsuchiya, K., Yano, S., Sone, S. and Tamaki, T. (2005). A novel Src kinase inhibitor, M475271, inhibits VEGF-induced human umbilical vein endothelial cell proliferation and migration. *J Pharmacol Sci* **98**, 130-41.

Allingham, M. J., van Buul, J. D. and Burridge, K. (2007). ICAM-1-mediated, Src- and Pyk2-dependent vascular endothelial cadherin tyrosine phosphorylation is required for leukocyte transendothelial migration. *J Immunol* **179**, 4053-64.

Anastasiadis, P. Z. and Reynolds, A. B. (2001). Regulation of Rho GTPases by p120-catenin. *Curr Opin Cell Biol* **13**, 604-10.

Andreeva, A. Y., Krause, E., Muller, E. C., Blasig, I. E. and Utepbergenov, D. I. (2001). Protein kinase C regulates the phosphorylation and cellular localization of occludin. *The Journal of biological chemistry* **276**, 38480-6.

Andriopoulou, P., Navarro, P., Zanetti, A., Lampugnani, M. G. and Dejana, E. (1999). Histamine induces tyrosine phosphorylation of endothelial cell-to-cell adherens junctions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **19**, 2286-97.

Angelini, D. J., Hyun, S. W., Grigoryev, D. N., Garg, P., Gong, P., Singh, I. S., Passaniti, A., Hasday, J. D. and Goldblum, S. E. (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.

Angelo, L. S. and Kurzrock, R. (2007). Vascular endothelial growth factor and its relationship to inflammatory mediators. *Clin Cancer Res* **13**, 2825-30.

Antonetti, D. A., Barber, A. J., Khin, S., Lieth, E., Tarbell, J. M. and Gardner, T. W. (1998). Vascular permeability in experimental diabetes is associated with reduced

endothelial occludin content: vascular endothelial growth factor decreases occludin in retinal endothelial cells. Penn State Retina Research Group. *Diabetes* **47**, 1953-9.

Aplin, A. E., Howe, A., Alahari, S. K. and Juliano, R. L. (1998). Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins. *Pharmacol Rev* **50**, 197-263.

Asahara, T., Murohara, T., Sullivan, A., Silver, M., vanderZee, R., Li, T., Witzenbichler, B., Schatteman, G. and Isner, J. M. (1997). Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* **275**, 964-967.

Balasch, J., Fabregues, F. and Arroyo, V. (1998). Peripheral arterial vasodilation hypothesis: a new insight into the pathogenesis of ovarian hyperstimulation syndrome. *Hum Reprod* **13**, 2718-30.

Balda, M. S., Gonzalez-Mariscal, L., Contreras, R. G., Macias-Silva, M., Torres-Marquez, M. E., Garcia-Sainz, J. A. and Cereijido, M. (1991). Assembly and sealing of tight junctions: possible participation of G-proteins, phospholipase C, protein kinase C and calmodulin. *J Membr Biol* **122**, 193-202.

Baldari, C. T., Heguy, A. and Telford, J. L. (1993). Calcium dependent activation of the NF-AT transcription factor by p59fyn. *FEBS Lett* **323**, 233-5.

Balkwill, F. and Mantovani, A. (2001). Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* **357**, 539-45.

Baluk, P., Hashizume, H. and McDonald, D. M. (2005). Cellular abnormalities of blood vessels as targets in cancer. *Curr Opin Genet Dev* **15**, 102-11.

Baron, J. A. and Sandler, R. S. (2000). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and cancer prevention. *Annu Rev Med* **51**, 511-23.

Baumeister, U., Funke, R., Ebnet, K., Vorschmitt, H., Koch, S. and Vestweber, D. (2005). Association of Csk to VE-cadherin and inhibition of cell proliferation. *EMBO J* **24**, 1686-95.

Baumer, S., Keller, L., Holtmann, A., Funke, R., August, B., Gamp, A., Wolburg, H., Wolburg-Buchholz, K., Deutsch, U. and Vestweber, D. (2006). Vascular endothelial cell-specific phosphotyrosine phosphatase (VE-PTP) activity is required for blood vessel development. *Blood* **107**, 4754-62.

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

Behzadian, M. A., Windsor, L. J., Ghaly, N., Liou, G., Tsai, N. T. and Caldwell, R. B. (2003). VEGF-induced paracellular permeability in cultured endothelial cells involves urokinase and its receptor. *FASEB J* **17**, 752-4.

Bencsath, M., Blaskovits, A. and Borvendeg, J. (2003). Biomolecular cytokine therapy. *Pathol Oncol Res* **9**, 24-9.

Bertolini, F., Shaked, Y., Mancuso, P. and Kerbel, R. S. (2006). The multifaceted circulating endothelial cell in cancer: towards marker and target identification. *Nat Rev Cancer* **6**, 835-45.

Bijli, K. M., Fazal, F., Minhajuddin, M. and Rahman, A. (2008). Activation of Syk by protein kinase C-delta regulates thrombin-induced intercellular adhesion molecule-1 expression in endothelial cells via tyrosine phosphorylation of RelA/p65. *The Journal of biological chemistry* **283**, 14674-84.

Billion, K., Ibrahim, H., Mauch, C. and Niessen, C. M. (2006). Increased soluble E-cadherin in melanoma patients. *Skin Pharmacol Physiol* **19**, 65-70.

Boda-Heggemann, J., Regnier-Vigouroux, A. and Franke, W. W. (2009). Beyond vessels: occurrence and regional clustering of vascular endothelial (VE-)cadherin-containing junctions in non-endothelial cells. *Cell Tissue Res* **335**, 49-65.

Bou-Gharios, G., Ponticos, M., Rajkumar, V. and Abraham, D. (2004). Extra-cellular matrix in vascular networks. *Cell Prolif* **37**, 207-20.

Breedveld, F. C., Weisman, M. H., Kavanaugh, A. F., Cohen, S. B., Pavelka, K., van Vollenhoven, R., Sharp, J., Perez, J. L. and Spencer-Green, G. T. (2006). The PREMIER study: A multicenter, randomized, double-blind clinical trial of combination therapy with adalimumab plus methotrexate versus methotrexate alone or adalimumab alone in patients with early, aggressive rheumatoid arthritis who had not had previous methotrexate treatment. *Arthritis Rheum* **54**, 26-37.

Breier, G., Breviario, F., Caveda, L., Berthier, R., Schnurch, H., Gotsch, U., Vestweber, D., Risau, W. and Dejana, E. (1996). Molecular cloning and expression of murine vascular endothelial-cadherin in early stage development of cardiovascular system. *Blood* **87**, 630-41.

Breviario, F., Caveda, L., Corada, M., Martin-Padura, I., Navarro, P., Golay, J., Introna, M., Gulino, D., Lampugnani, M. G. and Dejana, E. (1995). Functional properties of human vascular endothelial cadherin (7B4/cadherin-5), an endothelium-specific cadherin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **15**, 1229-39.

Broman, M. T., Kouklis, P., Gao, X., Ramchandran, R., Neamu, R. F., Minshall, R. D. and Malik, A. B. (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.

Brown, R. C. and Davis, T. P. (2002). Calcium modulation of adherens and tight junction function: a potential mechanism for blood-brain barrier disruption after stroke. *Stroke* **33**, 1706-11.

Bugge, T. H., Xiao, Q., Kombrinck, K. W., Flick, M. J., Holmback, K., Danton, M. J., Colbert, M. C., Witte, D. P., Fujikawa, K., Davie, E. W. et al. (1996). Fatal

embryonic bleeding events in mice lacking tissue factor, the cell-associated initiator of blood coagulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 6258-63.

Burri, P.H., Hlushchuk, R., and Djonov, V. (2004). Intussusceptive angiogenesis: its emergence, its characteristics, and its significance. *Dev Dyn* **231**, 474-488.

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

Carman, C. V., Sage, P. T., Sciuto, T. E., de la Fuente, M. A., Geha, R. S., Ochs, H. D., Dvorak, H. F., Dvorak, A. M. and Springer, T. A. (2007). Transcellular diapedesis is initiated by invasive podosomes. *Immunity* **26**, 784-97.

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

Carmeliet, P. and Collen, D. (1999). Role of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptors in vascular development. *Curr Top Microbiol Immunol* **237**, 133-58

Carmeliet, P., Ferreira, V., Breier, G., Pollefeyt, S., Kieckens, L., Gertsenstein, M., Fahrig, M., Vandenhoeck, A., Harpal, K., Eberhardt, C. et al. (1996). Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* **380**, 435-439.

Carmeliet, P., Lampugnani, M. G., Moons, L., Breviario, F., Compernolle, V., Bono, F., Balconi, G., Spagnuolo, R., Oosthuyse, B., Dewerchin, M. et al. (1999). Targeted deficiency or cytosolic truncation of the VE-cadherin gene in mice impairs VEGF-mediated endothelial survival and angiogenesis. *Cell* **98**, 147-57.

Caveda, L., Martin-Padura, I., Navarro, P., Breviario, F., Corada, M., Gulino, D., Lampugnani, M. G. and Dejana, E. (1996). Inhibition of cultured cell growth by vascular endothelial cadherin (cadherin-5/VE-cadherin). *The Journal of clinical investigation* **98**, 886-93.

Chan, A. O., Lam, S. K., Chu, K. M., Lam, C. M., Kwok, E., Leung, S. Y., Yuen, S. T., Law, S. Y., Hui, W. M., Lai, K. C. et al. (2001). Soluble E-cadherin is a valid prognostic marker in gastric carcinoma. *Gut* **48**, 808-11.

Chan, J. K. and Wong, C. S. (2001). Loss of E-cadherin is the fundamental defect in diffuse-type gastric carcinoma and infiltrating lobular carcinoma of the breast. *Adv Anat Pathol* **8**, 165-72.

Charalabopoulos, K., Gogali, A., Dalavaga, Y., Daskalopoulos, G., Vassiliou, M., Bablekos, G., Karakosta, A. and Constantopoulos, S. (2006). The clinical significance of soluble E-cadherin in nonsmall cell lung cancer. *Exp Oncol* **28**, 83-5.

Choi, K. (1998). Hemangioblast development and regulation. *Biochem Cell Biol* **76**, 947-56.

Choi, K., Kennedy, M., Kazarov, A., Papadimitriou, J. C. and Keller, G. (1998). A common precursor for hematopoietic and endothelial cells. *Development* **125**, 725-32.

Cohen, C., Zavala-Pompa, A., Sequeira, J. H., Shoji, M., Sexton, D. G., Cotsonis, G., Cerimele, F., Govindarajan, B., Macaron, N. and Arbiser, J. L. (2002). Mitogen-actived protein kinase activation is an early event in melanoma progression. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **8**, 3728-33.

Cohen, P. (1982). The role of protein phosphorylation in neural and hormonal control of cellular activity. *Nature* **296**, 613-20.

Coopman, P. J., Do, M. T., Barth, M., Bowden, E. T., Hayes, A. J., Basyuk, E., Blancato, J. K., Vezza, P. R., McLeskey, S. W., Mangeat, P. H. et al. (2000). The Syk tyrosine kinase suppresses malignant growth of human breast cancer cells. *Nature* **406**, 742-7.

Coopman, P. J. and Mueller, S. C. (2006). The Syk tyrosine kinase: a new negative regulator in tumor growth and progression. *Cancer Letters* **241**, 159-73.

Corredor, J., Yan, F., Shen, C. C., Tong, W., John, S. K., Wilson, G., Whitehead, R. and Polk, D. B. (2003). Tumor necrosis factor regulates intestinal epithelial cell migration by receptor-dependent mechanisms. *Am J Physiol Cell Physiol* **284**, C953-61.

Coughlin, C. M., Salhany, K. E., Wysocka, M., Aruga, E., Kurzawa, H., Chang, A. E., Hunter, C. A., Fox, J. C., Trinchieri, G. and Lee, W. M. (1998). Interleukin-12 and interleukin-18 synergistically induce murine tumor regression which involves inhibition of angiogenesis. *The Journal of clinical investigation* **101**, 1441-52.

Dalgleish, A. G. and O'Byrne, K. (2006). Inflammation and cancer: the role of the immune response and angiogenesis. *Cancer Treat Res* **130**, 1-38.

Damsky, C. H., Richa, J., Solter, D., Knudsen, K. and Buck, C. A. (1983). Identification and purification of a cell surface glycoprotein mediating intercellular adhesion in embryonic and adult tissue. *Cell* **34**, 455-66.

Dayer, J. M. (2002). Interleukin 1 or tumor necrosis factor-alpha: which is the real target in rheumatoid arthritis? *J Rheumatol Suppl* **65**, 10-5.

Dayer, J. M. (2002). The saga of the discovery of IL-1 and TNF and their specific inhibitors in the pathogenesis and treatment of rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine* **69**, 123-32.

Dayer, J. M. and Bresnihan, B. (2002). Targeting interleukin-1 in the treatment of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* **46**, 574-8.

Dejana, E. (2004). Endothelial cell-cell junctions: happy together. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 261-70.

Dejana, E., Bazzoni, G. and Lampugnani, M. G. (1999). The role of endothelial cell-to-cell junctions in vascular morphogenesis. *Thrombosis and Haemostasis* **82**, 755-761.

Dejana, E., Orsenigo, F. and Lampugnani, M. G. (2008). The role of adherens junctions and VE-cadherin in the control of vascular permeability. *Journal of cell science* **121**, 2115-22.

Dejana, E., Tournier-Lasserve, E. and Weinstein, B. M. (2009). The control of vascular integrity by endothelial cell junctions: molecular basis and pathological implications. *Dev Cell* **16**, 209-21.

Dempsey, E. C., Newton, A. C., Mochly-Rosen, D., Fields, A. P., Reyland, M. E., Insel, P. A. and Messing, R. O. (2000). Protein kinase C isozymes and the regulation of diverse cell responses. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **279**, L429-38.

Derycke, L., De Wever, O., Stove, V., Vanhoecke, B., Delanghe, J., Depypere, H. and Bracke, M. (2006). Soluble N-cadherin in human biological fluids. *International Journal of Cancer* **119**, 2895-900.

Dieterlen-Lievre, F. and Le Douarin, N. M. (2004). From the hemangioblast to self-tolerance: a series of innovations gained from studies on the avian embryo. *Mech Dev* **121**, 1117-28.

Duan, L. J., Imamoto, A. and Fong, G. H. (2004). Dual roles of the C-terminal Src kinase (Csk) during developmental vascularization. *Blood* **103**, 1370-1372.

Dupuy, E., Hainaud, P., Villemain, A., Bodevin-Phedre, E., Brouland, J. P., Briand, P. and Tobelem, G. (2003). Tumoral angiogenesis and tissue factor expression during hepatocellular carcinoma progression in a transgenic mouse model. *Journal of Hepatology* **38**, 793-802.

Ebnet, K., Iden, S., Gerke, V. and Suzuki, A. (2008). Regulation of epithelial and endothelial junctions by PAR proteins. *Front Biosci* **13**, 6520-36.

Engelhardt, B. and Wolburg, H. (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., Lampugnani, M. G., Corada, M., Dejana, E. and Risau, W. (1998). Vascular endothelial growth factor induces VE-cadherin tyrosine phosphorylation in endothelial cells. *Journal of cell science* **111 (Pt 13)**, 1853-65.

Fajardo, L. F. (1989). The complexity of endothelial cells. A review. *Am J Clin Pathol* **92**, 241-50.

Fajardo, L. F., Kwan, H. H., Kowalski, J., Prionas, S. D. and Allison, A. C. (1992). Dual role of tumor necrosis factor-alpha in angiogenesis. *American Journal of Pathology* **140**, 539-44.

Feng, X. and Chen, H. (1999). [Activation of neutrophil and its relation to neutrophil-endothelial cell adherence]. *Hua Xi Yi Ke Da Xue Xue Bao* **30**, 8-11.

Ferguson, J. E., 3rd, Kelley, R. W. and Patterson, C. (2005). Mechanisms of endothelial differentiation in embryonic vasculogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **25**, 2246-54.

Fidler, I. J. (2002). Critical determinants of metastasis. *Semin Cancer Biol* **12**, 89-96.

Fidler, I. J. and Ellis, L. M. (1994). The implications of angiogenesis for the biology and therapy of cancer metastasis. *Cell* **79**, 185-8.

Fischer, E. H. and Krebs, E. G. (1955). Conversion of phosphorylase b to phosphorylase a in muscle extracts. *The Journal of biological chemistry* **216**, 121-32.

Flamme, I., Frolich, T. and Risau, W. (1997). Molecular mechanisms of vasculogenesis and embryonic angiogenesis. *J Cell Physiol* **173**, 206-10.

Flanagan, J. G. and Vanderhaeghen, P. (1998). The ephrins and Eph receptors in neural development. *Annu Rev Neurosci* **21**, 309-45.

Folkman, J. (1995). Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* **1**, 27-31.

Folkman, J. (2002). Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Semin Oncol* **29**, 15-8.

Fong, G. H., Rossant, J., Gertsenstein, M. and Breitman, M. L. (1995). Role of the Flt-1 Receptor Tyrosine Kinase in Regulating the Assembly of Vascular Endothelium. *Nature* **376**, 66-70.

Fong, G. H., Zhang, L. Y., Bryce, D. M. and Peng, J. (1999). Increased hemangioblast commitment, not vascular disorganization, is the primary defect in flt-1 knock-out mice. *Development* **126**, 3015-3025.

Frederick, M. J. and Clayman, G. L. (2001). Chemokines in cancer. *Expert Rev Mol Med* **3**, 1-18.

Gao, X., Kouklis, P., Xu, N., Minshall, R. D., Sandoval, R., Vogel, S. M. and Malik, A. B. (2000). Reversibility of increased microvessel permeability in response to VE-cadherin disassembly. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **279**, L1218-25.

Gavard, J. and Gutkind, J. S. (2006). VEGF controls endothelial-cell permeability by promoting the beta-arrestin-dependent endocytosis of VE-cadherin. *Nat Cell Biol* **8**, 1223-34.

Gehling, U. M., Ergun, S., Schumacher, U., Wagener, C., Pantel, K., Otte, M., Schuch, G., Schafhausen, P., Mende, T., Kilic, N. et al. (2000). In vitro differentiation of endothelial cells from AC133-positive progenitor cells. *Blood* **95**, 3106-3112.

Geiger, B., Bershadsky, A., Pankov, R. and Yamada, K. M. (2001). Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix--cytoskeleton crosstalk. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 793-805.

Ghabrial, A. S. and Krasnow, M. A. (2006). Social interactions among epithelial cells during tracheal branching morphogenesis. *Nature* **441**, 746-749.

Gittenberger-de Groot, A. C., DeRuiter, M. C., Bergwerff, M. and Poelmann, R. E. (1999). Smooth muscle cell origin and its relation to heterogeneity in development and disease. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* **19**, 1589-1594.

Gofuku, J., Shiozaki, H., Doki, Y., Inoue, M., Hirao, M., Fukuchi, N. and Monden, M. (1998). Characterization of soluble E-cadherin as a disease marker in gastric cancer patients. *Br J Cancer* **78**, 1095-101.

Gora-Tybor, J. and Robak, T. (2008). Targeted drugs in chronic myeloid leukemia. *Curr Med Chem* **15**, 3036-51.

Gory-Faure, S., Prandini, M. H., Pointu, H., Roullot, V., Pignot-Paintrand, I., Vernet, M. and Huber, P. (1999). Role of vascular endothelial-cadherin in vascular morphogenesis. *Development* **126**, 2093-102.

Gotsch, U., Borges, E., Bosse, R., Boggemeyer, E., Simon, M., Mossmann, H. and Vestweber, D. (1997). VE-cadherin antibody accelerates neutrophil recruitment in vivo. *Journal of cell science* **110**, 583-588.

Grazia Lampugnani, M., Zanetti, A., Corada, M., Takahashi, T., Balconi, G., Breviario, F., Orsenigo, F., Cattelino, A., Kemler, R., Daniel, T. O. et al. (2003). Contact inhibition of VEGF-induced proliferation requires vascular endothelial cadherin, beta-catenin, and the phosphatase DEP-1/CD148. *J Cell Biol* **161**, 793-804.

Gulino, D., Delachanal, E., Concord, E., Genoux, Y., Morand, B., Valiron, M. O., Sulpice, E., Scaife, R., Alemany, M. and Vernet, T. (1998). Alteration of endothelial cell monolayer integrity triggers resynthesis of vascular endothelium cadherin. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 29786-29793.

Gumbiner, B. M. (2005). Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 622-34.

Hainaud, P., Contreres, J. O., Villemain, A., Liu, L. X., Plouet, J., Tobelem, G. and Dupuy, E. (2006). The role of the vascular endothelial growth factor-Delta-like 4 ligand/Notch4-ephrin B2 cascade in tumor vessel remodeling and endothelial cell functions. *Cancer Research* **66**, 8501-8510.

Hanahan, D. (1997). Signaling vascular morphogenesis and maintenance. *Science* **277**, 48-50.

Hasegawa, H., Fujita, H., Katoh, H., Aoki, J., Nakamura, K., Ichikawa, A. and Negishi, M. (1999). Opposite regulation of transepithelial electrical resistance and paracellular permeability by Rho in Madin-Darby canine kidney cells. *The Journal of biological chemistry* **274**, 20982-8.

Hastie, L. E., Patton, W. F., Hechtman, H. B. and Shepro, D. (1997). H2O2-induced filamin redistribution in endothelial cells is modulated by the cyclic AMP-dependent protein kinase pathway. *J Cell Physiol* **172**, 373-81.

Hawkins, B. T. and Davis, T. P. (2005). The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. *Pharmacol Rev* **57**, 173-85.

Haynes, R. C., Jr., Sutherland, E. W. and Rall, T. W. (1960). The role of cyclic adenylic acid in hormone action. *Recent Prog Horm Res* **16**, 121-38.

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 vascular endothelium cadherin during neutrophil transmigration. *The Journal of biological chemistry* **278**, 14002-12.

Herren, B., Levkau, B., Raines, E. W. and Ross, R. (1998). Cleavage of beta-catenin and plakoglobin and shedding of VE-cadherin during endothelial apoptosis: evidence for a role for caspases and metalloproteinases. *Molecular biology of the cell* **9**, 1589-601

Hiscox, S., Morgan, L., Green, T. and Nicholson, R. I. (2006). Src as a therapeutic target in anti-hormone/anti-growth factor-resistant breast cancer. *Endocr Relat Cancer* **13 Suppl 1**, S53-9.

Hlatky, L., Hahnfeldt, P. and Folkman, J. (2002). Clinical application of antiangiogenic therapy: microvessel density, what it does and doesn't tell us. *J Natl Cancer Inst* **94**, 883-93.

Hoeller, C., Thallinger, C., Pratscher, B., Bister, M. D., Schicher, N., Loewe, R., Heere-Ress, E., Roka, F., Sexl, V. and Pehamberger, H. (2005). The non-receptor-associated tyrosine kinase Syk is a regulator of metastatic behavior in human melanoma cells. *Journal of Investigative Dermatology* **124**, 1293-9.

Holash, J., Maisonpierre, P. C., Compton, D., Boland, P., Alexander, C. R., Zagzag, D., Yancopoulos, G. D. and Wiegand, S. J. (1999). Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF. *Science* **284**, 1994-8.

Hood, J. D. and Cheresh, D. A. (2002). Role of integrins in cell invasion and migration. *Nat Rev Cancer* **2**, 91-100.

Hopkins, A. M., Li, D., Mrsny, R. J., Walsh, S. V. and Nusrat, A. (2000). Modulation of tight junction function by G protein-coupled events. *Adv Drug Deliv Rev* **41**, 329-40.

Houliston, R. A., Pearson, J. D. and Wheeler-Jones, C. P. (2001). Agonist-specific cross talk between ERKs and p38(mapk) regulates PGI(2) synthesis in endothelium. *Am J Physiol Cell Physiol* **281**, C1266-76.

Hu, G., Place, A. T. and Minshall, R. D. (2008). Regulation of endothelial permeability by Src kinase signaling: vascular leakage versus transcellular transport of drugs and macromolecules. *Chem Biol Interact* **171**, 177-89.

Hubbard, S. R. and Till, J. H. (2000). Protein tyrosine kinase structure and function. *Annu Rev Biochem* **69**, 373-98.

Hudry-Clergeon, H., Stengel, D., Ninio, E. and Vilgrain, I. (2005). Platelet-activating factor increases VE-cadherin tyrosine phosphorylation in mouse endothelial cells and its association with the PtdIns3'-kinase. *FASEB J* **19**, 512-20.

Hunter, T. (2009). Tyrosine-phosphorylation: thirty years and counting. *Current Opinion in Cell Biology* **21**, 140-146.

Hunter, T. and Eckhart, W. (2004). The discovery of tyrosine phosphorylation: it's all in the buffer! *Cell* **116**, S35-9, 1 p following S48.

Hussain, S. P. and Harris, C. C. (2007). Inflammation and cancer: an ancient link with novel potentials. *International Journal of Cancer* **121**, 2373-80.

Imamoto, A. (1993). Disruption of the Csk Gene, Encoding a Negative Regulator of Src Family Tyrosine Kinases, Leads to Neural-Tube Defects and Embryonic Lethality in Mice. *Cell* **73**, 1117-1124.

Inatome, R., Yanagi, S., Takano, T. and Yamamura, H. (2001). A critical role for Syk in endothelial cell proliferation and migration. *Biochemical and biophysical research communications* **286**, 195-9.

Ishizaki, T., Chiba, H., Kojima, T., Fujibe, M., Soma, T., Miyajima, H., Nagasawa, K., Wada, I. and Sawada, N. (2003). Cyclic AMP induces phosphorylation of claudin-5 immunoprecipitates and expression of claudin-5 gene in blood-brain-barrier endothelial cells via protein kinase A-dependent and -independent pathways. *Experimental cell research* **290**, 275-88.

Iyer, S., Ferreri, D. M., DeCocco, N. C., Minnear, F. L. and Vincent, P. A. (2004). VE-cadherin-p120 interaction is required for maintenance of endothelial barrier function. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **286**, L1143-53.

Jaffredo, T., Gautier, R., Eichmann, A. and Dieterlen-Lievre, F. (1998). Intraaortic hemopoietic cells are derived from endothelial cells during ontogeny. *Development* **125**, 4575-83.

Jain, R. K. (2003). Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med* **9**, 685-93.

Jiang, H., Guan, G., Zhang, R., Liu, G., Cheng, J., Hou, X. and Cui, Y. (2009). Identification of urinary soluble E-cadherin as a novel biomarker for diabetic nephropathy. *Diabetes Metab Res Rev* **25**, 232-41.

Jobin, C., Bradham, C. A., Russo, M. P., Juma, B., Narula, A. S., Brenner, D. A. and Sartor, R. B. (1999). Curcumin blocks cytokine-mediated NF-kappa B activation and proinflammatory gene expression by inhibiting inhibitory factor I-kappa B kinase activity. *J Immunol* **163**, 3474-83.

Jobin, C., Hellerbrand, C., Licato, L. L., Brenner, D. A. and Sartor, R. B. (1998). Mediation by NF-kappa B of cytokine induced expression of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) in an intestinal epithelial cell line, a process blocked by proteasome inhibitors. *Gut* **42**, 779-87.

Jobin, C., Holt, L., Bradham, C. A., Streetz, K., Brenner, D. A. and Sartor, R. B. (1999). TNF receptor-associated factor-2 is involved in both IL-1 beta and TNF-alpha signaling cascades leading to NF-kappa B activation and IL-8 expression in human intestinal epithelial cells. *J Immunol* **162**, 4447-54.

Johnson, A., Phillips, P., Hocking, D., Tsan, M. F. and Ferro, T. (1989). Protein kinase inhibitor prevents pulmonary edema in response to H2O2. *Am J Physiol* **256**, H1012-22.

Jubb, A. M., Hurwitz, H. I., Bai, W., Holmgren, E. B., Tobin, P., Guerrero, A. S., Kabbinavar, F., Holden, S. N., Novotny, W. F., Frantz, G. D. et al. (2006). Impact of vascular endothelial growth factor-A expression, thrombospondin-2 expression, and microvessel density on the treatment effect of bevacizumab in metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* **24**, 217-27.

Kasper, B., Brandt, E., Ernst, M. and Petersen, F. (2006). Neutrophil adhesion to endothelial cells induced by platelet factor 4 requires sequential activation of Ras, Syk, and JNK MAP kinases. *Blood* **107**, 1768-75.

Katayama, M., Hirai, S., Kamihagi, K., Nakagawa, K., Yasumoto, M. and Kato, I. (1994). Soluble E-cadherin fragments increased in circulation of cancer patients. *Br J Cancer* **69**, 580-5.

Keane, M. P., Arenberg, D. A., Moore, B. B., Addison, C. L. and Strieter, R. M. (1998). CXC chemokines and angiogenesis/angiostasis. *Proc Assoc Am Physicians* **110**, 288-96.

Kevil, C. G., Payne, D. K., Mire, E. and Alexander, J. S. (1998). Vascular permeability factor/vascular endothelial cell growth factor-mediated permeability occurs through disorganization of endothelial junctional proteins. *The Journal of biological chemistry* **273**, 15099-103.

Keystone, E. C., Kavanaugh, A. F., Sharp, J. T., Tannenbaum, H., Hua, Y., Teoh, L. S., Fischkoff, S. A. and Chartash, E. K. (2004). Radiographic, clinical, and functional outcomes of treatment with adalimumab (a human anti-tumor necrosis factor monoclonal antibody) in patients with active rheumatoid arthritis receiving concomitant methotrexate therapy: a randomized, placebo-controlled, 52-week trial. *Arthritis Rheum* **50**, 1400-11.

Kingsley, G. and Panayi, G. S. (1997). Joint destruction in rheumatoid arthritis: biological bases. *Clin Exp Rheumatol* **15 Suppl 17**, S3-14.

Kondo, S., Asano, M., Matsuo, K., Ohmori, I. and Suzuki, H. (1994). Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor is detectable in the sera of tumor-bearing mice and cancer patients. *Biochimica Et Biophysica Acta* **1221**, 211-4.

Kouklis, P., Konstantoulaki, M. and Malik, A. B. (2003). VE-cadherin-induced Cdc42 signaling regulates formation of membrane protrusions in endothelial cells. *The Journal of biological chemistry* **278**, 16230-6.

Kowanetz, M. and Ferrara, N. (2006). Vascular endothelial growth factor signaling pathways: therapeutic perspective. *Clin Cancer Res* **12**, 5018-22.

Kraft, A., Weindel, K., Ochs, A., Marth, C., Zmija, J., Schumacher, P., Unger, C., Marme, D. and Gastl, G. (1999). Vascular endothelial growth factor in the sera and effusions of patients with malignant and nonmalignant disease. *Cancer* **85**, 178-87.

Krebs, E. G. and Fischer, E. H. (1955). Phosphorylase activity of skeletal muscle extracts. *The Journal of biological chemistry* **216**, 113-20.

Kuzelova, K. and Hrkal, Z. (2008). Rho-signaling pathways in chronic myelogenous leukemia. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets* **8**, 261-7.

Lambeng, N., Wallez, Y., Rampon, C., Cand, F., Christe, G., Gulino-Debrac, D., Vilgrain, I. and Huber, P. (2005). Vascular endothelial-cadherin tyrosine phosphorylation in angiogenic and quiescent adult tissues. *Circ Res* **96**, 384-91.

Lambert, O., Taveau, J. C., Him, J. L., Al Kurdi, R., Gulino-Debrac, D. and Brisson, A. (2005). The basic framework of VE-cadherin junctions revealed by cryo-EM. *J Mol Biol* **346**, 1193-6.

Lampugnani, M. G., Corada, M., Caveda, L., Breviario, F., Ayalon, O., Geiger, B. and Dejana, E. (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., Giorgi, M., Gaboli, M., Dejana, E. and Marchisio, P. C. (1990). Endothelial cell motility, integrin receptor clustering, and microfilament organization are inhibited by agents that increase intracellular cAMP. *Lab Invest* **63**, 521-31.

Lampugnani, M. G., Resnati, M., Raiteri, M., Pigott, R., Pisacane, A., Houen, G., Ruco, L. P. and Dejana, E. (1992). A novel endothelial-specific membrane protein is a marker of cell-cell contacts. *J Cell Biol* **118**, 1511-22.

Langeler, E. G. and van Hinsbergh, V. W. (1991). Norepinephrine and iloprost improve barrier function of human endothelial cell monolayers: role of cAMP. *Am J Physiol* **260**, C1052-9.

Larrivee, B., Freitas, C., Trombe, M., Lv, X., Delafarge, B., Yuan, L., Bouvree, K., Breant, C., Del Toro, R., Brechot, N. et al. (2007). Activation of the UNC5B receptor by Netrin-1 inhibits sprouting angiogenesis. *Genes Dev* **21**, 2433-47.

Larson, J. D., Wadman, S. A., Chen, E., Kerley, L., Clark, K. J., Eide, M., Lippert, S., Nasevicius, A., Ekker, S. C., Hackett, P. B. et al. (2004). Expression of VE-cadherin in zebrafish embryos: a new tool to evaluate vascular development. *Dev Dyn* **231**, 204-13.

LeBlanc, H., Lawrence, D., Varfolomeev, E., Totpal, K., Morlan, J., Schow, P., Fong, S., Schwall, R., Sinicropi, D. and Ashkenazi, A. (2002). Tumor-cell resistance to death receptor--induced apoptosis through mutational inactivation of the proapoptotic Bcl-2 homolog Bax. *Nat Med* **8**, 274-81.

Lee, J. H., Kim, J. W., Ko, N. Y., Mun, S. H., Her, E., Kim, B. K., Han, J. W., Lee, H. Y., Beaven, M. A., Kim, Y. M. et al. (2008). Curcumin, a constituent of curry, suppresses IgE-mediated allergic response and mast cell activation at the level of Syk. *J Allergy Clin Immunol* **121**, 1225-31.

Legg, J. A., Herbert, J. M. J., Clissold, P. and Bicknell, R. (2008). Slits and Roundabouts in cancer, tumour angiogenesis and endothelial cell migration. *Angiogenesis* **11**, 13-21.

Legrand, P., Bibert, S., Jaquinod, M., Ebel, C., Hewat, E., Vincent, F., Vanbelle, C., Concord, E., Vernet, T. and Gulino, D. (2001). Self-assembly of the vascular endothelial cadherin ectodomain in a Ca2+-dependent hexameric structure. *The Journal of biological chemistry* **276**, 3581-8.

Leung, D. W., Cachianes, G., Kuang, W. J., Goeddel, D. V. and Ferrara, N. (1989). Vascular Endothelial Growth-Factor Is a Secreted Angiogenic Mitogen. *Science* **246**, 1306-1309.

Li, H., Fang, W., He, C., You, J., Heng, W., Zheng, J. and Wu, B. (2001). [Activation of p38 and c-Jun NH2-terminal kinase mitogen-activated protein kinases in human prostate carcinoma cell lines with different metastatic potentials]. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi* **30**, 194-7.

Lin, M. T., Yen, M. L., Lin, C. Y. and Kuo, M. L. (2003). Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis by resveratrol through interruption of Src-dependent vascular endothelial cadherin tyrosine phosphorylation. *Mol Pharmacol* **64**, 1029-36.

Lohela, M., Bry, M., Tammela, T. and Alitalo, K. (2009). VEGFs and receptors involved in angiogenesis versus lymphangiogenesis. *Curr Opin Cell Biol* **21**, 154-65.

Luplertlop, N., Misse, D., Bray, D., Deleuze, V., Gonzalez, J. P., Leardkamolkarn, V., Yssel, H. and Veas, F. (2006). Dengue-virus-infected dendritic cells trigger vascular leakage through metalloproteinase overproduction. *EMBO Rep* **7**, 1176-81.

Luttun, A. and Carmeliet, P. (2003). De novo vasculogenesis in the heart. *Cardiovascular Research* **58**, 378-89.

Luttun, A., Lupu, F., Storkebaum, E., Hoylaerts, M. F., Moons, L., Crawley, J., Bono, F., Poole, A. R., Tipping, P., Herbert, J. M. et al. (2002). Lack of plasminogen activator inhibitor-1 promotes growth and abnormal matrix remodeling of advanced atherosclerotic plaques in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **22**, 499-505.

Maisonpierre, P. C., Suri, C., Jones, P. F., Bartunkova, S., Wiegand, S. J., Radziejewski, C., Compton, D., McClain, J., Aldrich, T. H., Papadopoulos, N. et al. (1997). Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science* **277**, 55-60.

Martin, G. S. (2001). The hunting of the Src. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 467-75.

Masuda, E. S. and Schmitz, J. (2008). Syk inhibitors as treatment for allergic rhinitis. *Pulm Pharmacol Ther* **21**, 461-7.

Matsui, H., Lefkowitz, R. J., Caron, M. G. and Regan, J. W. (1989). Localization of the fourth membrane spanning domain as a ligand binding site in the human platelet alpha 2-adrenergic receptor. *Biochemistry* **28**, 4125-30.

Matsui, T., Heidaran, M., Miki, T., Popescu, N., La Rochelle, W., Kraus, M., Pierce, J. and Aaronson, S. (1989). Isolation of a novel receptor cDNA establishes the existence of two PDGF receptor genes. *Science* **243**, 800-4.

Mege, R. M., Gavard, J. and Lambert, M. (2006). Regulation of cell-cell junctions by the cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol* **18**, 541-8.

Mehta, D. and Malik, A. B. (2006). Signaling mechanisms regulating endothelial permeability. *Physiol Rev* **86**, 279-367.

Mehta, D., Rahman, A. and Malik, A. B. (2001). Protein kinase C-alpha signals rho-guanine nucleotide dissociation inhibitor phosphorylation and rho activation and regulates the endothelial cell barrier function. *The Journal of biological chemistry* **276**, 22614-20.

Millan, J., Hewlett, L., Glyn, M., Toomre, D., Clark, P. and Ridley, A. J. (2006). Lymphocyte transcellular migration occurs through recruitment of endothelial ICAM-1 to caveola- and F-actin-rich domains. *Nat Cell Biol* **8**, 113-23.

Millan, J. and Ridley, A. J. (2005). Rho GTPases and leucocyte-induced endothelial remodelling. *Biochem J* **385**, 329-37.

Min, J. K., Han, K. Y., Kim, E. C., Kim, Y. M., Lee, S. W., Kim, O. H., Kim, K. W., Gho, Y. S. and Kwon, Y. G. (2004). Capsaicin inhibits in vitro and in vivo angiogenesis. *Cancer Research* **64**, 644-51.

Minko, K., Bollerot, K., Drevon, C., Hallais, M. F. and Jaffredo, T. (2003). From mesoderm to blood islands: patterns of key molecules during yolk sac erythropoiesis. *Gene Expr Patterns* **3**, 261-72.

Monestiroli, S., Mancuso, P., Burlini, A., Pruneri, G., Dell'Agnola, C., Gobbi, A., Martinelli, G. and Bertolini, F. (2001). Kinetics and viability of circulating endothelial cells as surrogate angiogenesis marker in an animal model of human lymphoma. *Cancer Research* **61**, 4341-4.

Moore, B. B., Arenberg, D. A., Addison, C. L., Keane, M. P. and Strieter, R. M. (1998). Tumor angiogenesis is regulated by CXC chemokines. *J Lab Clin Med* **132**, 97-103.

Moore, B. B., Keane, M. P., Addison, C. L., Arenberg, D. A. and Strieter, R. M. (1998). CXC chemokine modulation of angiogenesis: the importance of balance between angiogenic and angiostatic members of the family. *J Investig Med* **46**, 113-20.

Morel, N. M., Petruzzo, P. P., Hechtman, H. B. and Shepro, D. (1990). Inflammatory agonists that increase microvascular permeability in vivo stimulate cultured pulmonary microvessel endothelial cell contraction. *Inflammation* **14**, 571-83.

Moreland, L. W., Cohen, S. B., Baumgartner, S. W., Tindall, E. A., Bulpitt, K., Martin, R., Weinblatt, M., Taborn, J., Weaver, A., Burge, D. J. et al. (2001). Long-term safety and efficacy of etanercept in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* **28**, 1238-44.

Mun, S. H., Kim, J. W., Nah, S. S., Ko, N. Y., Lee, J. H., Kim, J. D., Kim do, K., Kim, H. S., Choi, J. D., Kim, S. H. et al. (2009). Tumor necrosis factor alpha-induced interleukin-32 is positively regulated via the Syk/protein kinase Cdelta/JNK pathway in rheumatoid synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum* **60**, 678-85.

Nagar, B., Overduin, M., Ikura, M. and Rini, J. M. (1996). Structural basis of calcium-induced E-cadherin rigidification and dimerization. *Nature* **380**, 360-4.

Nagy, Z., Szabo, M. and Huttner, I. (1985). Blood-brain barrier impairment by low pH buffer perfusion via the internal carotid artery in rat. *Acta Neuropathol* **68**, 160-3.

Nawroth, R., Poell, G., Ranft, A., Kloep, S., Samulowitz, U., Fachinger, G., Golding, M., Shima, D. T., Deutsch, U. and Vestweber, D. (2002). VE-PTP and VE-cadherin ectodomains interact to facilitate regulation of phosphorylation and cell contacts. *EMBO J* **21**, 4885-95.

Nickoloff, B. J., Ben-Neriah, Y. and Pikarsky, E. (2005). Inflammation and cancer: is the link as simple as we think? *Journal of Investigative Dermatology* **124**, x-xiv.

Nieminen, M., Henttinen, T., Merinen, M., Marttila-Ichihara, F., Eriksson, J. E. and Jalkanen, S. (2006). Vimentin function in lymphocyte adhesion and transcellular migration. *Nat Cell Biol* **8**, 156-62.

Nollet, F., Kools, P. and van Roy, F. (2000). Phylogenetic analysis of the cadherin superfamily allows identification of six major subfamilies besides several solitary members. *J Mol Biol* **299**, 551-72.

Nwariaku, F. E., Liu, Z., Zhu, X., Turnage, R. H., Sarosi, G. A. and Terada, L. S. (2002). Tyrosine phosphorylation of vascular endothelial cadherin and the regulation of microvascular permeability. *Surgery* **132**, 180-5.

Olsson, A. K., Dimberg, A., Kreuger, J. and Claesson-Welsh, L. (2006). VEGF receptor signalling - in control of vascular function. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 359-71.

Orrington-Myers, J., Gao, X., Kouklis, P., Broman, M., Rahman, A., Vogel, S. M. and Malik, A. B. (2006). Regulation of lung neutrophil recruitment by VE-cadherin. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **291**, L764-71.

Park, K. W., Morrison, C. M., Sorensen, L. K., Jones, C. A., Rao, Y., Chien, C. B., Wu, J. Y., Urness, L. D. and Li, D. Y. (2003). Robo4 is a vascular-specific receptor that inhibits endothelial migration. *Developmental Biology* **261**, 251-67.

Partanen, T. A., Arola, J., Saaristo, A., Jussila, L., Ora, A., Miettinen, M., Stacker, S. A., Achen, M. G. and Alitalo, K. (2000). VEGF-C and VEGF-D expression in neuroendocrine cells and their receptor, VEGFR-3, in fenestrated blood vessels in human tissues. *FASEB J* **14**, 2087-96.

Peichev, M., Naiyer, A. J., Pereira, D., Zhu, Z. P., Lane, W. J., Williams, M., Oz, M. C., Hicklin, D. J., Witte, L., Moore, M. A. S. et al. (2000). Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood* **95**, 952-958.

Pennica, D., Hayflick, J. S., Bringman, T. S., Palladino, M. A. and Goeddel, D. V. (1985). Cloning and expression in Escherichia coli of the cDNA for murine tumor necrosis factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**, 6060-4.

Pepper, J. P., Baumann, M. H., Ayestas, M. and Rothman, R. B. (2001). Inhibition of MAO-A fails to alter cocaine-induced increases in extracellular dopamine and norepinephrine in rat nucleus accumbens. *Brain Res Mol Brain Res* **87**, 184-9.

Pepper, M. S. (2000). Lymphangiogenesis and tumor metastasis: more questions than answers. *Lymphology* **33**, 144-7.

Piedra, J., Miravet, S., Castano, J., Palmer, H. G., Heisterkamp, N., Garcia de Herreros, A. and Dunach, M. (2003). p120 Catenin-associated Fer and Fyn tyrosine kinases regulate beta-catenin Tyr-142 phosphorylation and beta-catenin-alpha-catenin Interaction. *Mol Cell Biol* **23**, 2287-97.

Plate, K. H., Breier, G., Millauer, B., Ullrich, A. and Risau, W. (1993). Up-regulation of vascular endothelial growth factor and its cognate receptors in a rat glioma model of tumor angiogenesis. *Cancer Research* **53**, 5822-7.

Platz, E. A. and De Marzo, A. M. (2004). Epidemiology of inflammation and prostate cancer. *J Urol* **171**, S36-40.

Potter, M. D., Barbero, S. and Cheresh, D. A. (2005). Tyrosine phosphorylation of VE-cadherin prevents binding of p120- and beta-catenin and maintains the cellular mesenchymal state. *The Journal of biological chemistry* **280**, 31906-12.

Potthoff, S., Entschladen, F., Niggemann, B., Zaenker, K. S. and Lang, K. (2007). N-cadherin engagement provides a dominant stop signal for the migration of MDA-MB-468 breast carcinoma cells. *Breast Cancer Res Treat* **105**, 287-95.

Pyun, B. J., Choi, S., Lee, Y., Kim, T. W., Min, J. K., Kim, Y., Kim, B. D., Kim, J. H., Kim, T. Y., Kim, Y. M. et al. (2008). Capsiate, a nonpungent capsaicin-like compound,

inhibits angiogenesis and vascular permeability via a direct inhibition of Src kinase activity. *Cancer Research* **68**, 227-35.

Radice, G. L., Rayburn, H., Matsunami, H., Knudsen, K. A., Takeichi, M. and Hynes, R. O. (1997). Developmental defects in mouse embryos lacking N-cadherin. *Developmental Biology* **181**, 64-78.

Read, M. A., Whitley, M. Z., Gupta, S., Pierce, J. W., Best, J., Davis, R. J. and Collins, T. (1997). Tumor necrosis factor alpha-induced E-selectin expression is activated by the nuclear factor-kappaB and c-JUN N-terminal kinase/p38 mitogen-activated protein kinase pathways. *The Journal of biological chemistry* **272**, 2753-61.

Reynolds, A. B. and Carnahan, R. H. (2004). Regulation of cadherin stability and turnover by p120ctn: implications in disease and cancer. *Semin Cell Dev Biol* **15**, 657-63.

Reynolds, L. E., Wyder, L., Lively, J. C., Taverna, D., Robinson, S. D., Huang, X., Sheppard, D., Hynes, R. O. and Hodivala-Dilke, K. M. (2002). Enhanced pathological angiogenesis in mice lacking beta3 integrin or beta3 and beta5 integrins. *Nat Med* **8**, 27-34.

Ricchi, P., Pignata, S., Iaffaioli, R. V. and Daniele, B. (2003). Cyclo-oxygenase inhibition in colorectal adenomas and cancer. *J Clin Gastroenterol* **37**, 281-7.

Ricchi, P., Zarrilli, R., Di Palma, A. and Acquaviva, A. M. (2003). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs in colorectal cancer: from prevention to therapy. *Br J Cancer* **88**, 803-7.

Risau, W. (1997). Mechanisms of angiogenesis. *Nature* **386**, 671-4.c

Rodriguez, S. K., Guo, W., Liu, L., Band, M. A., Paulson, E. K. and Meydani, M. (2006). Green tea catechin, epigallocatechin-3-gallate, inhibits vascular endothelial growth factor angiogenic signaling by disrupting the formation of a receptor complex. *International Journal of Cancer* **118**, 1635-44.

Rossi, D. and Zlotnik, A. (2000). The biology of chemokines and their receptors. *Annu Rev Immunol* **18**, 217-42.

Sakakibara, A., Furuse, M., Saitou, M., Ando-Akatsuka, Y. and Tsukita, S. (1997). Possible involvement of phosphorylation of occludin in tight junction formation. *J Cell Biol* **137**, 1393-401.

Salven, P., Manpaa, H., Orpana, A., Alitalo, K. and Joensuu, H. (1997). Serum vascular endothelial growth factor is often elevated in disseminated cancer. *Clin Cancer Res* **3**, 647-51.

Sandoval, R., Malik, A. B., Minshall, R. D., Kouklis, P., Ellis, C. A. and Tiruppathi, C. (2001). Ca(2+) signalling and PKCalpha activate increased endothelial permeability by disassembly of VE-cadherin junctions. *J Physiol* **533**, 433-45.

Sandoval, R., Malik, A. B., Naqvi, T., Mehta, D. and Tiruppathi, C. (2001). Requirement for Ca2+ signaling in the mechanism of thrombin-induced increase in endothelial permeability. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **280**, L239-47.

Schaller, M. D. (2001). Biochemical signals and biological responses elicited by the focal adhesion kinase. *Biochimica Et Biophysica Acta* **1540**, 1-21.

Schenker, J. G. and Weinstein, D. (1978). Ovarian hyperstimulation syndrome: a current survey. *Fertil Steril* **30**, 255-68.

Schmelz, M., and Franke, W.W. (1993). Complexus Adhaerentes, a New Group of Desmoplakin-Containing Junctions in Endothelial-Cells - the Syndesmos Connecting Retothelial Cells of Lymph-Nodes. *Eur J Cell Biol* **61**, 274-289.

Schmelz, M., Moll, R., Kuhn, C., and Franke, W.W. (1994). Complexus Adhaerentes, a New Group of Desmoplakin-Containing Junctions in Endothelial-Cells .2. Different Types of Lymphatic Vessels. *Differentiation* **57,** 97-117.

Schulz, B., Pruessmeyer, J., Maretzky, T., Ludwig, A., Blobel, C. P., Saftig, P. and Reiss, K. (2008). ADAM10 regulates endothelial permeability and T-Cell transmigration by proteolysis of vascular endothelial cadherin. *Circ Res* **102**, 1192-201.

Seibert, A. F., Thompson, W. J., Taylor, A., Wilborn, W. H., Barnard, J. and Haynes, J. (1992). Reversal of increased microvascular permeability associated with ischemia-reperfusion: role of cAMP. *J Appl Physiol* **72**, 389-95.

Sessa, C., Guibal, A., Del Conte, G. and Ruegg, C. (2008). Biomarkers of angiogenesis for the development of antiangiogenic therapies in oncology: tools or decorations? *Nat Clin Pract Oncol* **5**, 378-91.

Sewpaul, A., French, J. J., Khoo, T. K., Kernohan, M., Kirby, J. A. and Charnley, R. M. (2009). Soluble E-cadherin: an early marker of severity in acute pancreatitis. *HPB Surg* **2009**, 397375.

Sgadari, C., Angiolillo, A. L. and Tosato, G. (1996). Inhibition of angiogenesis by interleukin-12 is mediated by the interferon-inducible protein 10. *Blood* **87**, 3877-82.

Shaked, Y., Bertolini, F., Man, S., Rogers, M. S., Cervi, D., Foutz, T., Rawn, K., Voskas, D., Dumont, D. J., Ben-David, Y. et al. (2005). Genetic heterogeneity of the vasculogenic phenotype parallels angiogenesis; Implications for cellular surrogate marker analysis of antiangiogenesis. *Cancer Cell* **7**, 101-11.

Shalaby, F., Rossant, J., Yamaguchi, T. P., Gertsenstein, M., Wu, X. F., Breitman, M. L. and Schuh, A. C. (1995). Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature* **376**, 62-6.

Shasby, D. M., Stevens, T., Ries, D., Moy, A. B., Kamath, J. M., Kamath, A. M. and Shasby, S. S. (1997). Thrombin inhibits myosin light chain dephosphorylation in endothelial cells. *Am J Physiol* **272**, L311-9.

Sheldon, R., Moy, A., Lindsley, K., Shasby, S. and Shasby, D. M. (1993). Role of myosin light-chain phosphorylation in endothelial cell retraction. *Am J Physiol* **265**, L606-12.

Shi, B., Mahesh, V. B., Bhat, G. K., Ping, L. and Brann, D. W. (1998). Evidence for a role of bradykinin neurons in the control of gonadotropin-releasing hormone secretion. *Neuroendocrinology* **67**, 209-218.

Shweiki, D., Itin, A., Soffer, D. and Keshet, E. (1992). Vascular Endothelial Growth-Factor Induced by Hypoxia May Mediate Hypoxia-Initiated Angiogenesis. *Nature* **359**, 843-845.

Soeki, T., Tamura, Y., Shinohara, H., Sakabe, K., Onose, Y. and Fukuda, N. (2004). Elevated concentration of soluble vascular endothelial cadherin is associated with coronary atherosclerosis. *Circ J* **68**, 1-5.

Staddon, J. M., Herrenknecht, K., Smales, C. and Rubin, L. L. (1995). Evidence that tyrosine phosphorylation may increase tight junction permeability. *Journal of cell science* **108 (Pt 2)**, 609-19.

Stevenson, B. R., Anderson, J. M., Braun, I. D. and Mooseker, M. S. (1989). Phosphorylation of the tight-junction protein ZO-1 in two strains of Madin-Darby canine kidney cells which differ in transepithelial resistance. *Biochem J* **263**, 597-9.

Stevenson, B. R. and Keon, B. H. (1998). The tight junction: morphology to molecules. *Annu Rev Cell Dev Biol* **14**, 89-109.

Sui, X. F., Kiser, T. D., Hyun, S. W., Angelini, D. J., Del Vecchio, R. L., Young, B. A., Hasday, J. D., Romer, L. H., Passaniti, A., Tonks, N. K. et al. (2005). Receptor protein tyrosine phosphatase micro regulates the paracellular pathway in human lung microvascular endothelia. *American Journal of Pathology* **166**, 1247-58.

Sumpio, B. E., Riley, J. T. and Dardik, A. (2002). Cells in focus: endothelial cell. *Int J Biochem Cell Biol* **34**, 1508-12.

Suzuki, S., Sano, K. and Tanihara, H. (1991). Diversity of the cadherin family: evidence for eight new cadherins in nervous tissue. *Cell Regul* **2**, 261-70.

Tang, F. Y., Nguyen, N. and Meydani, M. (2003). Green tea catechins inhibit VEGF-induced angiogenesis in vitro through suppression of VE-cadherin phosphorylation and inactivation of Akt molecule. *International Journal of Cancer* **106**, 871-8.

Taniguchi, T., Kobayashi, T., Kondo, J., Takahashi, K., Nakamura, H., Suzuki, J., Nagai, K., Yamada, T., Nakamura, S. and Yamamura, H. (1991). Molecular cloning of a porcine gene syk that encodes a 72-kDa protein-tyrosine kinase showing high susceptibility to proteolysis. *The Journal of biological chemistry* **266**, 15790-6.

Tanita, T., Song, C., Kubo, H., Hoshikawa, Y., Ueda, S. and Fujimura, S. (2000). Superoxide possibly produced in endothelial cells mediates the neutrophil-induced lung injury. *Ann Thorac Surg* **69**, 402-7; discussion 408.

Tanita, T., Song, C., Kubo, H., Ono, S. and Fujimura, S. (2000). Endothelial signal transduction system enhances neutrophil-induced pulmonary vascular permeability. *Eur Respir J* **15**, 452-8.

Taveau, J. C., Dubois, M., Le Bihan, O., Trepout, S., Almagro, S., Hewat, E., Durmort, C., Heyraud, S., Gulino-Debrac, D. and Lambert, O. (2008). Structure of artificial and natural VE-cadherin-based adherens junctions. *Biochem Soc Trans* **36**, 189-93.

Taya, S., Yamamoto, T., Kano, K., Kawano, Y., Iwamatsu, A., Tsuchiya, T., Tanaka, K., Kanai-Azuma, M., Wood, S. A., Mattick, J. S. et al. (1998). The Ras target AF-6 is a substrate of the fam deubiquitinating enzyme. *J Cell Biol* **142**, 1053-62.

Thurston, G., Rudge, J. S., Ioffe, E., Zhou, H., Ross, L., Croll, S. D., Glazer, N., Holash, J., McDonald, D. M. and Yancopoulos, G. D. (2000). Angiopoietin-1 protects the adult vasculature against plasma leakage. *Nat Med* **6**, 460-3.

Tinsley, J. H., Teasdale, N. R. and Yuan, S. Y. (2004). Myosin light chain phosphorylation and pulmonary endothelial cell hyperpermeability in burns. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **286**, L841-7.

Tozeren, A., Wu, S., Hoxter, B., Xu, W., Adamson, E. D. and Byers, S. W. (1998). Vinculin and cell-cell adhesion. *Cell Adhes Commun* **5**, 49-59.

Tsuchida, S., Yanagi, S., Inatome, R., Ding, J., Hermann, P., Tsujimura, T., Matsui, N. and Yamamura, H. (2000). Purification of a 72-kDa protein-tyrosine kinase from rat liver and its identification as Syk: involvement of Syk in signaling events of hepatocytes. *J Biochem* **127**, 321-7.

Tsujimura, T., Yanagi, S., Inatome, R., Takano, T., Ishihara, I., Mitsui, N., Takahashi, S. and Yamamura, H. (2001). Syk protein-tyrosine kinase is involved in neuron-like differentiation of embryonal carcinoma P19 cells. *FEBS Lett* **489**, 129-33.

Turowski, P., Martinelli, R., Crawford, R., Wateridge, D., Papageorgiou, A. P., Lampugnani, M. G., Gamp, A. C., Vestweber, D., Adamson, P., Dejana, E. et al. (2008). Phosphorylation of vascular endothelial cadherin controls lymphocyte emigration. *Journal of cell science* **121**, 29-37.

Ulanova, M., Puttagunta, L., Marcet-Palacios, M., Duszyk, M., Steinhoff, U., Duta, F., Kim, M. K., Indik, Z. K., Schreiber, A. D. and Befus, A. D. (2005). Syk tyrosine kinase participates in beta1-integrin signaling and inflammatory responses in airway epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **288**, L497-507.

Vandenbroucke, E., Mehta, D., Minshall, R. and Malik, A. B. (2008). Regulation of endothelial junctional permeability. *Ann N Y Acad Sci* **1123**, 134-45.

Verin, A. D., Patterson, C. E., Day, M. A. and Garcia, J. G. (1995). Regulation of endothelial cell gap formation and barrier function by myosin-associated phosphatase activities. *Am J Physiol* **269**, L99-108.

Vestweber, D. (2008). VE-cadherin: the major endothelial adhesion molecule controlling cellular junctions and blood vessel formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **28**, 223-32.

Vestweber, D. and Blanks, J. E. (1999). Mechanisms that regulate the function of the selectins and their ligands. *Physiol Rev* **79**, 181-213.

Villasante, A., Pacheco, A., Pau, E., Ruiz, A., Pellicer, A. and Garcia-Velasco, J. A. (2008). Soluble vascular endothelial-cadherin levels correlate with clinical and biological aspects of severe ovarian hyperstimulation syndrome. *Hum Reprod* **23**, 662-7.

Vittet, D., Buchou, T., Schweitzer, A., Dejana, E. and Huber, P. (1997). Targeted null-mutation in the vascular endothelial-cadherin gene impairs the organization of vascular-like structures in embryoid bodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 6273-8.

Vlodavsky, I., Zcharia, E., Goldshmidt, O., Eshel, R., Katz, B. Z., Minucci, S., Kovalchuk, O., Penco, S., Pisano, C., Naggi, A. et al. (2003). Involvement of heparanase in tumor progression and normal differentiation. *Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis* **33**, 59-61.

Wallach, D., Varfolomeev, E. E., Malinin, N. L., Goltsev, Y. V., Kovalenko, A. V. and Boldin, M. P. (1999). Tumor necrosis factor receptor and Fas signaling mechanisms. *Annu Rev Immunol* **17**, 331-67.

Wallez, Y., Cand, F., Cruzalegui, F., Wernstedt, C., Souchelnytskyi, S., Vilgrain, I. and Huber, P. (2007). 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.

Wallez, Y. and Huber, P. (2008). Endothelial adherens and tight junctions in vascular homeostasis, inflammation and angiogenesis. *Biochimica Et Biophysica Acta* **1778**, 794-809.

Wallez, Y., Vilgrain, I. and Huber, P. (2006). Angiogenesis: the VE-cadherin switch. *Trends Cardiovasc Med* **16**, 55-9.$

Wang, B., Xiao, Y., Ding, B. B., Zhang, N., Yuan, X., Gui, L., Qian, K. X., Duan, S., Chen, Z., Rao, Y. et al. (2003). Induction of tumor angiogenesis by Slit-Robo signaling and inhibition of cancer growth by blocking Robo activity. *Cancer Cell* **4**, 19-29.

Wang, H. U., Chen, Z. F. and Anderson, D. J. (1998). Molecular distinction and angiogenic interaction between embryonic arteries and veins revealed by ephrin-B2 and its receptor Eph-B4. *Cell* **93**, 741-753.

Weinblatt, M. E., Kavanaugh, A., Burgos-Vargas, R., Dikranian, A. H., Medrano-Ramirez, G., Morales-Torres, J. L., Murphy, F. T., Musser, T. K., Straniero, N., Vicente-Gonzales, A. V. et al. (2008). Treatment of rheumatoid arthritis with a Syk kinase inhibitor: a twelve-week, randomized, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum* **58**, 3309-18.

Weis, S., Shintani, S., Weber, A., Kirchmair, R., Wood, M., Cravens, A., McSharry, H., Iwakura, A., Yoon, Y. S., Himes, N. et al. (2004). Src blockade stabilizes a Flk/cadherin complex, reducing edema and tissue injury following myocardial infarction. *The Journal of clinical investigation* **113**, 885-94.

Wilting, J., Brand-Saberi, B., Kurz, H., and Christ, B. (1995). Development of the embryonic vascular system. *Cell Mol Biol Res* **41**, 219-232.

Wu, D., Koga, T., Martin, K. R. and Meydani, M. (1999). Effect of vitamin E on human aortic endothelial cell production of chemokines and adhesion to monocytes. *Atherosclerosis* **147**, 297-307.

Xiao, K., Allison, D. F., Kottke, M. D., Summers, S., Sorescu, G. P., Faundez, V. and Kowalczyk, A. P. (2003). Mechanisms of VE-cadherin processing and degradation in microvascular endothelial cells. *The Journal of biological chemistry* **278**, 19199-208.

Yamada, T., Fujieda, S., Yanagi, S., Yamamura, H., Inatome, R., Sunaga, H. and Saito, H. (2001). Protein-tyrosine kinase Syk expressed in human nasal fibroblasts and its effect on RANTES production. *J Immunol* **166**, 538-43.

Yamaoka-Tojo, M., Ushio-Fukai, M., Hilenski, L., Dikalov, S. I., Chen, Y. E., Tojo, T., Fukai, T., Fujimoto, M., Patrushev, N. A., Wang, N. et al. (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.

Yoshiji, H., Gomez, D. E., Shibuya, M. and Thorgeirsson, U. P. (1996). Expression of vascular endothelial growth factor, its receptor, and other angiogenic factors in human breast cancer. *Cancer Research* **56**, 2013-6.

Yuan, S. Y. (2002). Protein kinase signaling in the modulation of microvascular permeability. *Vascul Pharmacol* **39**, 213-23.

Yuan, S. Y., Wu, M. H., Ustinova, E. E., Guo, M., Tinsley, J. H., De Lanerolle, P. and Xu, W. (2002). Myosin light chain phosphorylation in neutrophil-stimulated coronary microvascular leakage. *Circ Res* **90**, 1214-21.

Zheng, X. M., Resnick, R. J. and Shalloway, D. (2000). A phosphotyrosine displacement mechanism for activation of Src by PTPalpha. *EMBO J* **19**, 964-78.

Zink, S., Rosen, P. and Lemoine, H. (1995). Micro- and macrovascular endothelial cells in beta-adrenergic regulation of transendothelial permeability. *Am J Physiol* **269**, C1209-18.

Zioncheck, T. F., Harrison, M. L., Isaacson, C. C. and Geahlen, R. L. (1988). Generation of an active protein-tyrosine kinase from lymphocytes by proteolysis. *The Journal of biological chemistry* **263**, 19195-202.

TIPHAINE MANNIC

VE-cadherine in cancer and inflammation: phosphorylation and cleavage

Vascular endothelial (VE) cadherin, a specific adhesive protein located at sites of endothelial intercellular contact, is required for junction integrity, vascular morphogenesis, and angiogenesis. We recently demonstrated that VE-cadherin was tyrosine phosphorylated *in vivo* in angiogenic conditions and not in quiescent endothelium. Tyrosine 685 is the only target for Src kinase in the VEGF pathway.

Thus, phospho-VE-cadherin is characteristic for activated endothelium.

The present study was designed to examine whether VE-cadherin was phosphorylated in tumoral angiogenesis *in vivo*, using two models of murine tumors: hepatocellular carcinoma model of mice with previous described hyperangiogenesis and glioblastoma model of rat brain with increased vascular permeability. I found the same tyrosine phosphorylation of VE-cadherin in both models of tumors and the site identified was Y658.

To further investigate the mechanism of VE-cadherin phosphorylation, we used cultured cells stimulated with TNF because of the described role of Y658 in vascular permeability and extravasation of leukocytes and the related presence of inflammation in both models. I found that VE-cadherin is phosphorylated on Y658 with TNF and the kinase responsible for this phosphorylation was SYK (SiRNA of Syk, mutagenesis of VE-cadherin Y658 cytoplamsic domain).

Because VE-cadherin is susceptible for extra-cellular domain proteolysis in response to TNFα, we studied in parallel the presence in cancer and inflammatory pathologies patients sera the presence of circulating VE-cadherin.

VE-cadherin could be a feature of activated endothelium both by phosphorylation and proteolysis.

Key words :

Endothelium, VE-cadherin, cleavage, phosphorylation, inflammation, cancer

TIPHAINE MANNIC

VE-cadhérine dans l'inflammation et le cancer: phosphorylation et clivage

L'endothélium vasculaire est la première couche de cellules en contact avec le flux sanguin. Au cours de processus pathologiques, les cellules endothéliales subissent des remaniements notoires dus à la présence de nombreux facteurs. Dans ce cas, l'intégrité de l'endothélium, assurée principalement par les jonctions adhérentes endothéliales dont la V(ascular)E(ndothelial)-cadhérine est la protéine clé, est perturbée. La phospho-VE-cadhérine est une caractéristique des cellules endothéliales activées *in vitro*. Notre laboratoire a montré l'existence d'une forme phosphorylée de VE-cadhérine in vivo au cours de l'angiogenèse physiologique. Des tyrosines importantes ont été identifiées : la tyrosine 685, qui est la cible directe de la tyrosine kinase Src en réponse au VEGF ainsi que les tyrosines 658 et 731. De plus, la VE-cadhérine peut être sensible à la protéolyse.
Dans ce travail, la phosphorylation de la VE-cadhérine a été étudiée dans un contexte pathologique d'inflammation et de cancer à l'aide de deux modèles murins de tumeurs hépatiques ou cérébrales. J'ai démontré l'existence *in vivo* d'une forme phosphorylée de VE-cadhérine sur le site Y658. L'analyse d'une tyrosine kinase particulière, Syk, par si RNA ainsi que par des expériences de phosphorylation in vitro suggèrent fortement l'implication de SYK dans cette phosphorylation. En parallèle, dans le cadre d'une étude sur plusieurs pathologies, nous avons mis en évidence la présence d'une forme circulante de VE-cadhérine. La VE-cadhérine, tant par sa phosphorylation que par sa présence dans les fluides biologiques, pourrait être une signature de l'endothélium activé (phosphorylation) et/ou agressé (protéolyse).

Mots-clés :
Endothélium, VE-cadhérine, phosphorylation, clivage, inflammation, cancer