



HAL
open science

Implication de la Protéine Tyrosine Phosphatase PRL-2 dans le développement vasculaire

Mathilde Poulet

► **To cite this version:**

Mathilde Poulet. Implication de la Protéine Tyrosine Phosphatase PRL-2 dans le développement vasculaire. Sciences agricoles. Université de Bordeaux, 2017. Français. NNT : 2017BORD0855 . tel-02426171

HAL Id: tel-02426171

<https://theses.hal.science/tel-02426171v1>

Submitted on 2 Jan 2020

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.

THÈSE PRÉSENTÉE POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

ÉCOLE DOCTORALE Sciences de la Vie et de la Santé

SPÉCIALITÉ Biologie Cellulaire et Physiopathologie

Mathilde POULET

Implication de la Protéine Tyrosine Phosphatase PRL-2 dans le développement vasculaire

Directeur : Pr. BIKFALVI Andreas, Université de Bordeaux
Co-Directeur : Pr. TREMBLAY Michel L., Université McGill, Montréal

Soutenue publiquement le 15 Décembre 2017

Membres du jury :

M. BIKFALVI Andreas, Professeur
M. TREMBLAY Michel, L. Professeur
M. COUFFINHAL Thierry, Professeur
Mme GARMY-SUSINI Barbara, Directrice de Recherche 2
M. PAGÈS Gilles, Directeur Recherche

Directeur de thèse
Co- Directeur de thèse
Président du jury
Rapporteuse
Rapporteur

Résumé

Les trois enzymes de la famille PRL (PRL-1,2,3), représentent un groupe de protéines tyrosine phosphatases intrigantes, impliquées dans un très grand nombre de maladies. Elles ont gagné beaucoup d'attention ces dernières années dans le contexte tumoral puisqu'elles sont très fréquemment associées à la formation de métastases, la prolifération cellulaire, l'invasion et la migration cellulaire. Bien que les propriétés oncogéniques des PRLs ne fassent plus de doute, ces phosphatases sont très peu caractérisées dans un contexte physiologique. Ainsi, aucun substrat biologique n'a été clairement identifié à ce jour et très peu de fonctions biologiques leurs sont associées, malgré un très haut degré de conservation inter-espèce suggérant un rôle critique de ces protéines dans les fonctions cellulaires.

La caractérisation de la souris déficiente pour PRL-2 indique que cette phosphatase est probablement impliquée tout au long du développement. La phosphorylation des protéines est un phénomène important pour la régulation de l'angiogenèse en jouant des fonctions critiques et réversibles sur les voies de signalisation cellulaire. Cela nous a incités, dans le cadre de cette thèse, à étudier le rôle de PRL-2 dans la morphogenèse vasculaire en utilisant à la fois des modèles *in vitro* et un modèle de souris déficientes pour PRL-2.

Dans le modèle murin de l'angiogenèse rétinienne, nous avons trouvé que la délétion de PRL-2 entraîne un retard dans la formation du plexus vasculaire avec une réduction de la vascularisation. De plus, on observe une angiogenèse et une ramification excessive au niveau du front vasculaire chez les souriceaux. En effet, le front de croissance des rétines de souris PRL-2 KO présente une densité vasculaire plus élevée associée à un bourgeonnement endothélial actif et multidirectionnel. Ces données présentent PRL-2 comme un composant potentiel du réseau de signalisation complexe qui orchestre la néo-angiogenèse.

Nous avons ensuite examiné les conséquences de la perte de PRL-2 sur le comportement des cellules endothéliales *in vitro*. Nous avons observé des modifications de migration et d'invasion dans différents modèles. En particulier, l'absence de PRL-2 accroît le bourgeonnement de capillaires dans des tests d'angiogenèse *in vitro*, ce qui est en accord avec les données *in vivo*. En utilisant plusieurs siRNA, nous avons montré que la voie de signalisation de PRL-2 est liée à la signalisation VEGF/VEGFR. En effet, la stimulation des cellules endothéliales par le VEGF dépend de la présence ou de l'absence de PRL-2. En outre, une autre voie altérée par la régulation négative de PRL-2, est celle de Notch ainsi que celle du facteur de transcription Hey2. Ceci est cohérent avec les données *in vivo* où nous avons démontré un effet important sur la différenciation artérioveineuse.

Ces données introduisent PRL-2 en tant que composant novateur du réseau de signalisation complexe qui orchestre l'angiogenèse développementale et, éventuellement, pathologique.

Mots clef: PRL-2, Angiogenèse, Migration, Invasion, VEGF-A

Abstract

The three Phosphatase of Regenerative Liver (PRL-1, -2, -3) represent an intriguing group of protein tyrosine phosphatases that has been implicated in a number of diseases. They have gained much attention in the context of cancer. Indeed, they have been constantly associated with metastasis, cell proliferation, cell invasion and migration. To date, however, little is known about their physiological function and no biological substrates have been clearly identified. All three PRLs are highly conserved among mammals, underscoring the idea that they might have important roles in cellular functions.

Characterization of the PRL-2 knockout mouse indicates that this phosphatase is likely involved throughout development. Protein phosphorylation is implicated in angiogenesis by playing critical and reversible functions in cell signaling pathways. This prompted us, in the frame of this thesis, to investigate the role of PRL-2 in vascular morphogenesis using both *in vitro* models and genetic loss-of-function mouse models.

In the retinal angiogenesis mouse model, we found that PRL-2 deletion leads to delay in the formation of the retinal vascular plexus with a reduction of the advancing vasculature across the vitreal surface. Furthermore, excessive angiogenesis and branching at the leading edge in 6 day old pups is observed. Indeed, the growing front of PRL-2 KO mouse retinas showed a higher vascular density due to active, multidirectional hypersprouting of the vasculature. This data introduces PRL-2 as a potential component of the complex signaling network that orchestrates neo-angiogenesis.

Based on these findings, we have examined whether the absence of PRL-2 can modify the behavior of endothelial cells *in vitro*. We showed an altered migration in various assays. In particular, sprouting in *in vitro* angiogenesis assays is altered, which is in agreement with the *in vivo* data. By using several siRNA, we showed that the signaling pathway of PRL-2 is dependent to VEGF/VEGFR signaling. Indeed, the stimulation of endothelial cells by VEGF is dependant of the presence or absence of PRL-2. Furthermore, other targets altered by PRL-2 downregulation, are Notch and the Hey2 transcription factor, which is consistent with *in vivo* data as we showed a strikingly effect on arteriovenous differentiation. Taken together, these data introduce PRL-2 as a novel component of the complex signaling network that orchestrates developmental and, possibly, pathological angiogenesis.

Key words: PRL-2, Angiogenesis, Migration, Invasion, VEGFA

Remerciements

Je voudrais tout d'abord adresser mes remerciements à l'ensemble des membres du jury, à commencer par le Pr. Thierry Couffinhal qui a accepté de présider ce jury et aux Dr. Gilles Pagès et Dr. Barbara Garmy-Susini d'avoir consenti à examiner ce travail en qualité de rapporteurs.

Je tiens ensuite à remercier mon directeur de thèse, le Pr. Andreas Bikfalvi, sans qui toute cette aventure n'aurait pas eu lieu. Merci pour votre soutien, vos conseils avisés et vos remarques pertinentes qui ont permis l'avancement et la réalisation des travaux de thèse que je présente aujourd'hui. Vous avez toujours réussi à trouver les mots justes dans les situations parfois difficiles pour moi et j'ai eu beaucoup de chance de vous avoir comme encadrant. On traverse l'océan jusqu'au Québec, pour rejoindre et remercier le Pr. Michel Tremblay, co-directeur de ma thèse. J'ai eu une énorme chance d'avoir été encadrée et guidée par toi pendant ces années. Un très grand merci pour ta confiance et pour l'environnement excellent dont j'ai bénéficié à Montréal. Enfin, merci à tous les deux pour m'avoir permis de vivre cette expérience internationale si enrichissante.

Avoir eu la chance de faire une thèse entre deux pays différents, multiplie le nombre de collègues et amis que je veux remercier ici.

À Bordeaux, merci à toi Thomas pour toute ton aide et ta rigueur scientifique. Tu as été mon encadrant de master et je te remercie de m'avoir fait partager ton rythme à mille à l'heure et la passion qui t'anime. Merci à la team Liliouin, à quatre dans notre mini bureau on a fait une belle équipe, vous allez me manquer!! Merci à toi Céline pour tout ce que tu fais pour nous au laboratoire. Je voudrais aussi te remercier, ainsi que Sophie Javerzat pour votre aide et votre gentillesse que je n'oublierai jamais dans certains de mes moments difficiles. Merci à Jess toujours souriante. Merci à Patrick pour ta passion dans la recherche et pour les apéros! Merci à Isa pour ton soutien et ta bonne humeur. Continue d'être aussi créative! J'attends ta commande dollorama ;-)

Merci à Stéphanie pour ta motivation et joie de vivre. Merci à Fafa et Marielle pour votre sourire et bonne humeur. Merci à May pour toute ta rigueur et l'organisation du labo. Merci à Raph, Marie-Paule, Marie-Alix et tout le personnel de l'animalerie pour absolument tout votre travail. Merci à Béatrice pour tes petits mots de soutien. Merci à Laura qui a fondé la: «*team volaille, tous avec toi pour te donner des ailes*». Merci à Clotilde pour ta douceur et gentillesse dans toutes les situations! Tiffanie, je suis vraiment heureuse que ce soit toi qui prennes la suite de ce projet, et je suis sûre qu'il te permettra de faire des merveilles! Merci à Karine et Fred pour votre compréhension, et votre aide! En gros, merci à tous les membres de l'unité INSERM 1029.

À Montréal j'ai baigné dans une ambiance extrêmement sympathique grâce à une équipe solidaire et adorable. Merci à toi Serge pour ta disponibilité et nos discussions

scientifiques ou non le matin dans le bus! Merci Noriko d'avoir cru en moi lors de mes périodes difficiles et de m'avoir permis de reprendre le dessus. Tu as été parfaite! Merci Jean-Francois pour ta gentillesse et pour toute ton aide au laboratoire! Isabelle, toujours dynamique et souriante ce fut un plaisir de travailler avec toi! Merci à Chan, et Hayley pour votre soutien de tous les jours quand on se croisait tard au laboratoire. Merci Tzvet pour ton rythme à 100 à l'heure! Merci pour les solutions 10X qui m'ont parfois bien dépannée grâce à ta gentillesse, pour les baskets (promis je m'en achète une paire bientôt), et pour ta joie de vivre! Merci à Alberto pour ta gentillesse je te souhaite tout le meilleur dans ton nouveau rôle de papa. Merci à la team P.H.D de Michel. Merci Eugene, toujours cultivé sur des sujets très divers on apprend beaucoup auprès de toi. Eli pour nos discussions, et nos soirées laboratoire! Merci de m'avoir raccompagnée en voiture quand il était trop tard!! Merci à Valérie pour ta gentillesse et pour ton dynamisme!! Merci Emily pour le soutien lors de la rédaction et pour ta joie de vivre, merci aussi à Chadi! Merci Teri pour ta douceur et ta gentillesse, merci aussi pour toute l'aide apportée à divers moments. Je continuerai à faire notre danse spéciale décongélation de tubes, Saperlipopette!! Votre gentillesse à tous va beaucoup me manquer! Comment vais-je apprendre de nouvelles expressions québécoises maintenant?

Merci aux autres personnes du centre, celles du labo du Dr Sonenberg, et Dr. Téodoro pour vos sourires quotidiens et votre bonne humeur. Merci à Oraly, pour tous ces jolis moments ensemble. Le footing n'a pas été une super réussite pour ma part (c'est le cas de le dire...), mais a eu le mérite de nous faire nous rencontrer et ça c'est une grande chance! Tu vas être une super maman et je te souhaite plein de bonheur! Merci à Camille pour nos soirées parfois carrément improbables (salsa!!!), pour les bières partagées ensemble, pour nos discussions et tes mots réconfortants face à mes coups durs! Je n'ai pas réussi à être aussi disponible que j'aurais voulu sur la fin, mais je ne vais pas être si loin et j'ai bien l'intention de rattraper cela !! Et enfin, merci à toi Jacinthe pour... beaucoup de raisons qui vont m'être difficiles à résumer en quelques lignes. Merci pour toute ton aide dans ce projet, pour ta patience, pour ton soutien et pour notre belle amitié. Merci aussi à la Jacinthe family, du fond du cœur!

Un grand merci,

À M. Maranges à Toulouse à qui je dois énormément. Merci de m'avoir tant soutenue.

À Perrine, Clément, Marielle, et Alexis; team des premiers pas à Bordeaux!

Aux Pussy cat et aux Cateux

À Antonin, Vera, Nafisha et Gael pour votre soutien ces dernières semaines.

À Pat, et Dorinne merci pour vos mots encourageants pendant les moments parfois difficiles.

À Amandine, merci pour nos repas de midi, de ceux où on ressort plus forte. Merci d'avoir pris le temps de relire ce manuscrit. Merci pour tes conseils.

À Célia, se retrouver ici à Montréal après toutes ces années c'était un cadeau parfait!! On continuera à danser la salsa!!

À Mégane, pour les restos et les bières de la rue St-Denis, et pour bien plus. Merci ma belle pour ton soutien depuis l'INSA à Toulouse. La route nous a remises sur le même chemin et c'est tant mieux !!!!

À Vivande, olalala que dire?? Merci pour tout! On se suit depuis notre colocation dans ton appart vide au début de cette thèse. Un moment magique, improbable (on en parle des poussins?) et, hors du temps. Un saut en parachute plus tard, on est toujours là l'une pour l'autre et savoir cela me rend plus forte!

À mes poulettes, Anouk, Lise, Clémence, Louloute, Manon et aux petits loups qui sont venus agrandir cette jolie bulle, Pénélope, Félix, Robinson, Léonard. Depuis le lycée et nos premières vacances ensemble, que de chemin parcouru. Merci les filles pour votre patience avec moi, je vais redevenir plus disponible. Je suis fière de vous mes belles et je vous aime très fort. Merci particulièrement à Clémence pour toutes ton aide à Montréal. Le déménagement express, la chambre dans votre joli appartement, depuis mes premiers pas sur le sol canadien j'ai toujours pu compter sur toi et pour cela je te remercie.

Je voudrais enfin dire merci,

À Nathalie pour les corrections finales de cette thèse.

À Alain, Maryline, Maëva et Rova, pour votre gentillesse et un merci avec un très grand «M» pour les derniers jours avant la soutenance.

À ma famille, oncles, tantes, cousins, cousines et particulièrement à mes grands-parents.

À mes beaux-frères, Fabien et Guillaume, merci pour votre soutien. Merci de rendre mes sœurs heureuses, merci d'être des hommes et des papas formidables!

À mes sisters, mes piliers que j'aime si fort. Merci pour vos conseils, votre aide, et pour votre soutien au quotidien. Merci pour nos conversations à trois qui nous ont fait oublier la distance! Merci pour les corrections des fautes d'orthographe, pour l'aide sur la bib, et pour la gestion du pot! Je suis heureuse de voir que les années nous rapprochent, et je sais qu'à nous trois on est complètes. AmL, éclairceuse qui a toujours fait très attention à nous. Merci de ton soutien et de toute l'inspiration que tu m'apportes. Mag, notre crapaud qui apporte le caractère bien trempé de dire ce qu'on pense en vrai. Merci crap d'être toujours là avec ta patience infinie pour m'aider à désamorcer mon stress quand je ne sais plus le gérer. Je suis très fière de vous mes sisters. Finalement, ce qu'il y a de bien c'est qu'en grandissant la petite crapaud n'est plus si petite, et notre grande sœur, n'est plus si grande. Ça fait du bien de lâcher un peu les rôles, et vous savez, moi, je n'ai jamais bien aimé les cadres...

À mes neveux, Aaron, Lucas, Théo. Aaron petit bonhomme adorable merci pour tes dessins dans mon colis d'anniversaire. Merci d'avoir été mon super-héros les derniers jours avant la soutenance. Ton pouvoir: des bisous contre mon stress! Lucas et Théo qui ont fait leurs premiers pas pendant la rédaction de ce manuscrit! Belle image qui restera dans ma mémoire. Vous ne le savez pas encore mais vos films et photos envoyés par vos mamans ont balayé mes coups de mous durant cette période de rédaction.

À toi Papa, à toi Maman, merci. Merci pour les relectures de ce manuscrit. Quelques lignes ce n'est pas suffisant pour vous remercier comme je le voudrais. Merci pour l'amour que vous m'avez donné, pour votre patience, votre soutien, votre compréhension. Je vais enfin arrêter d'être étudiante... Cela aura été long. Si j'ai pu accomplir tout ce parcours c'est grâce à vous à mes côtés dans toutes les situations. Cela passe par l'aide lors des déménagements de villes en villes dans différents pays, aux démêlés administratifs sur ma situation, aux petites conserves faites maison récupérées dans mes valises, aux cerises du jardin envoyées par la poste (!!!)... Et tellement d'autres, plus ou moins rigolotes, qui font que je suis ici aujourd'hui. Malgré la distance qui nous sépare parfois, vous êtes toujours présents avec moi.

Enfin, je ne peux finir ces lignes sans remercier Nours, Museau et mon Kevin. Kevin, mon scientifique pour nos discussions si riches qui ont alimenté le travail que je présente aujourd'hui, pour le coaching au jour le jour, et pour le soutien inébranlable. Un merci spécial pour les dernières semaines, tu as été d'une patience en or! Enfin, Kevin mon amoureux et mon homme de ma vie pour tout ce chemin qu'on a parcouru ensemble et tout celui qu'il nous reste. Je t'aime.

Table des matières

REMERCIEMENTS.....	5
TABLE DES MATIERES.....	9
TABLE DES ILLUSTRATIONS	13
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	15
INTRODUCTION	17
PARTIE 1 : LE SYSTÈME VASCULAIRE	18
I. <i>PRÉSENTATION GÉNÉRALE</i>	18
I.1. Structure et fonction des vaisseaux sanguins.....	18
I.1.1 Focus sur l'endothélium	19
I.1.2 Les cellules murales.....	21
I.2. Types de vaisseaux.....	22
I.2.1 Les vaisseaux de gros calibre.....	22
I.2.2 Les capillaires	23
I.3. Processus mis en place lors de la morphogenèse vasculaire.....	23
I.3.1 Vasculogenèse et angiogenèse	23
I.3.2 Modèle d'étude de l'angiogenèse.....	24
II. <i>LA RÉTINE, MODÈLE DE CHOIX POUR L'ÉTUDE DE L'ANGIOGENÈSE</i>	25
II.1. Caractéristiques anatomiques de l'œil	25
II.2. Tunique profonde : la rétine	26
II.2.1 L'épithélium pigmentaire (RPE).....	26
II.2.2 La couche neuro-sensorielle rétinienne	27
II.3. Développement du réseau vasculaire rétinien	28
II.3.1 Chez l'homme.....	28
II.3.2 La souris : modèle pour l'étude de l'angiogenèse	31
III. <i>MÉCANISME DE L'ANGIOGENÈSE</i>	34
III.1. Présentation	34
III.2. Angiogenèse par bourgeonnement	35
III.2.1 De la quiescence à l'activation	36
III.2.2 La sélection.....	38
III.2.3 L'élongation.....	43
III.2.4 La formation de la lumière	44
III.2.5 Maturation	45
III.3. Mécanisme de régulation de l'angiogenèse et implication au niveau du développement vasculaire rétinien	46
III.3.1 Modèle de la rétine de souris.....	46
III.3.2 Participation cellulaire à la vascularisation rétinienne chez la souris	48
III.3.1 Participation moléculaire à la vascularisation rétinienne chez la souris.....	50
IV. <i>DIFFÉRENCIATION ARTÉRIO-VEINEUSE</i>	54
IV.1. Une distinction génétique précoce lors du développement embryonnaire.....	54
IV.2. Implication de VEGF et Notch dans le processus de différenciation artérioveineuse	55
IV.2.1 Implication de la signalisation VEGF dans la différenciation A/V	55
IV.2.2 La spécialisation des cellules endothéliales	56

PARTIE 2 : SYSTÈME VEGF/VEGFR: ACTEURS DE L'ANGIOGENÈSE.....58

I. PRÉSENTATION	58
I.1. Historique de la découverte du VEGF	58
I.2. Les différents membres de la famille VEGF	58
I.3. Les différentes isoformes du VEGF	60
I.4. Les VEGFR	61
I.4.1 Les VEGFRs : structure et fonctions.....	61
I.4.2 Expression	61
I.4.3 Rôle	62
I.4.4 Les différents complexes avec VEGFR-2.....	63
II. LES MÉCANISMES D'ACTIVATION DU VEGFR-2	65
II.1. Description.....	65
II.2. Phosphorylation de la tyrosine 1175 (1173 chez la souris)	67
II.3. Phosphorylation de la tyrosine 951 (949 chez la souris)	67
II.4. Phosphorylation de la tyrosine 1214 (1212 chez la souris)	68
III. RÉGULATION DE LA SIGNALISATION	68
III.1. Description générale.....	68
III.2. Trafic vésiculaire de VEGFR-2	69

PARTIE 3 : LES PROTÉINES TYROSINES PHOSPHATASES71

I. PRÉSENTATION GÉNÉRALE DES PHOSPHATASES	71
I.1. Phosphatases et Kinases	71
I.2. Historique	72
I.1. Les Protéines Tyrosines Phosphatases	73
I.1.1 Classification.....	73
I.1.2 Caractéristiques structurales des protéines tyrosine phosphatase type I (classique et DSPs) ..	74
I.2. Le processus de déphosphorylation gouvernés par les PTPs (Cys).....	76
II. PTP ET ANGIOGENÈSE: RÉGULATION DES ACTIVITÉS DU RÉCEPTEUR VEGFR2 PAR LES PTPS ..	77
II.1. Vue d'ensemble des phosphatases connues pour agir sur la signalisation VEGFR-2 directement ou indirectement.....	77
II.2. VE-PTP.....	78
II.3. PTP1B	78
II.4. DEP-1	79
II.5. PRL-3: une phosphatase mystérieuse	80
III. LA FAMILLE PRL (PHOSPHATASES OF REGENERATING LIVER)	80
III.1. Identification et caractérisation.....	80
III.1.1 Historique.....	80
III.1.2 Distribution tissulaire	81
III.1.3 Phénotype associé aux souris déficientes pour chacun des membres de la famille PRLs	81
III.2. Caractéristiques structurales des PRLs	83
III.2.1 Caractéristiques communes aux autres PTPs.....	83
III.2.2 Motif de prénylation, une caractéristique unique	83
III.2.3 Deux caractéristiques uniques au sein de la boucle P.....	84
III.2.4 Une cystéine catalytique très sensible à l'oxydation	85
III.2.1 Motif WPFDD des PRL	86
III.2.2 Une capacité d'oligomérisation pour PRL-1 et -3.....	86
III.3. Les PRLs, des phosphatases peu conventionnelles.....	87

III.4. Propriété oncogénique des PRLs	89
IV. IMPLICATION DES DIFFÉRENTES PRLs DANS DES VOIES DE SIGNALISATION ET CONSÉQUENCES BIOLOGIQUES CONNUES À CE JOUR.....	90
IV.1. PRLs et migration cellulaire / invasion	90
IV.1.1 PRL-1 et -3 et transition épithélium-mésenchyme (EMT)	90
IV.1.2 PRL-1, -2, -3 et motilité cellulaire	91
IV.2. PRL-1,-2,-3 et cycle cellulaire	93
V. PRL-3 ET SYSTÈME VASCULAIRE	93
V.1. Expression de PRL-3 lors de la morphogénèse vasculaire	93
V.2. Importance de PRL-3 dans les cellules tumorales pour l'induction d'une angiogenèse pathologique	94
V.3. Expression de PRL-3 dans le réseau vasculaire tumoral humain	94
V.4. Première piste illustrant un rôle potentiel de PRL-3 dans l'angiogenèse physiologique	95
CHAPITRE I,.....	97
PRL-2, UN NOUVEAU COMPOSANT DE L'ANGIOGENÈSE ET DE LA DIFFÉRENCIATION ARTÉRIO-VEINEUSE	97
I. Objectifs de l'étude.....	97
II. Article I: «New Insights into PRL-2 function in angiogenesis and arteriovenous differentiation »	97
III. Résultats complémentaires	137
III.1. Matériel et méthode complémentaires	137
III.1.1 Optimisation et validation de la méthode de transfection des HUVECs.....	137
III.1.2 Zymographie sur gel de gélatine	138
III.1.3 Détermination du niveau de Magnésium cellulaire	138
III.1.4 Design d'un plasmide lentiviral résistant au siRNA: système de clonage Gateway®	139
III.1.5 Mutagenèse dirigée	140
III.1. Influence d'une stimulation VEGF ou Dll4 sur l'expression de PRL-2	140
III.2. Conséquences de la modulation de PRL-2 sur l'expression de gènes impliqués dans l'angiogenèse	141
III.3. Implication du niveau de magnésium intracellulaire.....	142
III.4. Implication de PRL-2 dans la dégradation de la matrice extracellulaire et la prolifération cellulaire.....	143
III.5. Rôle du domaine catalytique de PRL-2 dans l'activation du VEGFR-2	145
CHAPITRE II.....	147
IMPLICATION DES PHOSPHATASES DANS LA PATHOLOGIE	147
I. Objectif de l'étude.....	147
II. L'angiogenèse pathologique dans les tumeurs : cas des glioblastomes	148
III. Étude bio-informatique.....	149
IV. Implication d'autres phosphatases dans la progression des GBM : PTPRS	150
IV.1. PTPRS	150
IV.2. Choix du modèle cellulaire.....	152
IV.3. Étude de l'impact de la diminution de PTPRS sur l'invasion <i>in vitro</i>	152
IV.4. Stratégie d'extinction de l'expression de PTPRS par la technologie CRISPR/Cas9	154

CHAPITRE III	157
AUTRES MODÈLE D'ÉTUDES POUR L'ANGIOGÈSE : LA MEMBRANE CHORIOALLANTOÏDIENNE DE L'EMBRYON DE POULET (CAM)	157
I. <i>Objectif de l'étude</i>	157
II. <i>Matériel et méthode: la CAM</i>	158
III. <i>Description du modèle</i>	158
IV. <i>Article II: "Investigate tumor development through the chick embryo assay and co-culture experiment"</i>	158
DISCUSSION GENERALE	171
DISCUSSION	172
I. <i>PRL-2, un régulateur du bourgeonnement endothélial et de la voie de signalisation Notch lors du développement</i>	172
II. <i>PRL-2, un modulateur positif de la formation d'un réseau capillaire</i>	173
III. <i>PRL-2 et formation de la lumière</i>	174
IV. <i>Nouveaux concepts de la différenciation artério-veineuse via les phosphatases PRL2</i>	174
V. <i>Mécanismes sous-jacents pouvant être impliqués dans le phénotype observé lors d'une diminution de PRL-2.</i>	175
VI. <i>Les PTPs dans la régulation de l'angiogènèse et la progression tumorale</i>	176
CONCLUSION GÉNÉRALE SUR LES PHOSPHATASES PTP ET ANGIOGÈSE PHYSIOPATHOLOGIQUE	178
BIBLIOGRAPHIE	179

Table des illustrations

FIGURE 1. SUBDIVISION DE L'ARBRE VASCULAIRE EN FONCTION DU CALIBRE DES VAISSEUX SANGUINS	19
FIGURE 2. LES TROIS TYPES D'ENDOTHELIUMS	20
FIGURE 3. STRUCTURE HISTOLOGIQUE DES DIFFÉRENTS TYPES DE VAISSEUX SANGUINS	21
FIGURE 4. STRUCTURE HISTOLOGIQUE GÉNÉRALE DES GROS VAISSEUX	22
FIGURE 5. PROCESSUS MIS EN PLACE LORS DE LA MORPHOGENÈSE EMBRYONNAIRE	23
FIGURE 6. COUPE HISTOLOGIQUE D'UN ŒIL HUMAIN	25
FIGURE 7. LES DIFFÉRENTES COUCHES DE LA RÉTINE	27
FIGURE 8. FORMATION DU TUBE NEURAL	29
FIGURE 9. SUBDIVISION DU TUBE NEURAL	29
FIGURE 10. LA RÉTINE: UNE EXTENSION DU TUBE NEURAL	30
FIGURE 11. LE RÉSEAU HYALOÏDIEN ET LA FORMATION DU RÉSEAU VASCULAIRE	31
FIGURE 12. SCHÉMA RÉCAPITULANT LES DIFFÉRENTES ÉTAPES DE DISSECTION DE LA RÉTINE DE SOURIS	32
FIGURE 13. DÉVELOPPEMENT VASCULAIRE POST-NATAL DE LA RÉTINE CHEZ LA SOURIS	33
FIGURE 14. EXPANSION DU RÉSEAU VASCULAIRE RÉTINIEN SUPERFICIEL, INTERMÉDIAIRE ET PROFOND	34
FIGURE 15. ANGIOGENÈSE PAR INTUSSUSCEPTION	35
FIGURE 16. ANGIOGENÈSE PAR BOURGEONNEMENT	35
FIGURE 17. RÉCAPITULATIF DES DIFFÉRENTES ÉTAPES DE L'ANGIOGENÈSE PAR BOURGEONNEMENT	36
FIGURE 18. MÉCANISME D'ACTIVATION DE LA VOIE DE SIGNALISATION NOTCH	40
FIGURE 19. MODÈLE DE COMMUNICATION « <i>TIP TO STALK</i> »	41
FIGURE 20. DIFFÉRENTS MÉCANISMES DE FORMATION DE LA LUMIÈRE	44
FIGURE 21. MATURATION ET STABILISATION DES NÉO-VAISSEUX PAR RECRUTEMENT DE CELLULES MURALES	45
FIGURE 22. EXTENSION DU RÉSEAU VASCULAIRE DANS LE MODÈLE DE RÉTINE DE SOURIS	47
FIGURE 23. RECOUVREMENT PAR LES CELLULES MURALES DES ARTÈRES ET VEINES PRINCIPALES DU RÉSEAU VASCULAIRE DE RÉTINE DE SOURIS DE 21 JOURS	48
FIGURE 24. SCHÉMA SIMPLIFIÉ ILLUSTRANT LES CONSÉQUENCES DE L'INACTIVATION DE NOTCH SUR L'ANGIOGENÈSE	51
FIGURE 25. FACTEURS MAJEURS IMPLIQUÉS DANS LA RÉGULATION DE LA SPÉCIFICITÉ ARTÉRIELLE OU VEINEUSE	57
FIGURE 26. ÉPISSAGE ALTERNATIF DU PRÉ ARNm DU VEGF CONDUISANT A CES ISOFORMES PRO-ANGIOGÉNIQUES	60
FIGURE 27. LES RÉCEPTEURS VEGFRs ET LEURS LIGANDS	64
FIGURE 28. SIGNALISATION DU VEGFR-2 INDUITE PAR LE VEGF	66
FIGURE 29. RÉACTION ENZYMATIQUE DE PHOSPHORYLATION ET DÉPHOSPHORYLATION	71
FIGURE 30. CLASSIFICATION DE LA SUPERFAMILLE DES PTPs	73
FIGURE 31. STRUCTURE DU DOMAINE CATALYTIQUE DE DIFFÉRENTES PTPs TYPE I	74
FIGURE 32. ÉLÉMENTS STRUCTURAUX CLÉS DES PTPs	75
FIGURE 33. RÉACTION ENZYMATIQUE DES PTPs	77
FIGURE 34. ALIGNEMENT DES SÉQUENCES ENTRE LES DIFFÉRENTS MEMBRES DE LA FAMILLE PRL	83
FIGURE 35. OXYDATION RÉVERSIBLE ET IRRÉVERSIBLE DE CYS	85
FIGURE 36. OPTIMISATION DE LA TRANSFECTION TRANSITOIRE DES CELLULES HUVECs	137
FIGURE 37. ANALYSE DE L'EXTINCTION TRANSITOIRE DE PRL-2 PAR DES SI-ARN EN FONCTION DU TEMPS	138
FIGURE 38. SÉQUENCES CIBLÉS PAR LE POOL DE SI-ARN UTILISÉ DANS CETTE ETUDE ET SÉQUENCES CORRESPONDANTES DANS LES CONSTRUCTIONS SI-ARN	139
FIGURE 39. SÉQUENCE DES AMORCES UTILISÉES POUR INTRODUIRE DES MUTATIONS PAR MUTAGENÈSE DIRIGÉE	140

FIGURE 40. INFLUENCE DE LA STIMULATION VEGF SUR L'EXPRESSION DE PRL-2	140
FIGURE 41. ANALYSE DE L'EXPRESSION DE PRL-2 ET PRL-3 APRÈS TRANSFECTION AVEC LES SI-ARN CORRESPONDANT ET EN CONDITION PLUS OU MOINS STIMULÉE PAR DU DLL4	141
FIGURE 42. INFLUENCE DE LA DIMINUTION DE PRL-2 SUR LE NIVEAU D'EXPRESSION DE VEGFR-2, NRP1 ESM1, ET DLL4	142
FIGURE 43. INFLUENCE DE PRL-2 SUR LE TAUX DE MAGNESIUM CELLULAIRE DÉTECTÉ PAR ICP-AES	142
FIGURE 44. INFLUENCE DE LA DIMINUTION DE PRL-2 SUR LE NIVEAU D'EXPRESSION DES TRANSPORTEURS DE MAGNESIUM DE LA FAMILLE CNNMS	143
FIGURE 45. ANALYSE PAR ZYMOGRAPHIE DE L'ACTIVITÉ DES MMPs SÉCRÉTÉES PAR DES CELLULES ENDOTHÉLIALES CONTRÔLE OU DÉLÉTÉES POUR PRL-2	144
FIGURE 46. ANALYSE DE L'IMPLICATION DE PRL-2 DANS LA MIGRATION INDIVIDUELLE DES CELLULES ENDOTHÉLIALES	145
FIGURE 47. ANALYSE DE SURVIE DES PATIENTS EN FONCTION DE L'EXPRESSION DE PTP4A2 DANS DES GLIOMES DE BAS GRADE	149
FIGURE 48. ANALYSE DE SURVIE DES PATIENTS EN FONCTION DE L'EXPRESSION DE PTP4A2 DANS DES GLIOBLASTOMES	150
FIGURE 49. ANALYSE DE SURVIE DES PATIENTS EN FONCTION DE L'EXPRESSION DE PTPRS DANS DES GLIOBLASTOMES	151
FIGURE 50. EXPRESSION DE PTPRS DANS DIFFÉRENTES LIGNÉE DE GLIOBLASTOMES HUMAINS ET MURINS	152
FIGURE 51. VÉRIFICATION DE LA DIMINUTION DE PTPRS DANS LES CELLULES DE GLIOBLASTOMES U251 TRANSFECTÉES AVEC DEUX SH DIFFÉRENTS CIBLANT PTPRS	153
FIGURE 52. EXEMPLE DE SPHÉROÏDE A J1. À CE STADE LES SPHÉROÏDES DE TAILLE ABERRANTES SONT EXCLUS DE L'ANALYSE	153
FIGURE 53. SPHÉROÏDES COMPOSÉS DE CELLULES U251 TRANSFECTÉES AVEC LES SH CONTRÔLE OU SH CIBLANT PTPRS À J5 (A) OU J7 (B)	154
FIGURE 54. SCHÉMA ILLUSTRANT LE MÉCANISME DE CRISPR/CAS9	155
FIGURE 55. SÉQUENCES GUIDES DE 20 NUCLÉOTIDES CIBLANT LES PREMIERS EXONS DE PTPRS CHEZ L'HOMME ET LA SOURIS	156
FIGURE 56. VÉRIFICATION DE LA DIMINUTION D'EXPRESSION DE PTPRS DANS UNE POPULATION GLOBALE DE DIFFÉRENTES LIGNÉES CELLULAIRES DE GLIOBLASTOMES	156
FIGURE 57. IMMUNOPRECIPITATION (IP) DE VEGFR-2 DE CELLULES HUVEC _s STIMULÉES OU NON PAR DU VEGF SUIVI PAR UN WESTERN BLOT POUR ANALYSER LA PRESENCE OU NON DE PRL-2 DANS LE COMPLEXE	176

Liste des abréviations

ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ALK	Activin receptor-Like Kinase
αSMA	alpha Smooth Muscle Actin
ARN	Acide RiboNucléique
BMP	Bone Morphogenic Proteins
BrdU	BromoDésoxyUridine
BSA	Bovine Serum Albumine
CHO	Chinese Hamster Ovary cells
CML	Cellule Musculaire Lisse
DAB	Diaminobenzidine
DAG	Diacylglycérol
DII	Delta-like ligand
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMLA	Dégénéresence maculaire liée à l'âge
CAM	Chorioallantoic Membrane
E-cadherin	Epithelial cadherin
EGF(R)	Epidermal Growth Factor (Receptor)
ERK	Extracellular signal-Regulated Kinase
FAK	Focal adhesion kinase,
FGF2 / bFGF	basic Fibroblast Growth Factor
FGFR	Fibroblast Growth Factor Receptor
FITC	Fluorescein IsoThioCyanate
Fzd	Frizzled
EMT	Epithelial–mesenchymal transition
GFP	Green Fluorescent Protein
HIF	Hypoxia Inducible Factor
HMVEC	Human Microvascular Endothelial Cell
HUAEC	Human Umbilical Artery Endothelial Cells
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cell
IP3	Inositol 1, 4, 5-triphosphate
kDa	KiloDalton
KI	Knock-In
KO	Knock-Out

LMA	Leucémie Myéloïde Aiguë
LMC	Leucémie Myéloïde Chronique
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinases
MEC	Matrice Extracellulaire
MM	Myélome Multiple
MMP	Matrix Metalloproteinase
MT-MMP	Membrane Type-Matrix Metalloproteinase
N-cadherin	Neuronal cadherin
NICD	Notch IntraCellular Domain
NO	Monoxyde d'azote
NRP1	Neuropiline 1
P/PN	post-natal
PBS	Phosphate Buffer Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor
PDGFR	Platelet-Derived Growth Factor Receptor
PECAM	Platelet and Endothelial cell Adhesion molecule
PFA	Paraformaldéhyde
PKB	Proteine Kinase B
PIGF	Placental Growth Factor
PI3K	Phosphoinositol-3 Kinase
PIP2	Phosphatidylinositol 4,5-diphosphate
PKC	Protein Kinase C
PLC	Phospholipase C
PTP	Protein Tyrosine Phosphatase
QPCR	Quantitative Polymerase Chain Reaction
RBP-J	Recombining binding protein suppressor of hairless
ROCK	Rho-associated kinase
ROS	Reactive oxygen species
RT-PCR	Retro Transcription Polymerase Chain Reaction
SDS	Sodium Dodécyl Sulfate
siRNA	short interfering RNA
SVF	Sérum de Veau Foetal
TGF-β	Transforming Growth Factor beta
VE-cadhérine	Vascular Endothelial-cadhérine
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR-1	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1 (Flt-1)
VEGFR-2	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2 (KDR ou Flk-1)
VEGFR-3	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-3 (Flt-4)

Introduction

PARTIE 1 : LE SYSTÈME VASCULAIRE

I. PRÉSENTATION GÉNÉRALE

I.1. Structure et fonction des vaisseaux sanguins

Tout organisme, qu'il soit unicellulaire ou multicellulaire doit s'alimenter, s'oxygéner et éliminer les déchets provenant de son métabolisme. Chez les organismes multicellulaires simples comme les plathelminthes (vers plats) l'oxygène et les nutriments parviennent aux cellules par simple diffusion. Cependant, la diffusion est un processus efficace seulement pour des faibles distances (100–200 μm) ne pouvant plus suffire aux organismes plus complexes¹. Afin de surmonter cette contrainte de distance de diffusion, la réponse adaptative lors de l'évolution, a été d'augmenter la surface d'échange par constitution d'un système circulatoire interne. Ce système de transport et d'échange permet d'augmenter la surface d'échange lorsque la taille d'un organisme devient plus conséquente. L'importance capitale de ce système circulatoire est mise en lumière de par son émergence dès les tout premiers stades du développement embryonnaire avant même le début du modelage embryonnaire aboutissant à la formation d'organes². Son rôle primordial de transport d'oxygène vers les tissus en développement explique que ce soit le premier système fonctionnel formé chez les vertébrés^{3,4}.

Chez les vertébrés, le système vasculaire se subdivise en artères et en veines qui sont de structures et de fonction différentes. On peut également subdiviser l'arbre vasculaire en fonction de la taille des vaisseaux (figure 1). On distingue ainsi les gros vaisseaux (artères, veines) des vaisseaux de plus petit calibre (artériole, veinule), et les vaisseaux les plus fins, les capillaires. C'est spécifiquement au niveau de ces capillaires, organisés en réseau, que s'effectuent les échanges entre le sang et les tissus environnants (filtration, réabsorption). Ainsi, la distance du tissu ou de l'organe par rapport au cœur n'est pas limitante à la distribution, et ceci est le principe de base des systèmes vasculaires sanguins fermés que l'on retrouve chez tous les vertébrés.

Ce système vasculaire complexe et ramifié permet un grand nombre de processus physiologiques vitaux en plus du transport d'éléments nutritifs et de l'oxygène. En effet, il participe à l'élimination des métabolites toxiques, permet la communication hormonale entre des tissus éloignés, le transport rapide des cellules immunitaires vers un site inflammatoire lors de la réponse immunitaire ou le maintien de la pression artérielle. Il faut garder en mémoire que les vaisseaux sanguins sont loin d'être des tubes fermés inertes mais sont dotés d'une extrême plasticité et ce durant toute la vie adulte.

Afin d'assurer une bonne compréhension du processus angiogénique nous allons débiter cette introduction par une description de l'organisation des vaisseaux sanguins.

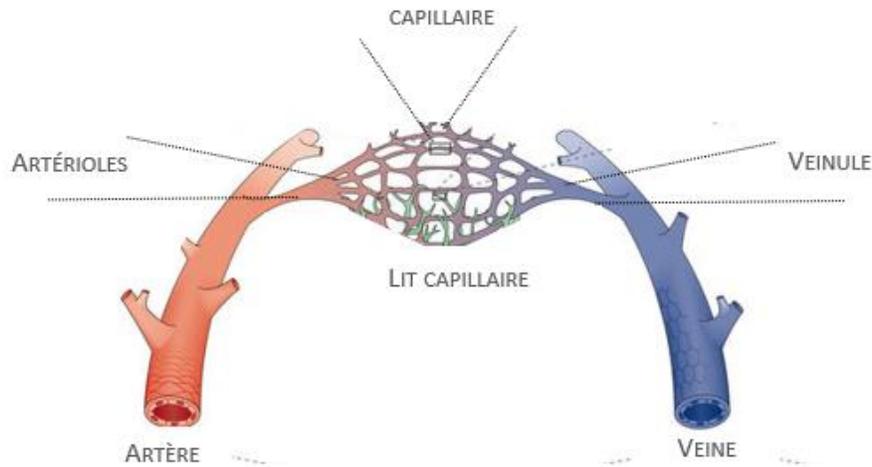


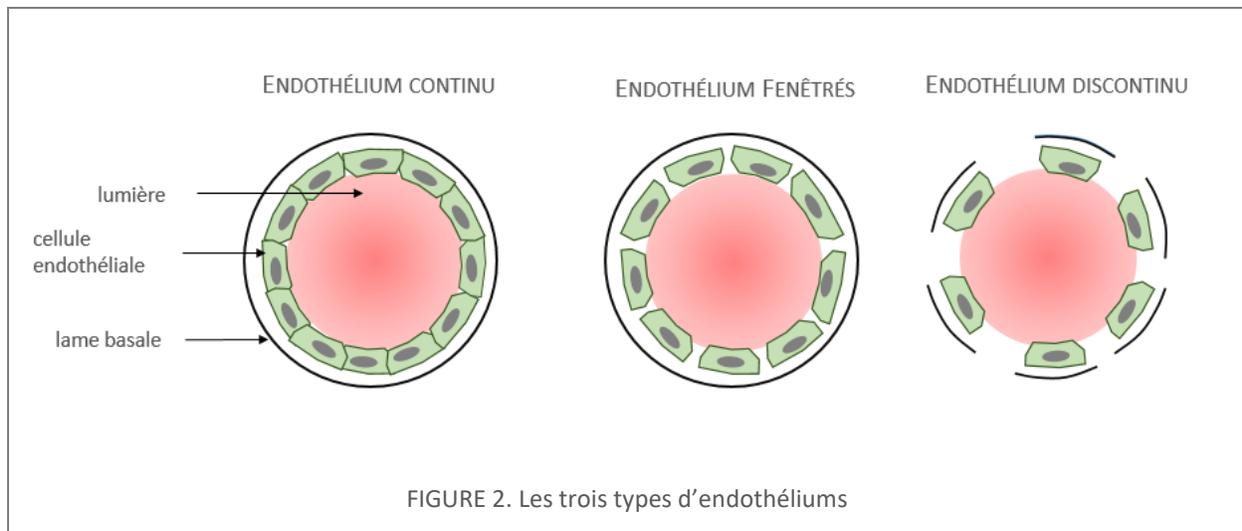
FIGURE 1. Subdivision de l'arbre vasculaire en fonction du calibre des vaisseaux.
Figure modifiée de Potente et al, 2017 ⁵

I.1.1 Focus sur l'endothélium

Tous les vaisseaux du corps humain quelles que soient leurs tailles ou leurs fonctions sont tapissés sur leurs faces internes par une fine couche mono basale de cellules endothéliales. Ces dernières forment une surface continue et lisse, directement en contact avec le sang circulant⁶. Cette couche de **cellules endothéliales** repose sur une lame basale formant un ensemble que l'on nomme: endothélium. Avec ses travaux en 1839 et 1847 Théodore Schwann a été le premier à décrire cette couche interne de cellules endothéliales. En 1965, Wilhelm His nomma cette couche interne, l'**endothélium**⁷.

La lame basale est une structure en feuillet de 50-100 nm d'épaisseur⁸. Elle est principalement constituée de collagène de type IV, de laminine, de protéoglycanes et d'héparane-sulfate (HSPG). La composition exacte de la membrane basale varie en fonction du tissu. La configuration structurale de la membrane basale peut avoir un effet direct sur le comportement des cellules endothéliales⁹.

L'endothélium constitue une barrière mécanique dont la perméabilité basale va permettre les échanges de petites molécules telles que l'eau, les gaz, et les solutés. Selon les types de vaisseaux et leurs localisations, l'endothélium sera plus ou moins perméable, modulant ainsi les échanges de macromolécules entre les organes et le réseau sanguin. On retrouve ainsi dans les vaisseaux sanguins du corps humain des endothéliums continus, pouvant être fenestrés ou non, et discontinus¹⁰. Nous les présentons sur la figure 2 suivante.



L'endothélium continu, présente des cellules endothéliales jointives qui forment un revêtement ininterrompu, et dont la perméabilité est très contrôlée. On le retrouve au niveau des vaisseaux de gros calibre et des capillaires du cerveau, du cœur ou des poumons.

L'endothélium fenêtré, de perméabilité intermédiaire en faveur des molécules hydrophiles de bas poids moléculaire est retrouvé au niveau des zones de filtration, de sécrétion et d'absorption (glandes exocrines et endocrines, tractus gastro-intestinal). On retrouve la présence de pores entre les cellules endothéliales d'environ 70nm de diamètre qui permet un échange des molécules circulantes¹⁰. La plupart du temps la lame basale de ce type d'endothélium est continue.

Enfin, l'endothélium discontinu le plus perméable, est retrouvé principalement au niveau du foie et de la moelle osseuse. Il est caractérisé par la présence de pores trans-cytoplasmiques de diamètre pouvant aller jusqu'à 200nm ainsi que par une lame basale discontinue voire même absente (comme dans le foie)¹⁰. Ainsi, le transfert de molécules de haut poids moléculaire peut se faire directement entre les cellules endothéliales¹¹.

L'endothélium, en plus de permettre les échanges entre les vaisseaux et l'environnement, présente d'autres fonctions. Il permet en effet le contrôle de l'hémostase par la sécrétion de facteurs pro ou anti coagulants, se trouve impliqué dans les processus inflammatoires, contrôle la pression osmotique et la perméabilité dans les artéioles.

Les cellules endothéliales sont en interaction constante avec la matrice extracellulaire de la membrane basale. Cette structure solide se trouvant dans une phase liquide (le plasma), empêche les vaisseaux de collapser¹². Le contact étroit entre l'endothélium et son environnement permet à celui-ci de moduler son phénotype et ses fonctions rapidement en réponse à des facteurs chimiques ou mécaniques comme des modifications du débit sanguin.

I.1.2 Les cellules murales

Les cellules murales entourent l'endothélium et assurent une première fonction de support et de stabilité. Il existe deux types de cellules murales qui diffèrent en fonction du type de vaisseaux qu'elles entourent. On retrouve ainsi les **cellules musculaires lisses** au niveau des vaisseaux de gros calibres (artères, large artérioles, veines) et les **péricytes** pour les vaisseaux les plus fins (capillaires). Les péricytes partagent la même membrane basale que l'endothélium tandis que les cellules musculaires lisses sont séparées de celui-ci par l'intima, une couche de cellules mésenchymateuses et de matrice extracellulaire¹³. Les cellules musculaires lisses forment une couverture continue organisée en couches concentriques simples ou multiples autour de l'endothélium. Par opposition, le recouvrement péricytaire est, quant à lui, discontinu et dépendant de la localisation du tissu. Ainsi, certains tissus comme les muscles squelettiques présentent un endothélium avec une couverture péricytaire de seulement 10%, tandis que pour d'autres, notamment au niveau des tissus neuronaux et plus particulièrement la rétine, les péricytes recouvrent jusqu'à 30% de l'endothélium^{14,15}.

Malgré ces différences phénotypiques et d'organisation entre ces deux types de cellules murales, elles présentent un développement embryonnaire commun¹⁶. En effet, les cellules musculaires lisses et les péricytes du système nerveux central proviennent de la crête neurale^{17,18}, tandis que les cellules murales de l'intestin¹⁹, des vaisseaux coronaires et des poumons²⁰ sont originaires du mésoderme.

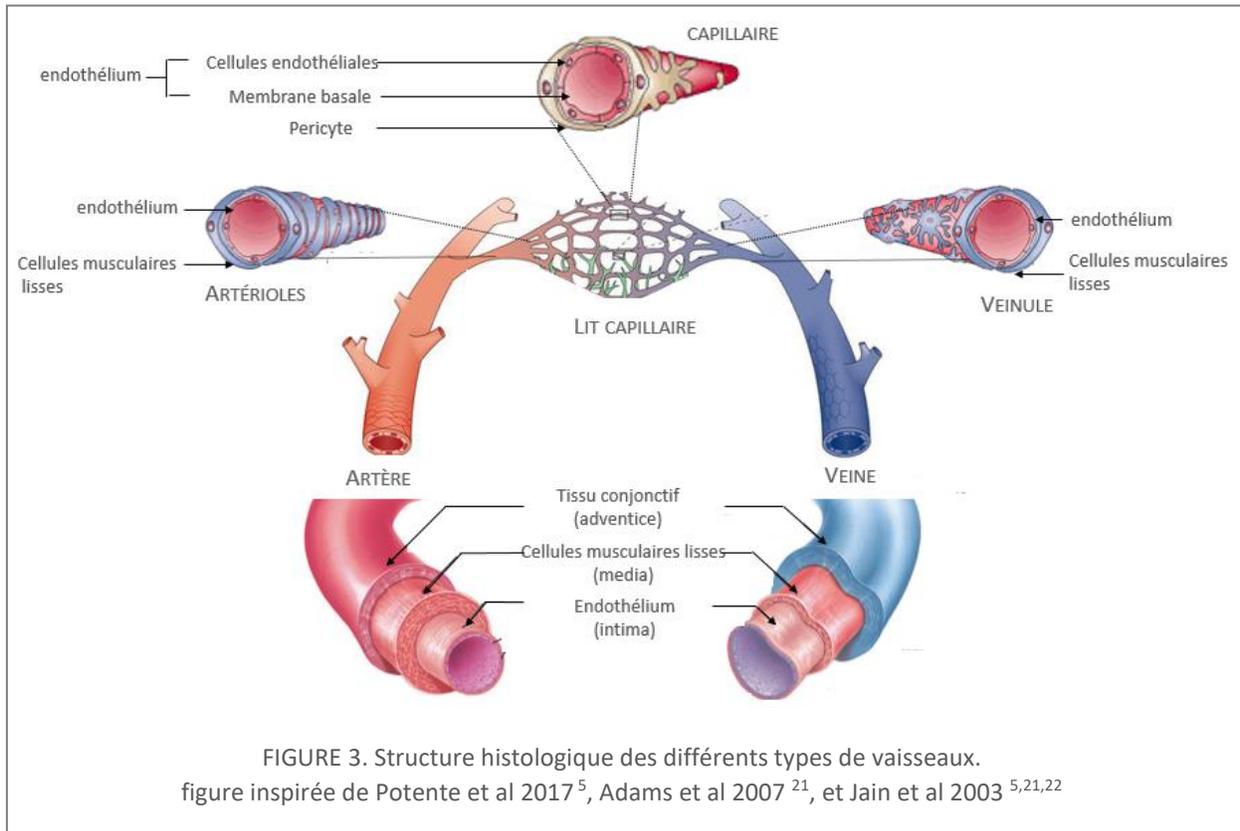


FIGURE 3. Structure histologique des différents types de vaisseaux.
figure inspirée de Potente et al 2017⁵, Adams et al 2007²¹, et Jain et al 2003^{5,21,22}

Le rôle des cellules musculaires lisses est essentiellement contractile. Cela explique un nombre de couches de cellules musculaires lisses plus élevé autour des artères, plus à même de subir de fortes pressions que les veines. Le rôle des péricytes dans les micro-vaisseaux est pour sa part plus complexe. Ils sont en effet impliqués aussi dans la stabilité, la maturation et la fonction des vaisseaux ainsi que dans la régulation de leur formation (figure 3).

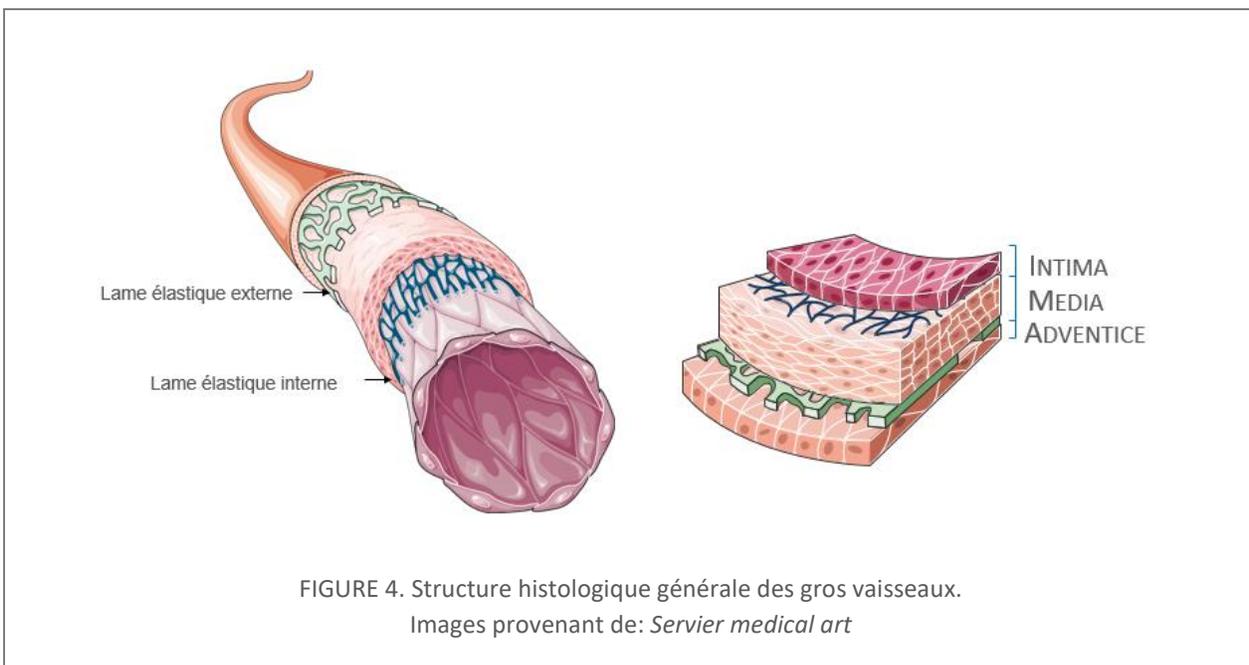
I.2. Types de vaisseaux

I.2.1 Les vaisseaux de gros calibre

Structurellement, plusieurs couches ou «tuniques» composent les gros vaisseaux de l'arbre vasculaire: l'intima, la media et l'adventice (figure 4). Les capillaires quant à eux arborent une structure plus simple facilitant les échanges que nous détaillerons dans la partie suivante.

L'intima, la couche la plus interne, est constituée de l'endothélium, c'est-à-dire des cellules endothéliales reposant sur la lame basale. Cette dernière étant composée classiquement de collagène IV, d'héparane-sulphate protéoglycanes HSPGs, de laminine, d'entactine et de fibronectine²³. Sa composition varie en fonction des tissus.

La Média est l'élément principal des artères. Elle est constituée essentiellement de cellules musculaires lisses entourées de leur matrice extracellulaire. Celle-ci est composée de protéines fibreuses et élastiques (élastine), de faisceaux de collagène, et de protéoglycanes. La Média diffère grandement selon les différents territoires vasculaires. En effet, la présence, la proportion et l'organisation des fibres élastiques comme celles des cellules musculaires lisses varient selon la fonction des vaisseaux.



L'adventice, la couche la plus externe, est constituée principalement de cellules appelées fibroblastes entourées par du tissu conjonctif. Les fibroblastes ont la capacité de produire un grand nombre de protéines matricielles (collagène, fibronectine), l'ensemble formant le stroma. L'adventice contient également des fibres nerveuses et des macrophages²⁴. Cette couche est peu ou très présente dépendamment du type de vaisseaux.

I.2.2 Les capillaires

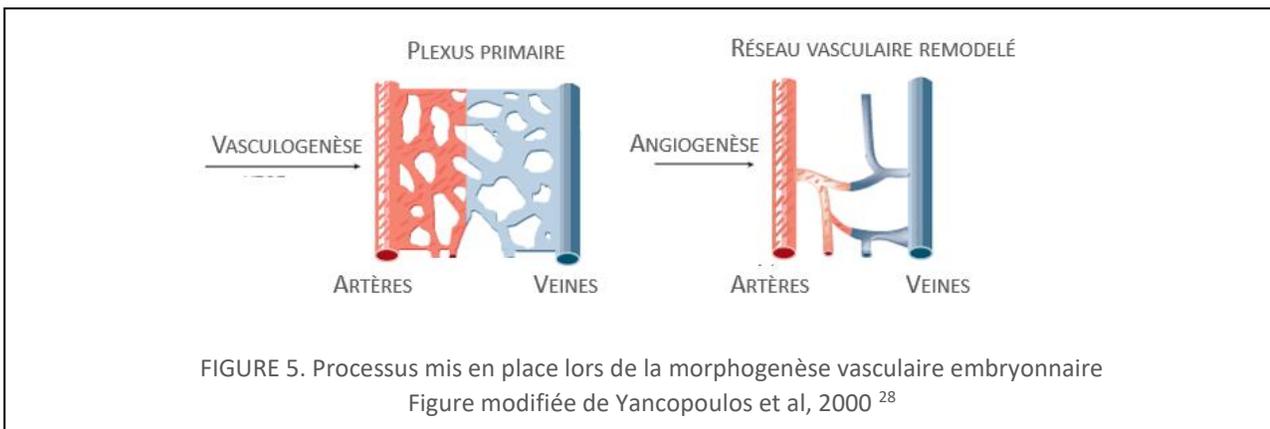
Les **capillaires** sont les vaisseaux les plus fins de l'organisme avec un diamètre compris entre 5 et 10 μm ²⁵. La densité des capillaires varie considérablement selon les besoins des tissus. Elle est en effet de 2500-3000 mm^3 dans le cerveau, le foie ou le myocarde et se trouve inférieure à 100 mm^3 aux niveaux des os, ou des tissus conjonctifs chez l'homme²⁶.

Les capillaires permettent les échanges entre le sang et les tissus vascularisés. De cette fonction découle une structure simple facilitant ces échanges. En effet, on retrouve dans ces vaisseaux, l'endothélium entouré par quelques fibres de collagène IV. L'interaction entre les péricytes et les cellules endothéliales est nécessaire pour la stabilisation des capillaires ainsi que leur maturation. L'étendue de la couverture péricytaire est ainsi un marqueur important de la maturation des vaisseaux²⁷. Les péricytes ont également un rôle très important pour le processus que nous allons décrire dans les parties suivantes; l'angiogenèse, qu'elle soit physiologique ou pathologique.

I.3. Processus mis en place lors de la morphogénèse vasculaire

I.3.1 Vasculogénèse et angiogénèse

La génération de l'arbre vasculaire fait intervenir deux processus majeurs distincts, la vasculogénèse, et l'angiogénèse (figure 5). Le processus de **vasculogénèse** permet la formation *de novo* de vaisseaux sanguins lors de l'embryogénèse.



Ce processus permet la mise en place d'un réseau endothélial dit primitif, qui débute alors que le cœur ne bat pas encore. Le réseau primitif assemblé par vasculogénèse est relativement instable. Il va progressivement être remodelé et s'étendre par division, migration

et assemblage des cellules endothéliales issues des vaisseaux préexistants. Ce processus fondamental s'établit par un mécanisme appelé **angiogenèse**²⁹.

La première description de la croissance *in vivo* de vaisseaux sanguins a été faite par le chirurgien écossais John Hunter. En 1785, il ligatura l'artère indispensable à l'irrigation des bois de daim. Il nota qu'après une première phase caractéristique d'une déficience sanguine (bois froid), le bois redevenait chaud, et il observa de nouveaux vaisseaux qui irriguaient le bois.

De nombreux auteurs lui attribuent l'invention du terme «angiogenèse»³⁰ qui décrit l'ensemble des processus conduisant à la formation (-genèse) de nouveaux capillaires sanguins (-angio) par bourgeonnement de vaisseaux préexistants. C'est un phénomène très actif au cours du développement embryonnaire (figure5), mais c'est un évènement rare chez l'adulte en bonne santé. Par contre, il est important que le corps conserve une capacité de réduction ou d'augmentation du nombre de vaisseaux sanguins face à certaines situations. En cas d'incapacité dans un sens ou dans l'autre, on parle de déséquilibre de l'angiogenèse. Une angiogenèse excessive est fréquemment associée au développement tumoral, et aux maladies néovasculaires de l'œil. On la retrouve également dans un large éventail de pathologies comme l'Alzheimer, l'arthrite et la mucoviscidose. À l'inverse, une angiogenèse insuffisante est observée au niveau des ulcères diabétiques ou des maladies coronariennes. En réalité, un dérèglement de l'angiogenèse participe, à un degré plus ou moins variable, à la physiopathologie de plus d'une soixantaine de maladies.

Il est ainsi important de se concentrer sur l'étude de ce mécanisme en conditions normales afin d'être à même de comprendre les processus de dérèglement et d'affiner et d'améliorer les thérapies ciblant cet évènement.

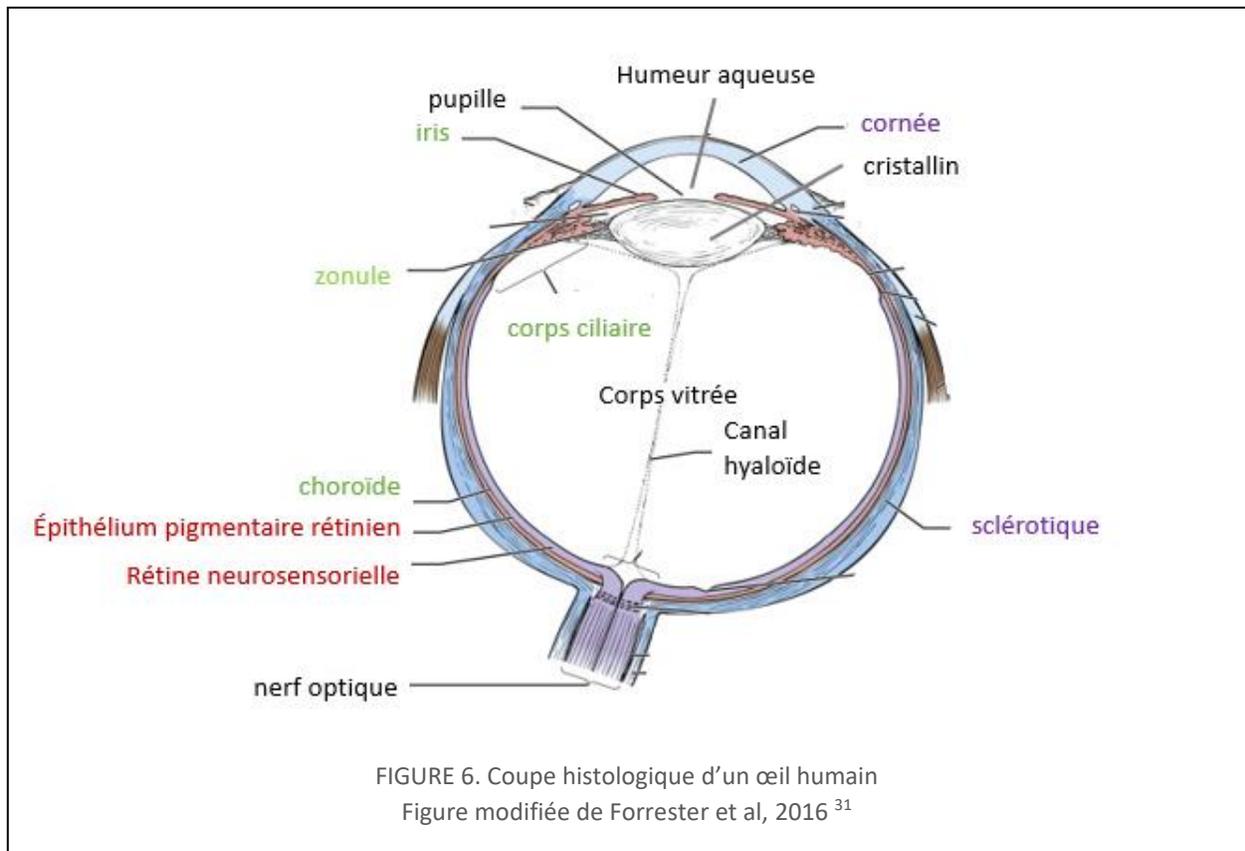
1.3.2 Modèle d'étude de l'angiogenèse

Les méthodes et modèles classiques de la biologie du développement ainsi que de la biologie cellulaire et moléculaire sont utilisés dans le domaine de l'angiogenèse. Cependant, ils sont relativement incomplets et d'autres modèles ont été mis en place pour étudier spécifiquement la formation des néo-vaisseaux. Parmi les modèles *in vivo* spécifiques au domaine de l'angiogenèse on retrouve par exemple celui de la membrane chorioallantoïdienne du poulet (CAM) et celui de la vascularisation rétinienne de souris. Le modèle de la CAM va être développé plus tard dans ce manuscrit, tandis que le développement vasculaire rétinien chez la souris, que nous avons utilisé durant cette thèse, va être présenté dans la partie suivante. Nous présenterons ensuite les grandes étapes qui régissent l'angiogenèse et les mécanismes moléculaires qui la gouvernent.

II. LA RÉTINE, MODÈLE DE CHOIX POUR L'ÉTUDE DE L'ANGIOGÈNE

II.1. Caractéristiques anatomiques de l'œil

L'œil se compose de trois différentes enveloppes, et de milieux transparents. Le contenu de l'œil est constitué par l'humeur aqueuse, liquide nourricier transparent, situé dans l'espace entre le cristallin et la cornée et le corps vitré, gel également transparent, qui remplit l'espace entre le cristallin et la rétine, et qui assure le maintien du volume de l'œil.



L'enveloppe la plus externe, en violet sur la figure 6, la sclérotique, devient transparente sur la partie antérieure de l'œil pour former la cornée. La cornée et la sclérotique forment ensemble une enveloppe fibreuse dure qui protège les tissus oculaires. De plus, ces membranes offrent un soutien structurel important et permettent de contenir la pression interne de l'œil³².

Plus interne que ces enveloppes principalement protectrices, se trouve l'uvée en vert sur la figure 6. C'est la tunique vasculaire composée de la choroïde en arrière et qui se prolonge en avant par le corps ciliaire et l'iris. L'iris est la structure la plus antérieure, c'est un disque circulaire mince, fortement pigmenté qui est composé de muscles lisses. Ces muscles, en contrôlant la forme et le diamètre de la pupille, jouent le rôle de diaphragme.

Dans la continuité de l'iris se trouve le corps ciliaire, sur lequel est maintenu le cristallin par un ensemble de fibres élastiques, la zonule. La tension ou le relâchement de la zonule par les muscles lisses du corps ciliaire modifient la courbure du cristallin, permettant l'accommodation. D'autre part, les cellules épithéliales du corps ciliaire sécrètent des composants de l'humeur aqueuse.

Enfin, la partie postérieure de l'uvée, la choroïde, est une membrane mince de tissu conjonctif lâche, hautement vascularisée et pigmentée. La choroïde entoure la rétine et approvisionne en nutriments la couche pigmentaire de cette dernière³³. De plus, les pigments choroïdes qui tapissent cette membrane et l'assombrissent aident à la vision car cela empêche une réflexion de la lumière indésirable à travers l'enveloppe la plus interne, la rétine.

II.2. Tunique profonde : la rétine

La rétine est la seule membrane sensible aux rayons lumineux; elle est représentée en rouge sur la figure 6. Cette couche, située dans le plan focal du système optique de l'œil, permet la conversion de l'énergie lumineuse de l'environnement en potentiel d'action, qui sera acheminée au cerveau pour être traitée par l'intermédiaire du nerf optique. La rétine tapisse l'arrière de l'œil, recouvrant une surface d'environ 1250 mm²³¹. C'est une fine couche dont l'épaisseur varie selon les espèces³⁴ et en fonction de la distance avec le nerf optique (environ 100 µm en périphérie contre 230 µm proche du nerf optique)³¹. L'extérieur de la rétine se rapporte à la sclérotique tandis que l'intérieur se réfère à la zone proche du corps vitré.

La rétine fait partie du système nerveux central, elle présente ainsi des structures typiques de celui-ci, notamment des cellules neuronales; les neurones bipolaires, amacrine et ganglionnaires. Toutefois comme chaque organe sensoriel, elle arbore des cellules supplémentaires spécialisées. Les récepteurs sensoriels de la vision sont: les photorécepteurs³⁵.

L'étude embryologique permet de subdiviser la rétine en deux couches primaires issues de la couche interne et externe de la vésicule optique comme nous allons le présenter dans la partie II.3. Ainsi, on différencie l'épithélium pigmentaire, de la couche interne neurosensorielle contenant les photorécepteurs (neuro-épithélium).

II.2.1 L'épithélium pigmentaire (RPE)

L'épithélium pigmentaire est une couche simple et continue de cellules épithéliales. De par son origine embryonnaire, le pôle basal de ces cellules est en contact avec la membrane choroïde, tandis que la surface apicale fait face au neuro-épithélium.

L'épithélium pigmentaire ne participe pas directement à la détection ou au transfert de l'information visuelle, mais présente de nombreuses fonctions critiques pour la maintenance de la vision. En effet, l'épithélium pigmentaire permet l'adhésion de la couche neurosensorielle de la rétine tout en assurant un rôle de barrière sélective entre la choroïde et celle-ci. Du côté apical, les nombreuses microvillosités de cet épithélium assurent la phagocytose des photorécepteurs, ainsi que de nombreux échanges et stockages de métabolites, d'ions et de vitamines. De plus, l'épithélium pigmentaire permet également la synthèse de la matrice

présente entre les photorécepteurs. Finalement, l'épithélium pigmentaire permet, à l'aide de granulés de mélanine, l'absorption de l'excès d'énergie lumineuse ainsi qu'une diminution de la dispersion de la lumière³⁶.

II.2.2 La couche neuro-sensorielle rétinienne

On retrouve principalement des cellules nerveuses au sein de cette couche. Parmi celles-ci, on distingue six classes majeures. Il faut toutefois se souvenir qu'au sein de chacune de ces classes il y a une grande variété de sous-types amenant jusqu'à 65 le nombre de neurones différents³⁴. La distribution verticale de ces cellules s'effectue de manière ordonnée et non aléatoire, il en est de même pour l'organisation horizontale³⁷.

En se basant cette fois-ci sur des caractéristiques histologiques, la rétine peut être subdivisée en huit couches distinctes (figure 7). La couche comprenant les photorécepteurs est une des plus profondes de la rétine. La lumière doit donc traverser tous les autres types cellulaires avant de l'atteindre.

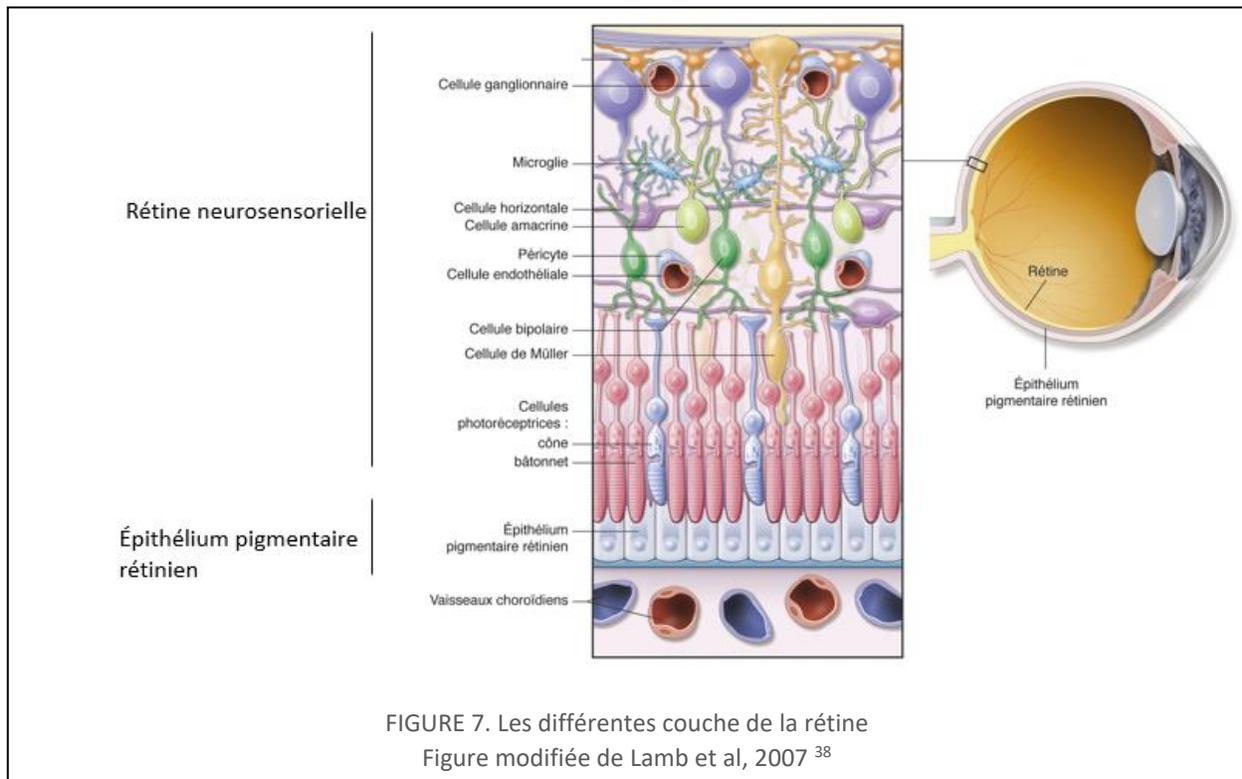


FIGURE 7. Les différentes couches de la rétine
Figure modifiée de Lamb et al, 2007³⁸

Parmi les huit couches de la subdivision de la rétine, on retrouve trois couches principales (couche nucléaire externe, interne et ganglionnaire) dans lesquelles s'organisent les corps cellulaires neuronaux. Elles sont séparées par deux couches intermédiaires (couche plexiforme externe et interne) où se font les connexions par l'intermédiaire des synapses entre les différents neurones. En plus de ces cinq couches, on retrouve la couche de segment externe, l'épithélium pigmentaire dont nous avons parlé dans la section précédente, et complètement

interne, la couche des fibres nerveuses. Cette organisation en couches bien distinctes histologiquement et visible sans marquage est connue depuis 1866 avec les travaux de l'anatomiste Heinrich Muller (1857), du biologiste Max Johann Sigismund Schultze (1866) et de l'anthropologue Gustav Albert Schwalbe (1874)³⁷.

La propagation du signal électrophysiologique est initiée par les photorécepteurs, puis se poursuit vers les cellules bipolaires. Enfin, le signal atteint les cellules ganglionnaires et se poursuit vers le nerf optique. En plus de cette transmission verticale du signal, il y a dans la rétine, des connexions horizontales permettant de moduler cette transmission. Les cellules impliquées dans cette connexion horizontale sont les neurones horizontaux et amacrines.

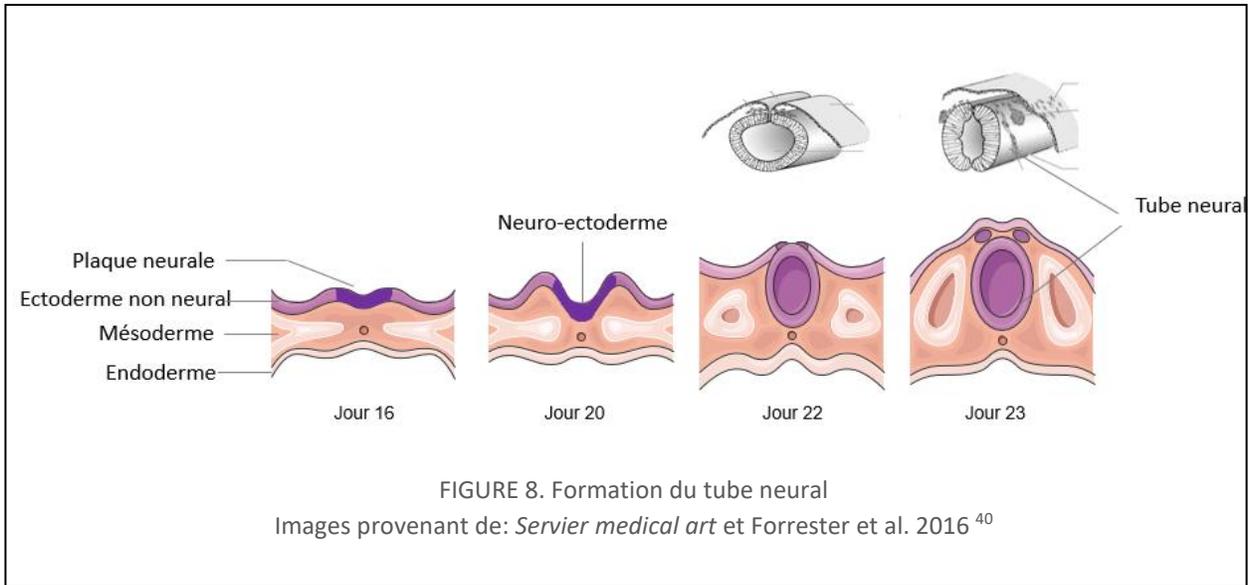
Les photorécepteurs permettent la traduction des influx lumineux en signaux électrochimiques. Leurs noyaux sont localisés au sein de la couche nucléaire externe et font synapses à la couche plexiforme externe avec les neurones bipolaires et horizontaux. Chez l'homme, il existe deux types différents de photorécepteurs, les cônes et les bâtonnets³¹. Les cônes, particulièrement concentrés dans la partie centrale de la rétine, ont une faible sensibilité à la lumière, mais sont les seuls photorécepteurs à être sensibles aux différentes longueurs d'onde permettant la vision en couleur, ils permettent une très bonne résolution et acuité au détriment de la sensibilité. Les bâtonnets quant à eux ont une très forte sensibilité à la lumière, permettant ainsi la vision lors d'une faible luminosité, mais ils ne permettent pas la vision en couleur. Les neurones bipolaires font le lien entre les photorécepteurs et les cellules ganglionnaires et s'étendent de la couche plexiforme externe à la couche plexiforme interne. Les neurones ganglionnaires font synapse à la couche plexiforme interne avec les cellules bipolaires et les neurones amacrines. Les cellules ganglionnaires étendent leurs axones jusqu'à la couche des cellules nerveuses contenant également les fibres de Müller.

La rétine présente le taux de consommation d'oxygène par gramme le plus élevé du corps humain³⁹. En effet, l'intense activité électrique des différents neurones est extrêmement demandante en oxygène et nutriments. Cet apport est assuré par deux réseaux vasculaires qui subissent d'importants remaniements et réorganisations au cours du développement rétinien.

II.3. Développement du réseau vasculaire rétinien

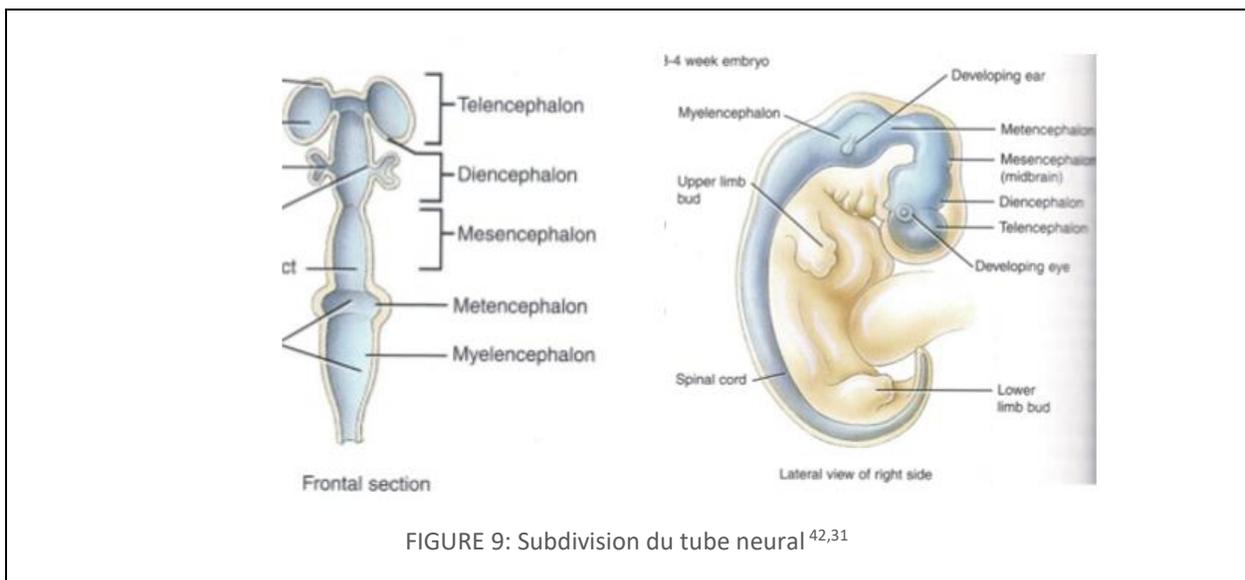
II.3.1 Chez l'homme

II.3.1.1 La rétine, une extension du tube neural (embryologie humaine)



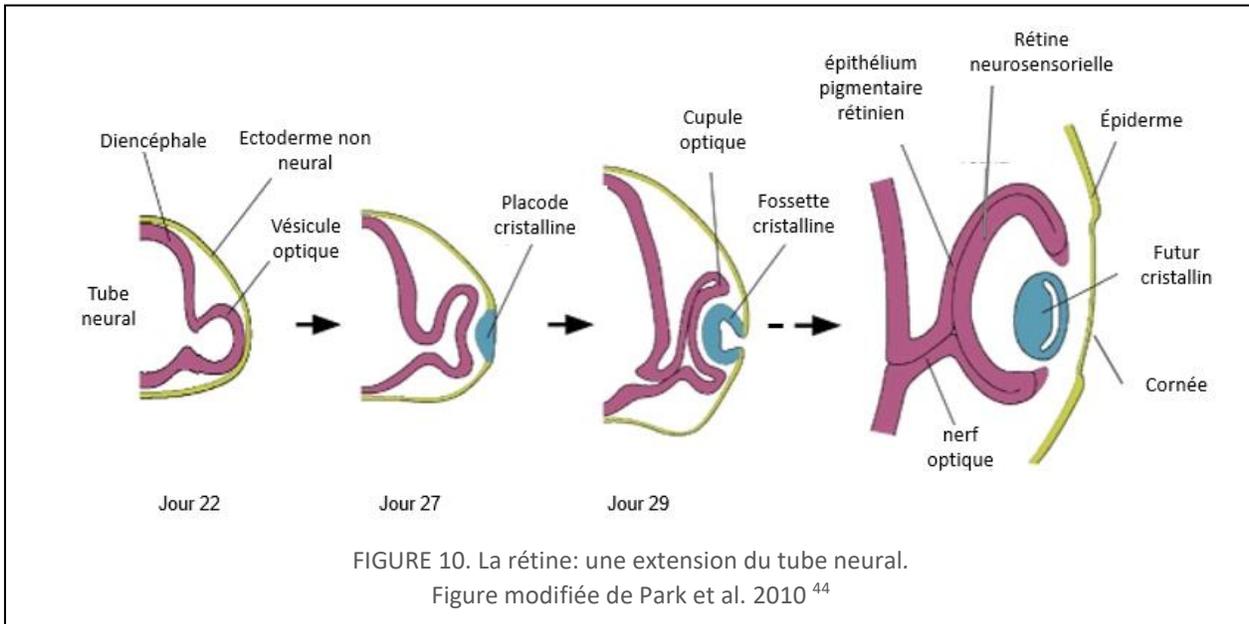
Durant la phase de gastrulation chez l'homme, il y a invagination d'un troisième feuillet embryonnaire primitif, le mésoderme, entre deux déjà existants, l'ectoderme et l'endoderme. Durant cette phase, le futur système nerveux n'est alors qu'une petite couche de cellules aplaties de l'ectoderme, la plaque neurale. Pendant le processus de neurulation représenté schématiquement sur la figure 8, la plaque neurale va se replier vers l'intérieur, s'amincir, et finir par se refermer complètement formant ainsi un tube, le tube neural.

C'est à partir de ce tube que se formeront toutes les structures du système nerveux⁴¹. Vers la quatrième semaine de gestation, la partie antérieure du tube neural s'épaissit localement et forme trois vésicules primaires, qui se subdiviseront en cinq vésicules secondaires: télencéphale, diencephale, mésencéphale, métencéphale et myélocéphale. Nous les présentons sur la figure 9 ci-dessous.



Dès le 22ème jour de gestation alors que l'embryon ne mesure que 2-3 mm et avant même que la fermeture du tube neural ne soit complète, les vésicules optiques émergent de part et d'autre du diencéphale en direction de la surface ectodermique⁴³. À la fin de la quatrième semaine, comme nous pouvons le voir sur le schéma de la figure 10 ci-dessous^{44 38 31}, l'ectoderme qui entoure ces expansions s'épaissit au contact de cette vésicule, forme la placode cristalline puis s'invagine en fossette cristalline. Parallèlement, la partie distale de la vésicule optique va s'incurver et prendre la forme d'une cupule optique. Au début de la cinquième semaine de gestation, la cupule optique continue à s'incurver et accueille la fossette cristalline. Entre les deux, il y a présence d'un tissu qui, en se différenciant, deviendra le corps vitré primitif.

L'ectoderme, la fossette cristalline et la cupule optique contiennent les cellules progénitrices qui vont permettre la formation de quasiment toutes les structures oculaires chez les vertébrés⁴⁵. La partie antérieure de la cupule optique sera ainsi à l'origine de la couche neuro sensorielle de la rétine contenant les photorécepteurs tandis que la partie postérieure se développera en épithélium pigmentaire et nerf optique. La fossette cristallinienne deviendra le cristallin, et l'ectoderme non neural en durcissant sera quant à lui à l'origine de la cornée⁴². La figure 10 ci-dessous illustre les différentes étapes.

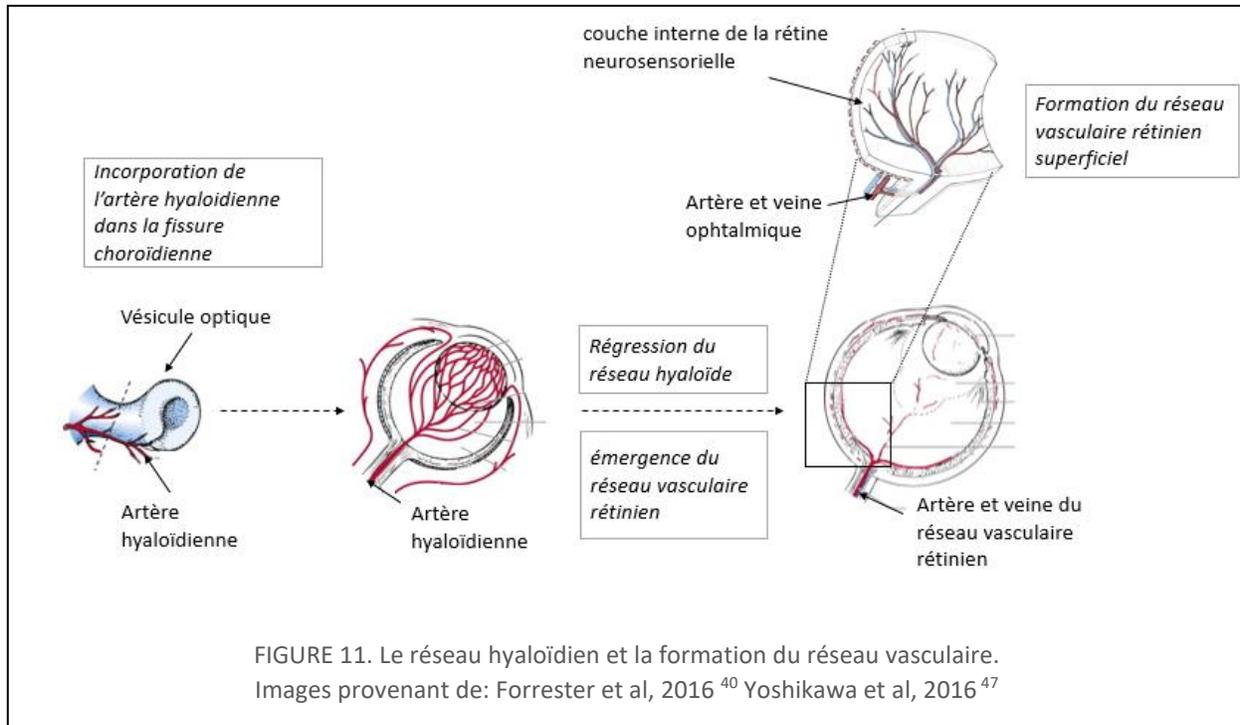


II.3.1.2 Développement du réseau vasculaire rétinien chez l'homme

Chez l'homme, la vascularisation de la rétine débute *in utero*. Comme nous pouvons voir sur la figure 11, lors de la formation de la vésicule optique, il y a incorporation d'une branche de l'artère ophtalmique, l'artère hyaloïdienne dans la fissure choroïdienne, emplacement du futur nerf optique. Avec la croissance de la cupule optique, cette artère s'allonge traverse le corps vitré primitif en empruntant le canal hyaloïdien jusqu'à atteindre l'arrière du cristallin et

permettre son irrigation. Le système hyaloïdien ne présente pas de veine et le drainage veineux se fait par l'avant de l'œil par les vaisseaux de l'uvée.

Durant le quatrième mois de gestation, ce réseau primitif hyaloïdien va régresser au fur et à mesure que se développe le système vasculaire de la rétine. Contrairement à la vascularisation hyaloïdienne, ce réseau contient à la fois des artères et des veines qui entrent et sortent à travers le nerf optique. Ce nouveau réseau se propage dans la couche des fibres nerveuses de la rétine neuro sensorielle, du centre vers la périphérie⁴⁶. Les astrocytes rétiens jouent un rôle important dans cette propagation superficielle.



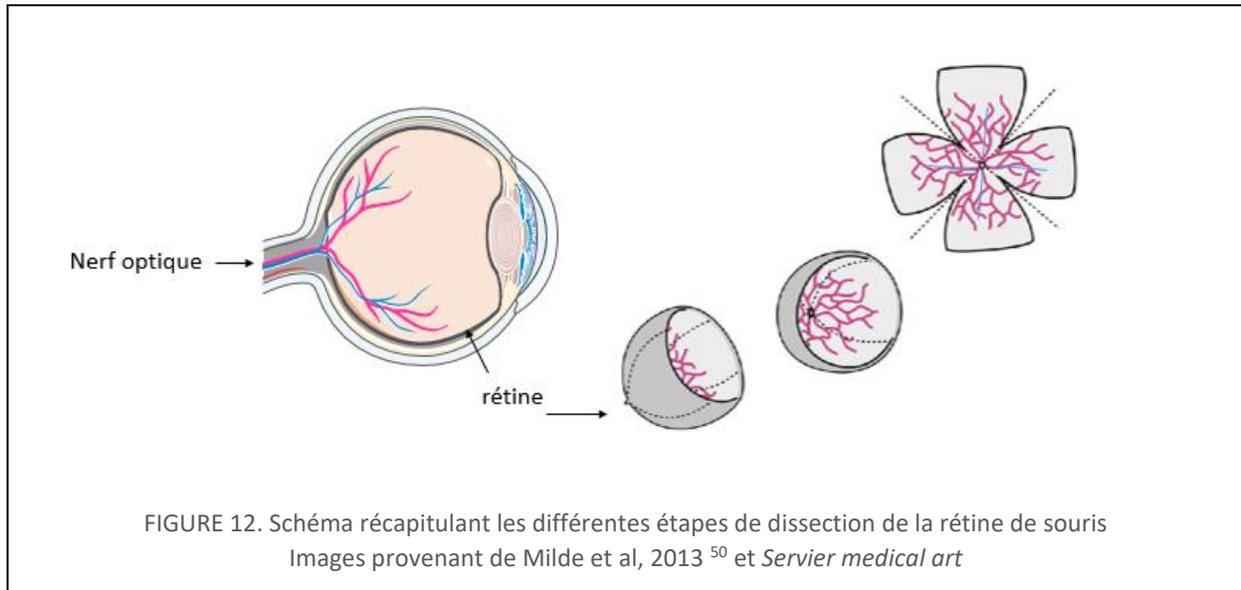
Lorsque le réseau capillaire recouvre l'ensemble de la rétine interne, celui-ci commence à coloniser les couches inférieures d'une manière spatialement et temporellement contrôlée⁴⁸.

Les vaisseaux s'organisent ainsi en trois plexus parallèles interconnectés. Ce réseau permet l'irrigation des deux tiers internes de la rétine tandis que les couches externes (photorécepteurs) sont irriguées par les capillaires choroïdiens³¹. La maturation des vaisseaux choroïdiens est complète autour de 22 semaines tandis que ceux de la rétine mûrissent à 40 semaines, c'est-à-dire à terme⁴⁹. Au moment de la naissance, un nouveau-né à terme présente ainsi une vasculature rétinienne entièrement développée en absence de réseau vasculaire hyaloïdien.

II.3.2 La souris : modèle pour l'étude de l'angiogenèse

Anatomiquement, la rétine est séparée du cerveau mais comme nous l'avons présenté dans la partie embryologie, la rétine est embryologiquement issue de la plaque neurale, elle fait ainsi partie du système nerveux central. Étant la zone du système nerveux central la plus

accessible, elle est devenue un modèle répandu pour l'étude de l'angiogenèse physiologique et pathologique. La figure 12 illustre les étapes de dissection de la rétine de souris.

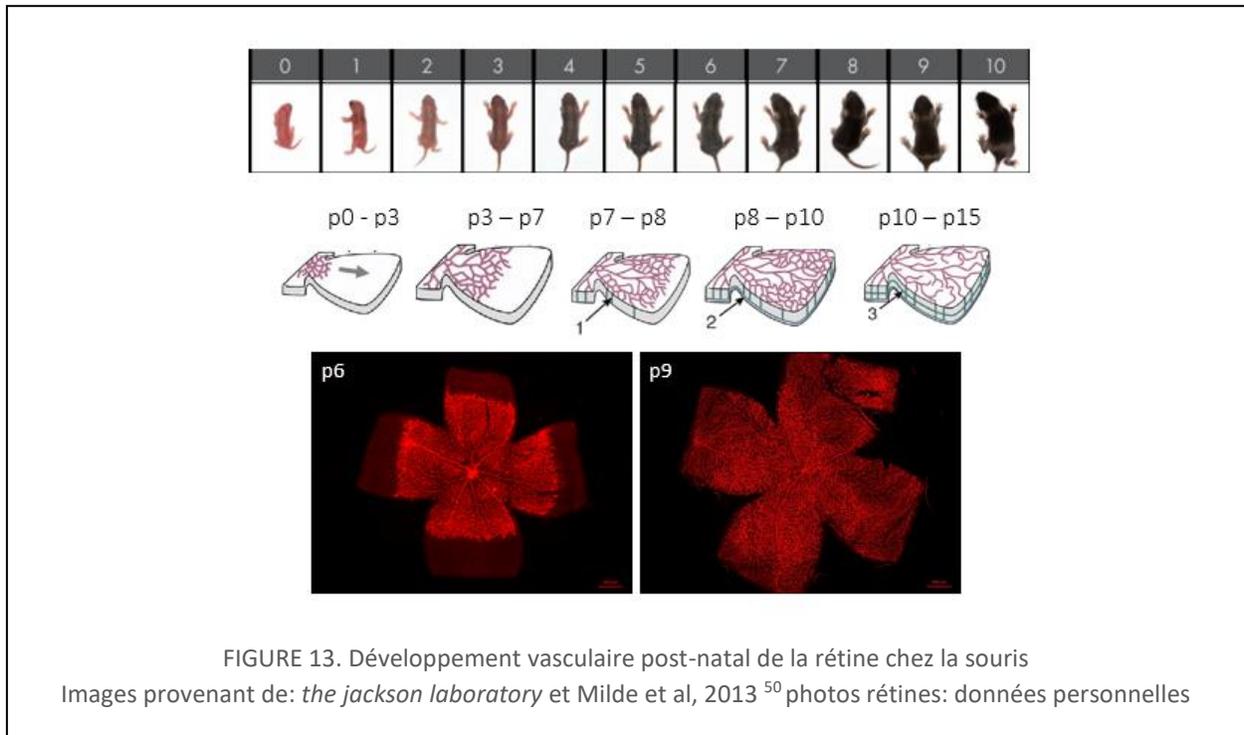


Le réseau vasculaire de la rétine chez l'homme et la souris se développe dans l'ensemble selon le même processus. Mais, alors que la vascularisation rétinienne humaine se développe avant la naissance, la vascularisation de la rétine de la souris se développe par voie postnatale et offre donc un avantage unique à la manipulation expérimentale. Les premières études de la vascularisation rétinienne chez la souris remontent à 1948 avec les travaux de l'ophtalmologiste Isaac Michaelson. Par injection d'un colorant dans le système artériel il a en effet permis la première visualisation des vaisseaux sanguins de la rétine⁷.

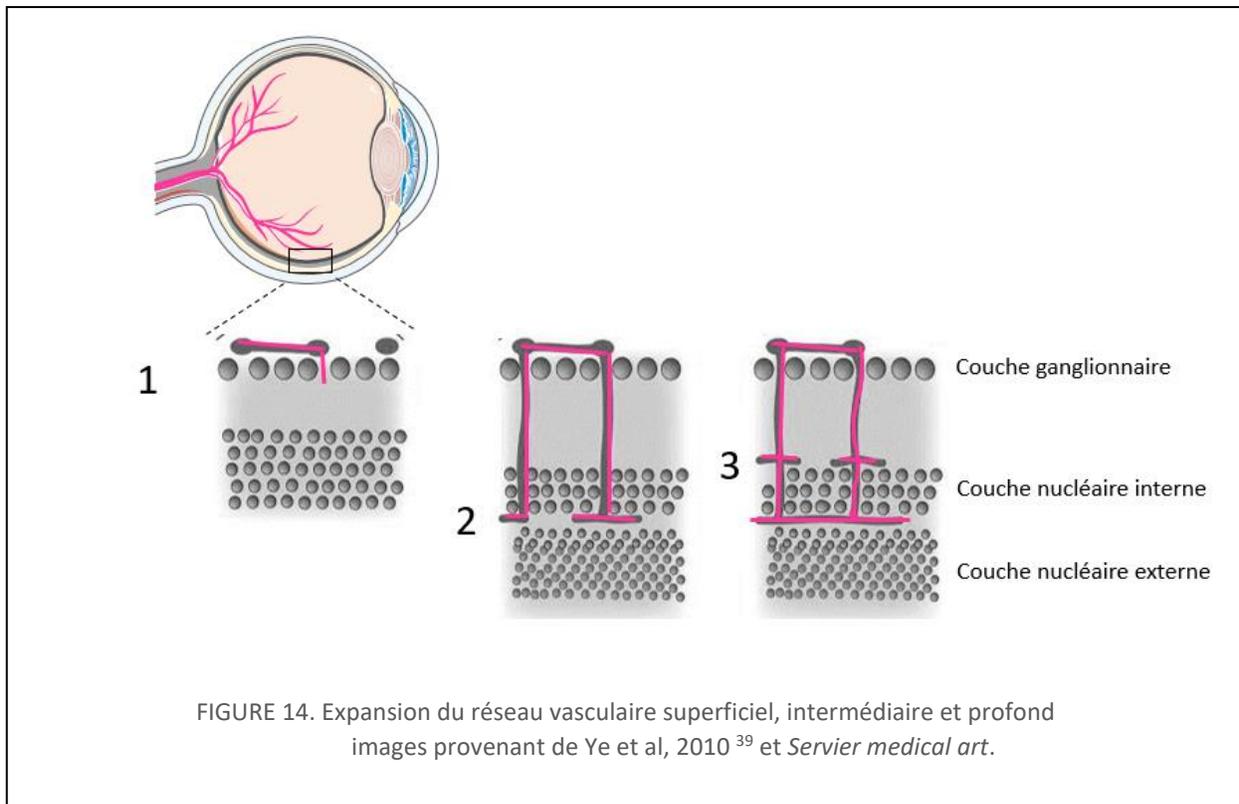
La vascularisation rétinienne de la souris est immature à la naissance avec présence d'un réseau hyaloïdien persistant⁵¹. Le développement des vaisseaux hyaloïdiens s'arrête à partir de 3 jours après la naissance (P3), régressent jusqu'à disparition complète avant 12 jours⁵². Les neurones, ainsi que la lumière extérieure ont été montrés comme moteur pour cette régression hyaloïdienne^{47,52}. Au cours de la première semaine de vie chez les rongeurs, la vascularisation rétinienne se développe à partir du nerf optique et s'étend le long de la couche de cellules ganglionnaires (GCL), formant le plexus vasculaire superficiel. Dès trois jours après la naissance, les vaisseaux centraux non matures vont se différencier en artérioles et veinules, entraînant des modifications morphologiques et l'expression de marqueurs spécifiques. Cette différenciation artério/veineuse s'effectue auprès des vaisseaux centraux tandis que les vaisseaux périphériques restent immatures⁵¹.

Le plexus superficiel horizontal atteint la périphérie de la rétine autour du 7ème jour après la naissance (P7) (figure 13). Les vaisseaux vont alors croître verticalement jusqu'à atteindre la bordure externe de la couche nucléaire interne où ils établissent un second réseau vasculaire entre P7 et P12, dit profond, parallèle au premier mais qui n'est pas associé à celui des astrocytes rétiens⁵³. Un dernier plexus va ensuite être formé, le plexus intermédiaire au niveau de la bordure interne de la couche nucléaire interne. Les trois plexus vasculaires

rétiens sont complètement formés 21 jours après la naissance (figure 14) et s'organisent, un de part et d'autre de la couche nucléaire interne^{48,54,55}.



Le développement de la vascularisation rétinienne chez les souris se déroule ainsi après la naissance (facilitant l'accès aux rétines), et de manière extrêmement régulée spatialement et hiérarchiquement. Ces caractéristiques en font un modèle de choix pour l'étude de l'angiogenèse, la morphogenèse et le remodelage vasculaire. Ce modèle de la rétine a largement contribué à la compréhension de la formation et des mécanismes cellulaires et moléculaires qui gouvernent l'angiogenèse que nous allons décrire dans la partie suivante.

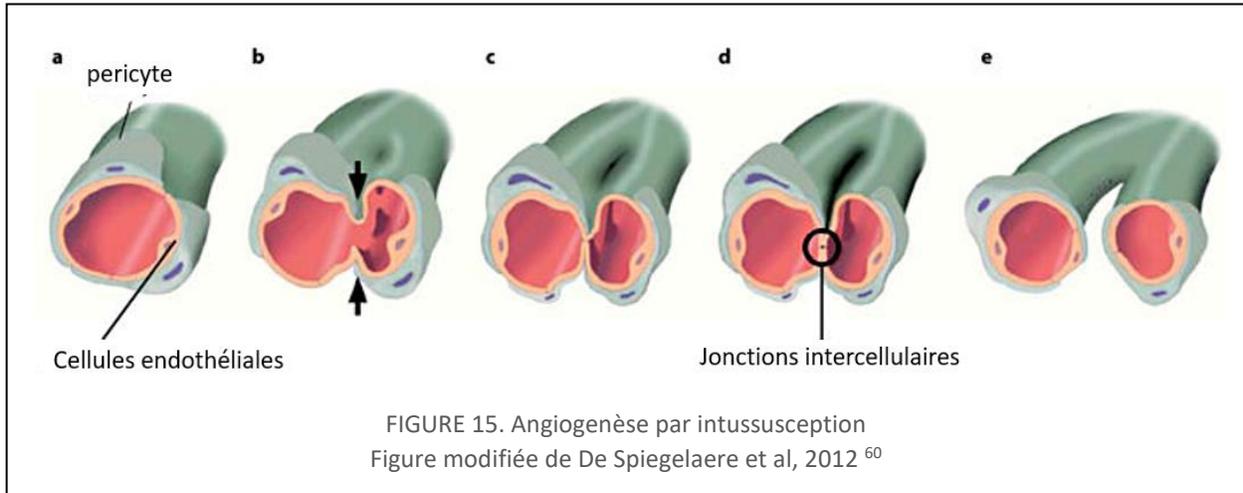


III. MÉCANISME DE L'ANGIOGENÈSE

III.1. Présentation

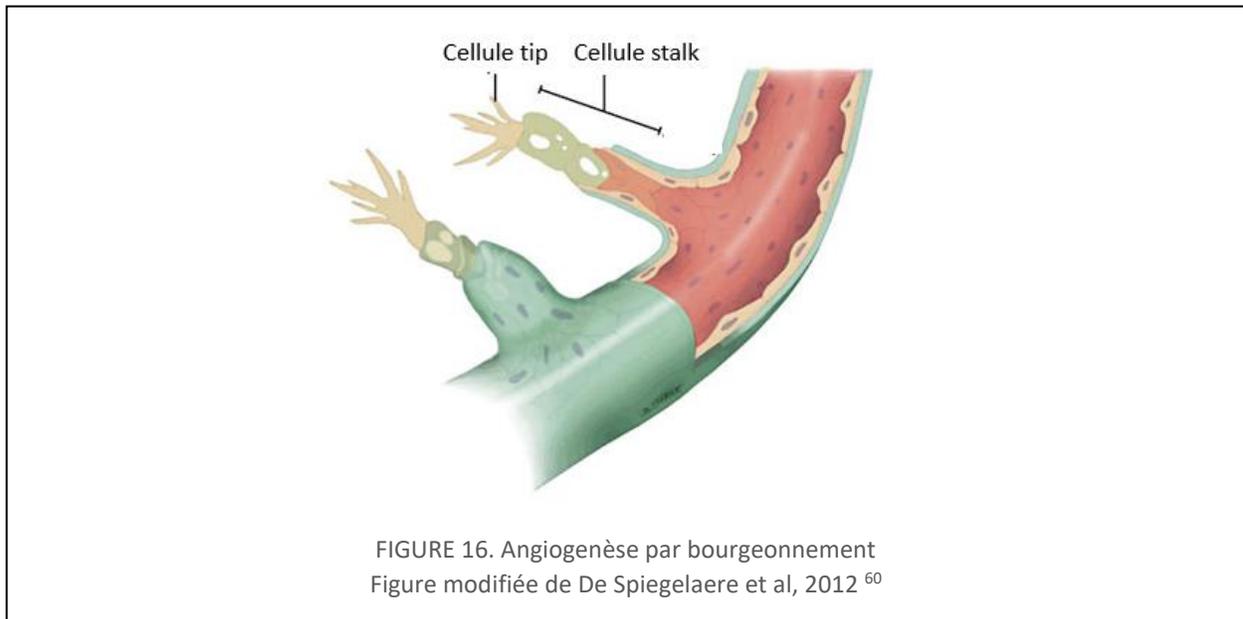
En condition physiologique, l'angiogenèse peut être initiée par deux mécanismes différents, par intussusception et par bourgeonnement. Ces deux mécanismes peuvent avoir lieu simultanément ou indépendamment. Nous allons brièvement présenter l'angiogenèse par intussusception, mais la suite de ce manuscrit se focalisera sur l'angiogenèse par bourgeonnement. L'initiation de l'angiogenèse **par intussusception** a été décrite pour la première fois en 1986 par microscopie électronique lors du développement de la microvasculature post natale des poumons de rat⁵⁶. Comme nous pouvons le voir sur la figure 15, lors de ce processus, c'est la séparation des vaisseaux dans le sens de leur longueur, qui permet la création de nouveaux vaisseaux. Il y a en effet invagination des parois endothéliales opposées d'un vaisseau vers l'intérieur entraînant la séparation de la lumière vasculaire en deux⁵⁷. Une fois qu'il y a contact entre les deux parois, une section intraluminaire est établie, et les deux néo vaisseaux vont se séparer. Le réseau capillaire s'est ainsi développé «en interne». Ce remodelage de l'arbre vasculaire entraîne la formation de vaisseaux de diamètre plus petit que le vaisseau parental, et permet de fortement augmenter les ramifications du plexus vasculaire préexistant.

Ce type d'angiogenèse est mis en jeu dans de nombreux organes (poumon, rein, endomètre, cerveau) ainsi que dans l'angiogenèse tumorale^{58,59}. Contrairement au processus par bourgeonnement que nous allons présenter en détail, le processus par intussusception est très rapide et « économique » car il n'implique pas forcément de prolifération des cellules endothéliales.



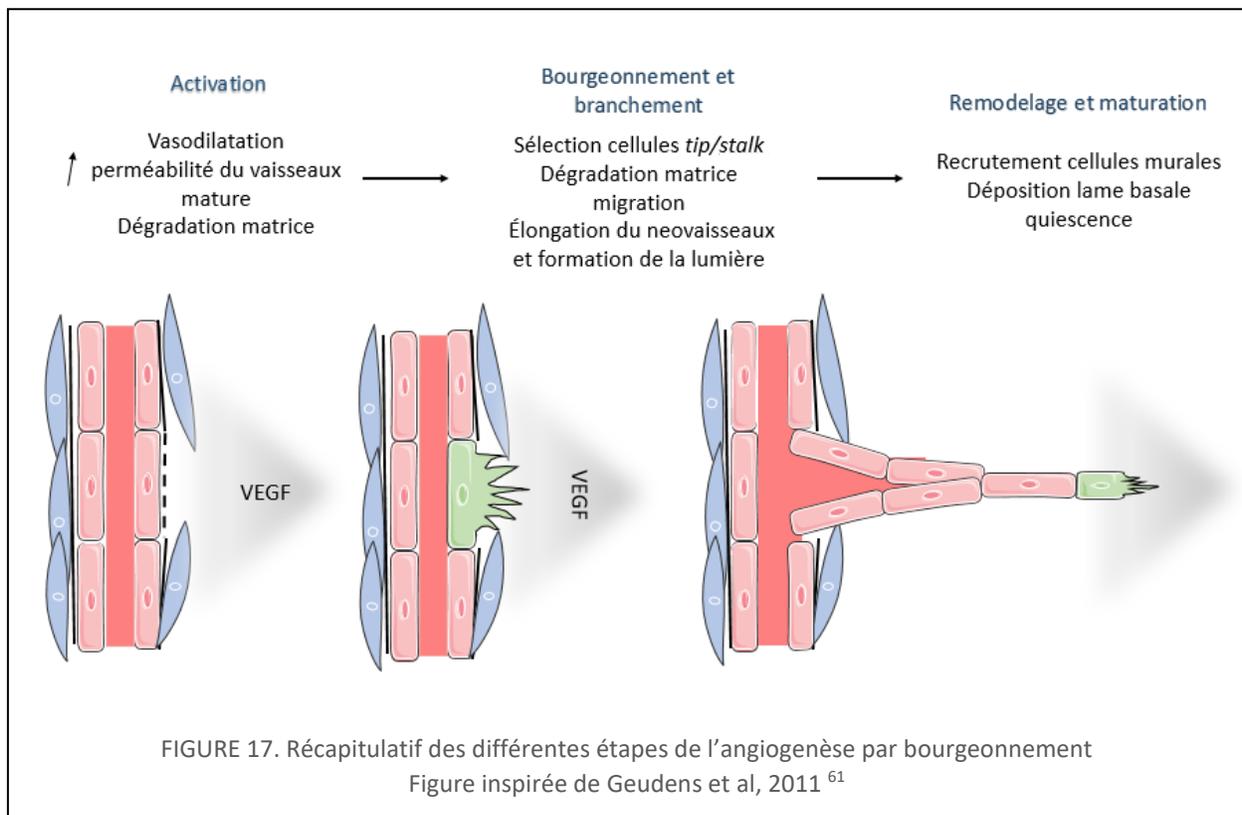
III.2. Angiogenèse par bourgeonnement

L'angiogenèse par bourgeonnement est caractérisée par l'émergence d'une cellule de front (cellule *tip*) à partir d'un vaisseau existant qui initiera la formation de nouveaux capillaires (figure 16). Ce processus s'effectue en réponse à un gradient d'un facteur de croissance des cellules endothéliales vasculaires (VEGF), déclenché par une situation d'hypoxie (niveau réduit en oxygène).



On distingue plusieurs phases lors du processus angiogénique représenté sur le schéma de la figure 17 ci-dessous. Il y a d’abord une augmentation de la perméabilité des vaisseaux ainsi que la dégradation de la membrane basale qui l’entoure. Une cellule endothéliale bourgeonne et migre ensuite vers la source de signal pro-angiogénique, tandis qu’en arrière les cellules prolifèrent et s’organisent en tubes en formant des lumières. Ces tubes sont ensuite stabilisés par recrutement de cellules murales et formation d’une nouvelle lame basale. Les tubes vont former des boucles dans lesquelles la circulation sanguine pourra s’établir.

Nous allons présenter ici les grandes étapes et les principaux facteurs qui régissent ce phénomène d’angiogenèse par bourgeonnement en détail.



III.2.1 De la quiescence à l’activation

En condition physiologique on retrouve le processus d’angiogenèse lors du mécanisme de cicatrisation⁶², lors du cycle menstruel féminin⁶³, de la grossesse⁶⁴, ou encore dans des situations de besoin particulier en oxygène comme au sein des muscles squelettiques en réponse à une activité physique⁶⁵. Hormis ces situations, les vaisseaux sanguins restent quiescents avec un faible renouvellement des cellules endothéliales. En effet, à l’état physiologique chez l’adulte en bonne santé, plus de 99% des cellules endothéliales du corps humain sont maintenues en état de quiescence^{66,67}. Ceci protège les tissus d’une

vascularisation anormale, excessive et aléatoire⁶⁸. Les cellules endothéliales conservent malgré tout une extrême plasticité qui leur permet de réagir rapidement en réponse à des facteurs environnementaux. L'équilibre entre les signaux pro- et anti-angiogéniques est, à ce niveau-là, déterminant. En effet, les périodes d'angiogenèse active se produisent lorsque les cellules endothéliales détectent un changement dans l'équilibre de ces médiateurs. En l'occurrence, dans le cas d'angiogenèse active, ce déséquilibre est en faveur des signaux pro-angiogéniques. Ce phénomène, appelé le *switch* angiogénique, a été proposé par Judas Folkman et Douglas Hanahan en 1989 lors de leurs études sur l'angiogenèse tumorale^{69,70}. Il faut savoir que la recherche moderne sur l'angiogenèse a pris son envol avec les travaux de Judas Folkman sur l'angiogenèse tumorale dès 1971^{71,72}. Par ses travaux pionniers, il a en effet apporté la preuve *in vivo* que l'angiogenèse est un processus crucial pour le développement tumoral et qu'un facteur de croissance diffusible avait la capacité d'attirer les vaisseaux sanguins en formation. Ce facteur est le VEGF que nous présenterons plus tard.

Pendant longtemps le maintien de l'état de quiescence des vaisseaux sanguins a été peu étudié car il était considéré comme un processus passif dépendant uniquement de la présence du flux sanguin. Bien que le débit sanguin soit effectivement important, on sait dorénavant que l'état de quiescence est maintenu par un grand nombre de mécanismes actifs à différents niveaux des vaisseaux sanguins^{73,74}. Cela inclut, les cellules endothéliales, les péricytes, les cellules gliales, les fibroblastes, les cellules inflammatoires, et la matrice extracellulaire⁶⁸. Au niveau des cellules endothéliales, cette stabilité est maintenue par des jonctions serrées et des jonctions adhérentes (impliquant majoritairement les protéines VE-cadhérine et PECAM-1) entre les cellules endothéliales⁷⁵.

Lorsque des cellules sont trop éloignées des vaisseaux sanguins, et se trouvent de ce fait en hypoxie, elles secrètent du monoxyde d'azote (NO) qui induit fortement la transcription du gène *Vegf*²⁹. Ceci entraîne l'augmentation de la perméabilité vasculaire par déstabilisation des jonctions serrées inter-endothéliales. Cette augmentation est dépendante de la redistribution de VE-cadhérine et PECAM-1²⁸. Il s'en suivra la déstabilisation du vaisseau mature par perte de contacts entre les cellules endothéliales et les cellules murales, qui se détachent de la paroi vasculaire sous l'influence de l'angiopoïétine-2 et de son récepteur Tie2⁷⁶.

La présence de VEGF permet également la sécrétion d'enzymes qui vont dégrader localement la membrane basale et la matrice extracellulaire, facilitant d'une part la migration des cellules endothéliales hors de la paroi vasculaire, mais également la libération d'autres facteurs pro-angiogéniques tels que VEGF, FGF-2, TGF β et de cytokines prisonnières de la matrice extracellulaire^{29,77}. Cette dégradation est effectuée par les métalloprotéases matricielles (MMP) et notamment, MT1-MMP, MMP2 ou MMP9⁷⁷. Les collagénases ou encore par l'activateur de plasminogène de type urokinase (uPA) et l'activateur de plasminogène de type tissulaire (tPA) participent également à cette dégradation de la lame basale^{78,79}.

Ainsi, pour que l'initiation de l'angiogenèse par bourgeonnement puisse avoir lieu les vaisseaux matures doivent premièrement être déstabilisés. Ceci s'effectue par le relâchement du contact inter-endothélial, le détachement des cellules de support et la dégradation de la matrice extracellulaire.

III.2.2 La sélection

III.2.2.1 Les cellules *tip*, les cellules *stalk*

L'avancée des travaux de ces dernières années sur l'angiogenèse a permis de mieux appréhender la formation des bourgeons endothéliaux à partir des vaisseaux pré-existants. L'initiation, l'élongation et l'orientation des bourgeons à l'origine des futurs capillaires sont des processus très finement régulés. A chaque bourgeonnement se trouvent en effet deux types de cellules qui diffèrent au niveau de leurs morphologies, de leurs réponses au VEGF, ainsi que dans leurs expressions géniques⁸⁰.

On distingue ainsi les cellules de front, ou cellules *tip* et les cellules de soutien, les cellules *stalk*. La cellule *tip* est située à l'extrémité du néo-vaisseau et permet de guider le bourgeon vasculaire *via* l'extension de nombreux filopodes et lamellipodes vers la source du signal angiogénique. Les filopodes sont des extensions cytoplasmiques dynamiques formées par des faisceaux parallèles serrés d'actine fibrillaire et qui permet à la cellule *tip* d'acquies un phénotype exploratoire et d'activer un processus de motilité cellulaire^{54,81}. Par opposition les cellules endothéliales adjacentes, ou cellules *stalk* sont très prolifératives, ce qui garantit l'élongation du bourgeon vasculaire en arrière^{21,54,82}. C'est sous le contrôle de la signalisation du VEGF et de la voie Delta like-4 (Dll4) /Notch que s'effectue cette spécification endothéliale.

III.2.2.2 VEGF/VEGFR-2

La famille des: «facteurs de croissance des cellules endothéliales vasculaires» comprend plusieurs membres de glycoprotéines de 40 kDa: le VEGF-A, B, C et D et le PlGF pour *Placental Growth Factor* (cf partie II). Le médiateur principal de l'angiogenèse est le VEGF-A nommé simplement VEGF, par la suite.

Le VEGF et son récepteur principal, VEGFR-2, sont exprimés en association spatiale et temporelle avec la plupart des événements physiologiques qui régissent la formation d'un réseau vasculaire puis ceux associés à son remodelage. L'importance du VEGF dans le développement est telle que l'inactivation d'un seul de ses allèles chez la souris provoque une létalité embryonnaire, à 8.5 jours de gestation (E8.5). Aucune vascularisation organisée est observée pour ces embryons à ce stade^{83,84}. Les souris déficientes pour VEGFR-2 meurent in utero au même stade embryonnaire, et les embryons présentent un phénotype similaire⁸⁵.

Les voies de signalisation de VEGFR-2 impliquées au sein des cellules endothéliales au cours de l'angiogenèse, ainsi que les mécanismes de régulation de ces voies seront abordés dans la partie «système VEGF/VEGFR-2: acteurs de l'angiogenèse» de cette introduction. Il faut savoir toutefois qu'il existe d'autres récepteurs au VEGF, notamment VEGFR-1 et VEGFR-3. Leur délétion globale chez la souris est également létale à des stades embryonnaires précoces, E8.5 pour VEGFR-1⁸⁶ et E9.5/10.5 pour VEGFR-3⁸⁷. L'étude des phénotypes des embryons de ces souris a permis de montrer des anomalies sévères de remodelage du plexus vasculaire, illustrant l'implication de ces récepteurs dans le processus de mise en place du réseau vasculaire^{86,87}.

III.2.2.3 La famille Notch

La signalisation Notch est conservée dans l'évolution et joue un rôle central dans la spécification des cellules, leur différenciation et a également des effets pléiotropiques durant le développement embryonnaire et dans la vie adulte⁸⁸. La voie de signalisation Notch est essentielle au développement du réseau vasculaire ainsi qu'à son intégrité. L'importance de cette signalisation est mise en évidence par la sévérité des phénotypes résultant de la délétion des différents acteurs de cette voie (récepteurs, ligands, molécule régulatrice, gène cible) que nous allons brièvement résumer⁸⁹.

Il existe quatre récepteurs de la famille Notch chez l'homme, Notch1-4⁹⁰. Les récepteurs Notch1 et Notch4 sont principalement exprimés au niveau des cellules endothéliales, et ce sont donc eux que nous allons présenter⁹¹. Chez la souris, la délétion homozygote de Notch1 résulte en une létalité embryonnaire à 9.5 jours de gestation avec de sévères anomalies cardiovasculaires et des anomalies majeures de réorganisation du plexus primaire en réseau vasculaire (élargissement des vaisseaux, formation de capillaire, artères, veines)^{91 92 93}. La délétion de Notch1 au niveau de l'endothélium entraîne également la létalité embryonnaire (Notch1^{flox/flox}/Tie2-Cr), et ceci à un stade similaire (E9.5)⁹⁴. Le phénotype vasculaire de ces souris récapitule celui des mutants globaux Notch1 -/-. La délétion de Notch 4 chez la souris n'entraîne pas d'anomalie de viabilité et les souris ne présentent pas d'anomalies majeures⁹⁵. Toutefois, la double délétion de Notch1 et Notch4 provoque une létalité embryonnaire associée à des malformations vasculaires plus sévères que lorsque Notch1 est délété seul, suggérant une compensation de Notch4 lors de la délétion de Notch1⁹⁵. Chez l'homme, des mutations au niveau de Notch1 ont été retrouvées chez les patients souffrant du syndrome d'Adams-Oliver, pathologie associée à de nombreuses anomalies vasculaires et malformations cardiaques⁹⁶⁻⁹⁸.

Les voies de signalisation permettant l'activation de Notch, et plus particulièrement de Notch1 sont cruciales dans l'organisation adéquate du réseau vasculaire. Il est donc important d'approfondir nos connaissances sur ces voies. L'activation de la signalisation Notch requiert le contact entre deux cellules voisines et se fait par liaison avec leur ligand. Chez les mammifères, les plus étudiés sont les protéines transmembranaires de la famille Delta-like (Dll1, Dll3, Dll4) ou Jagged (Jag1, Jag2)⁹⁹. Les cellules endothéliales expriment tous ces ligands à l'exception de Dll3¹⁰⁰.

Dll4 est le premier transcrit à être exprimé durant le développement; il est principalement exprimé au niveau des artères et des capillaires en formations¹⁰¹. La perte d'un seul allèle du gène *Dll4* est létale au stade embryonnaire pour la majorité des souris. Ces souris présentent des anomalies dans le remodelage vasculaire et la différenciation artério-veineuse^{102,103}. Ceci illustre le rôle primordial de Dll4 dans le développement et l'angiogenèse. La délétion de Jagged1 spécifiquement au niveau des cellules endothéliales chez la souris cause principalement un défaut dans le recrutement des cellules murales par activation de Notch3 à leur surface^{104 105}.

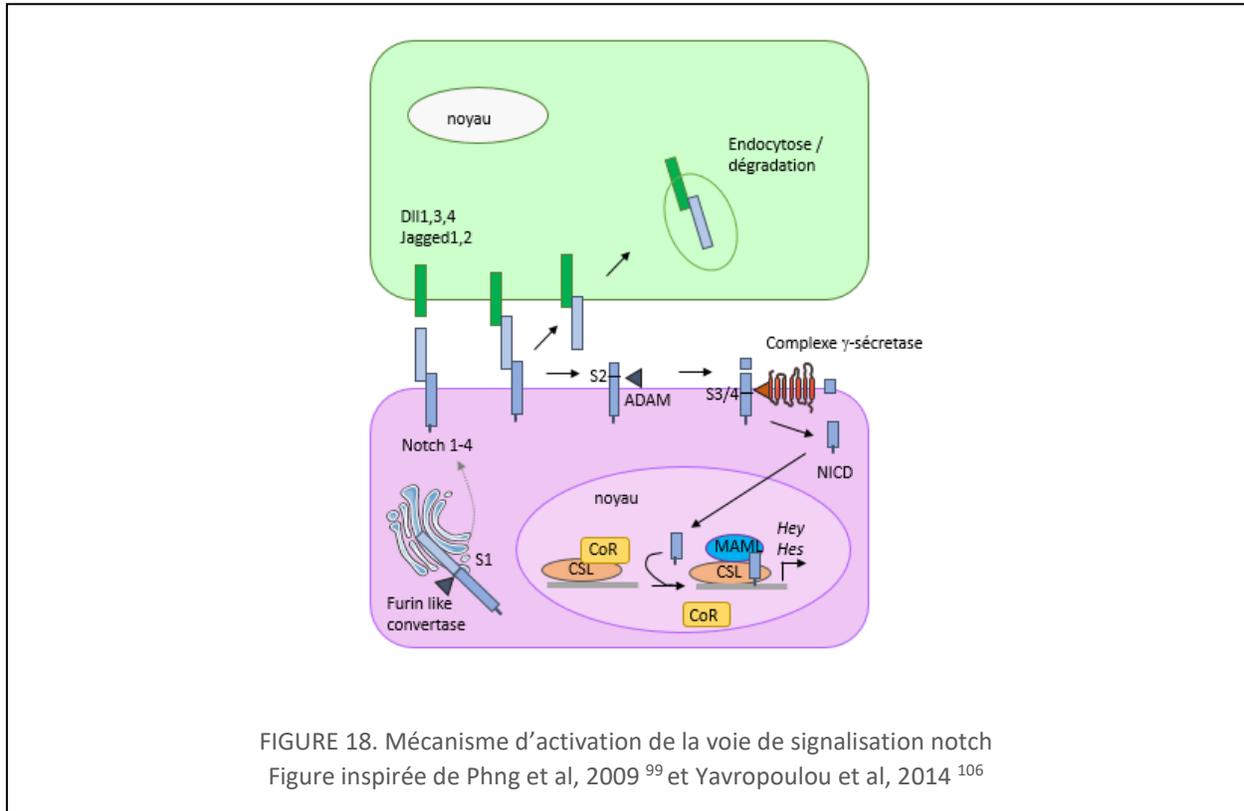


FIGURE 18. Mécanisme d'activation de la voie de signalisation notch
 Figure inspirée de Phng et al, 2009⁹⁹ et Yavropoulou et al, 2014¹⁰⁶

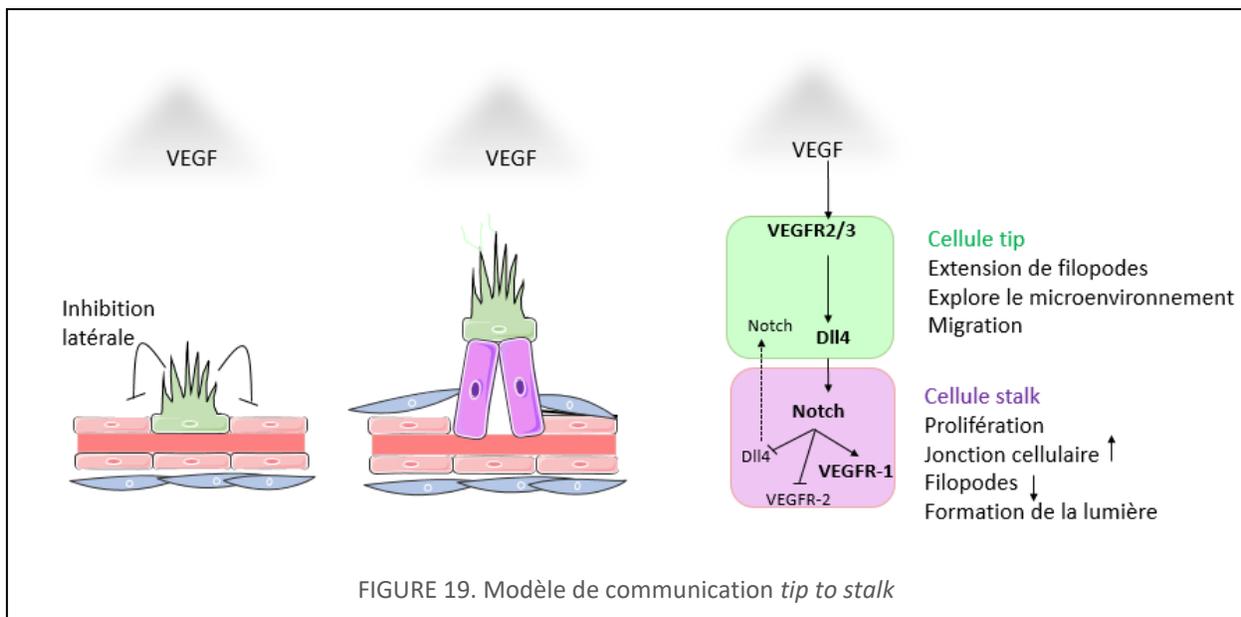
Comme nous le présentons sur la figure 18, la liaison du ligand exprimé par une cellule avoisinante entraîne l'activation de Notch par clivage en deux étapes. D'abord, un clivage au niveau du site S2 par les métalloprotéases ADAM, et en particulier ADAM10. S'ensuit un second clivage critique pour l'activation de Notch¹⁰⁷. Il s'effectue par le complexe γ -sécrétase entre la gly1743 et val1744 (site 3, ou S3) entraînant la libération du domaine intracellulaire de Notch, sa forme active (NICD)¹⁰⁸. Le NICD va ensuite être transloqué dans le noyau où il va agir en tant que co-facteur transcriptionnel en s'associant au complexe RBP-J (CSL chez l'homme). Il faut savoir qu'il n'y a pas d'intermédiaire entre la membrane et le noyau, ainsi il n'y a pas d'amplification du signal, et seul NICD est responsable de l'activation du programme transcriptionnel que nous allons décrire. Lorsque NICD s'associe au complexe transcriptionnel RBP-J dans le noyau, des co-répresseurs (CoR) sont libérés, et il y a recrutement du co-activateur MAML (MAML, MAsterMind-Like protein). Ceci active la transcription des gènes cibles de Notch, comprenant les facteurs de transcription de la famille HEY, HES, NRAP^{109,110}.

III.2.2.4 Le modèle de communication « *tip to stalk* »

La présence de VEGF dans l'environnement induit l'activation de VEGFR-2 exprimé par une cellule endothéliale (figure 19). Cette activation lui assure le phénotype de cellule *tip* et mène à l'expression de Dll4 à sa surface. Le Dll4 nouvellement exprimé par cette cellule provoque une inhibition latérale en interagissant avec le récepteur Notch1 d'une cellule

voisine. En effet, après translocation dans le noyau, le NICD induit un programme transcriptionnel inhibant l'expression de VEGFR-2¹¹¹⁻¹¹⁶, et favorisant l'expression du VEGFR-1, récepteur impliqué dans la séquestration du VEGF disponible¹¹¹. De plus, l'activation de Notch dans les cellules *stalk* aboutit à l'inhibition de DLL4 dans ces cellules^{54,113,117,118}.

De cette façon, les cellules *stalk* présentant une activité Notch deviennent moins sensibles à une stimulation au VEGF, on parle d'inhibition latérale. Cela inhibe le processus de bourgeonnement dans les cellules *stalk*, condition nécessaire au bon déroulement de l'élongation du capillaire^{109,113}. Cette inhibition latérale permet également d'intensifier les petites différences initiales dans la production de DLL4^{111,113,119}. Ainsi, les cellules endothéliales présentant un niveau plus élevé en VEGFR-2 ou DLL4 ont un avantage dans l'acquisition d'un phénotype de cellules *tip*.



Les cellules *tip* expriment des niveaux élevés en DLL4¹¹³ et VEGFR-2, mais également en (PDGF)-BB⁵⁴, UNC5B¹²⁰, Neuropilin-1¹²¹ et MT1-MMP¹²² tandis que les cellules *stalk* expriment préférentiellement VEGFR-1¹²³, Jagged1, Dll1¹²⁴, VCAM1¹¹², et les gènes cibles de Notch. Au niveau des cellules endothéliales, on retrouve *HES1*, *HEY1* et *HEY2*^{89,109,125}. Des analyses transcriptomiques de cellules endothéliales provenant des souris *dll4+/-*, considérées comme enrichies en cellules *tips*, et des micro-array de cellules endothéliales isolées par microdissection au laser ont également montré que les cellules *tip* et *stalk* diffèrent dans l'expression de gènes impliqués dans la dégradation de la matrice extracellulaire, et de celle de facteurs de transcription^{80,126}.

In vivo, l'inactivation de *presenilin1* (PS1), la sous-unité catalytique du complexe γ -sécrétase, est létale embryonnairement, mais à un stade plus tardif que lorsque Notch1 est délété¹²⁷. Par contre, la double délétion de PS1 et son homologue PS2, ainsi que la délétion spécifique de RBP-J au niveau des cellules endothéliales est létale au même stade

embryonnaire que Notch1, Notch1/Notch4 ou DLL4(E9.5)^{127,128}. Ces souris présentent une absence de remodelage vasculaire ainsi que des malformations artério-veineuses.

La délétion de HEY1 n'est pas délétère pour les animaux (pas de défaut de viabilité, de fertilité ou de phénotype particulier)^{129,130}, en revanche la délétion spécifique de Hey2 entraîne des retards de croissance et des malformations cardiaques (hypertrophie massive) associés à une mortalité autour des 10 premiers jours principalement par arrêt cardiaque¹³¹⁻¹³⁴. La combinaison HEY1/HEY2¹²⁹ est quant à elle létale entre le stade E9.5 et E11.5 et s'accompagne de sévères défauts dans le remodelage vasculaire similaire à ceux présentés par les souris Notch1-/-^{129,135}. On retrouve en effet dans ces embryons, des malformations cardiaques, des hémorragies massives, une absence de remodelage du plexus primaire et de différenciation artério-veineuse¹³⁶.

III.2.2.5 Les limites du modèle

Avec l'avancée des études sur l'angiogenèse le modèle de communication communément admis « *tip to stalk* » que nous venons de décrire présente certaines limites.

Les différences de signalisation entre DLL4 et le VEGF entraînent une compétition pour la fonction de *tip* ou de *stalk*. Il faut savoir qu'il a été montré que ce processus est dynamique durant toute l'élongation du capillaire. Ainsi, chaque cellule a le potentiel d'adopter chacun des phénotypes et peut le présenter à différents moments. Cela entraîne un remplacement rapide de la cellule *tip*. Les cellules *tip* et *stalk* échangent ainsi continuellement et dynamiquement leur position^{111,137,138}. Le système s'en trouve alors plus complexe que ce qui était initialement mis en évidence. Ainsi, la cellule *tip* correspond plutôt à la cellule transitoirement à la pointe du bourgeonnement à un moment donné¹³⁷. De plus, il a récemment été montré par une approche mathématique couplée à de l'imagerie en temps réel, que le taux de cellules *tip* semble déterminer la longueur des capillaires, ajoutant un rôle supplémentaire à la cellule *tip* autre que celui de guidage¹³⁹.

L'activation de Notch a été largement montrée comme étant un régulateur négatif de l'expression de VEGFR-2. Toutefois, en recoupant les informations de certaines études publiées, on retrouve des inconsistances. Par exemple, le traitement de cellules endothéliales humaines par un inhibiteur de Notch (DAPT, inhibiteur de la γ -sécrétase) n'entraîne pas de modification de l'expression de VEGFR-2 alors que la sur-expression de NICD ou Dll4 la réprime^{112,140,141}. D'autre part, seule une faible augmentation de VEGFR-2 a été rapportée dans les rétines de souris Dll4+/-, ou après administration d'un inhibiteur de la signalisation Notch (DAPT)^{113,142,143}.

Il faut savoir que Notch régule également l'expression d'autres récepteurs au VEGFs. En effet, VEGFR-1 comme VEGFR-3, exprimés respectivement par les cellules *stalk* et *tip*, sont modulés par la signalisation Notch ce qui complexifie le schéma linéaire *tip to stalk* présenté ci-dessus. Il a été montré que VEGFR-1 et sa forme soluble sVEGFR-1 sont induits par l'activation de la voie Notch^{112,113,142,144}, ce qui entraîne la séquestration du VEGF. Pour ce qui est de VEGFR-3, il semblerait que les voies Notch et VEGFR-2 modulent toutes les deux indépendamment et dans des directions opposées, son expression et son activation¹⁴².

Siekmann *et al.* ont montré *in vivo* chez le poisson zèbre, que l'inhibition génétique de la signalisation Notch conduit à une augmentation de l'expression de VEGFR-3¹⁴⁵. Chez la souris cette répression de VEGFR-3 par la signalisation Notch a également été démontrée^{142,146}. De plus, la combinaison de modèles transgéniques de souris a permis de montrer que la perte de VEGFR-3 entraîne un phénotype hypervasculaire, accompagné de la perte de la signalisation Notch¹⁴⁶. Il faut savoir toutefois que certaines études *in vitro* ont montré que VEGFR-3 est régulé à la hausse par Notch¹¹⁴. Ceci illustre l'importance du contexte dans lequel la signalisation Notch est étudiée.

D'autre part, de récentes études se basant sur le modèle du poisson zèbre par l'équipe d'Arndt Siekmann¹⁴⁷ ou de la rétine du souriceau par l'équipe de Ralf Adams¹⁴⁸ ont permis de montrer que les processus de signalisation associés à la formation de bourgeons endothéliaux semblent directement couplés et modulés par la formation d'artères. Ce processus impliquant le VEGF endothélial et CXCR4 est induit par l'activation de Notch dans les cellules *tip* et non plus dans les cellules *stalk*. Ces études permettent également d'apporter des informations sur le fait que la plupart des gènes enrichis au niveau des cellules *tip* (DII4¹⁰⁹/apelin⁸⁰/Cxcr4¹²⁶) sont retrouvés spécifiquement au niveau des artères, apportant une information sur la dualité de la voie de signalisation Notch (contrôle de la spécification cellule *tip* et de la formation d'artères).

III.2.3 L'élongation

Après son activation, la cellule *tip* va bourgeonner à partir du vaisseau pré-existant et présenter de nombreux filopodes très dynamiques¹⁴⁹. L'utilisation du modèle du poisson zèbre a permis de montrer le rôle crucial des filopodes, non pas dans la sélection de la cellule *tip* ou dans le guidage des néo-vaisseaux, mais dans la migration des cellules endothéliales¹⁵⁰.

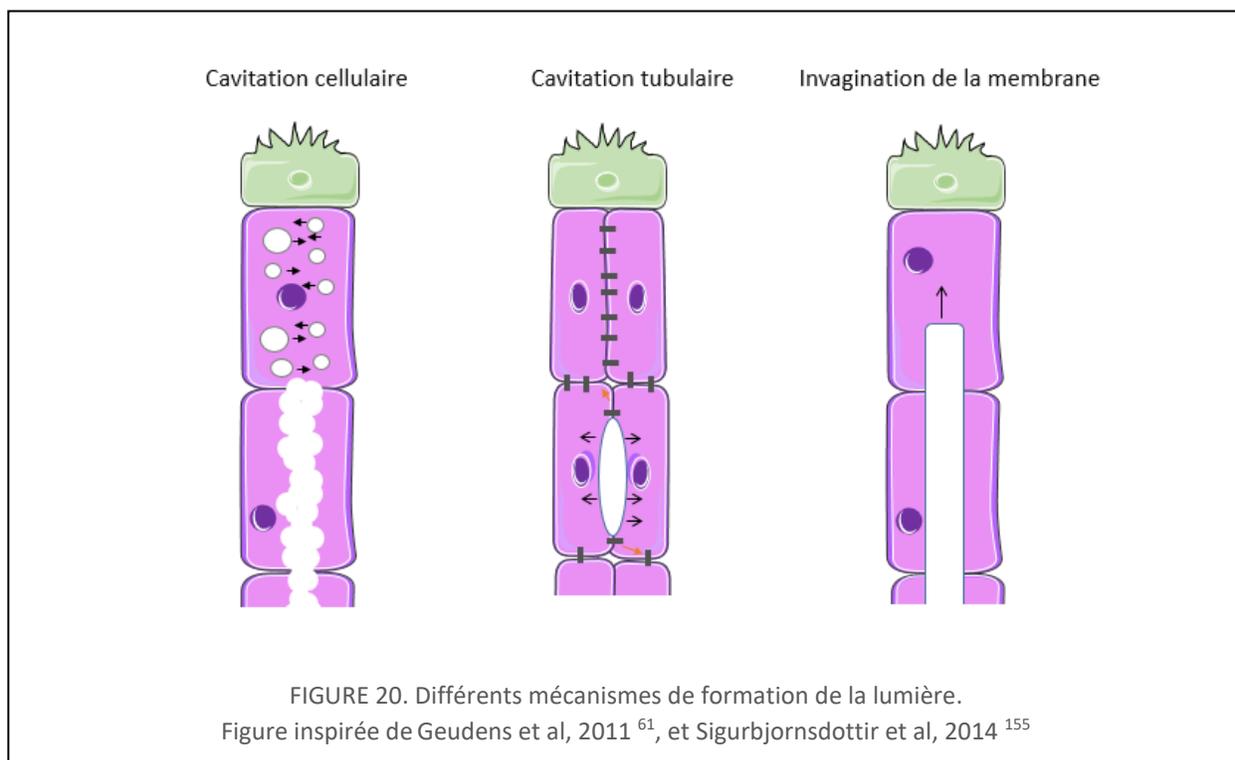
De plus, de récentes études ont permis d'illustrer l'importance du métabolisme énergétique dans la migration de la cellule *tip*. Au niveau des filopodes de ces cellules, la glycolyse est la principale source d'ATP^{151,152}. L'inactivation au niveau des cellules endothéliales de souris d'une phosphatase clé de la glycolyse, PFKFB3 (phosphofructokinase-2/fructose-2,6-bisphosphatase), a permis de montrer un défaut dans l'élongation des néo-vaisseaux. *In vitro*, cette inactivation entraîne également des problèmes au niveau de la migration et de la formation de lamellipodes¹⁵³. La protéine PFKFB3 est cruciale pour la balance entre le comportement *tip* ou *stalk*, soulignant le rôle primordial des phosphatases dans la migration et l'élongation des tubes vasculaires.

La déstabilisation temporaire des liaisons entre les cellules endothéliales tout en maintenant l'intégrité du vaisseau est nécessaire à la bonne élongation du néo-vaisseau. Ceci s'effectue par internalisation d'une protéine spécialisée dans les jonctions intercellulaires endothéliales, la VE-cadhérine. Cette internalisation est gouvernée par des taux élevés de VEGF autour de la cellule *tip*¹⁵⁴. L'activation de la voie Notch permet quant à elle d'inhiber le processus de bourgeonnement au niveau des cellules *stalk*^{109,113}.

III.2.4 La formation de la lumière

La formation de la lumière à l'intérieur du nouveau vaisseau est essentielle car ceci va permettre le raccord du néo-vaisseau, et la fonctionnalisation du vaisseau sanguin. Ce processus reste peu étudié. Il a toutefois été rapporté qu'il existe divers mécanismes distincts aboutissant à la formation de la lumière qui diffèrent selon les types de vaisseaux, la localisation vasculaire, ou le stade de développement. Parmi ceux-ci on retrouve, la cavitation tubulaire (*chord hollowing*), la cavitation cellulaire (*cell hollowing*), et l'invagination de la membrane plasmique¹⁵⁵ (figure 20). Le bon réarrangement des jonctions intercellulaires, l'établissement d'une polarité cellulaire, et la modification de la forme des cellules par réarrangement du cytosquelette sont cruciales au bon déroulement de ce phénomène¹⁵⁶.

La cavitation cellulaire met en jeu des vacuoles intracellulaires formées par pinocytose, c'est-à-dire par invagination de la membrane plasmique à l'intérieur de la cellule, ou directement générées à l'intérieur de la cellule. Ces vacuoles vont ensuite fusionner entre elles puis s'interconnecter avec les vacuoles des cellules endothéliales voisines, ceci permettant la formation de la lumière¹⁵⁶⁻¹⁵⁸. Ce mécanisme est régulé par cdc42, connu pour son rôle crucial dans la polarité cellulaire, et rac1 GTPase, en réponse à des interactions avec la matrice extracellulaire¹⁵⁹.



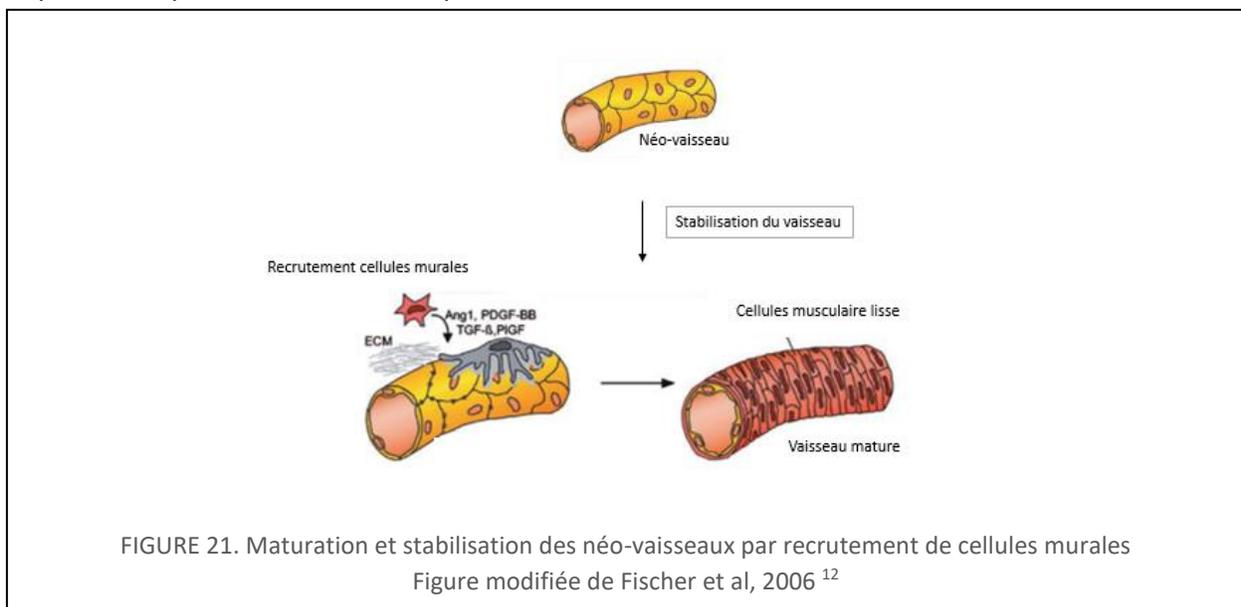
Dans le cas de la cavitation tubulaire, la lumière se forme au niveau du point de contact entre deux cellules endothéliales. Des facteurs tels que CD34 ou le complexe ERM (Ezrine, Radixine, Moesine) vont entraîner cette rupture entre les cellules et impliquer la redistribution des molécules d'adhésion telles que la VE-cadhérine au niveau de la membrane apicale de la

cellule endothéliale^{156,160,161}. Ensuite, les surfaces apicales vont se repousser, et la contractilité de la myosine induit des changements de formes qui étendent le diamètre de la lumière.

D'autres études dans les vaisseaux plus larges ont montré un mécanisme de formation de lumière, par «creusement» ou invagination. Dans cette situation, c'est l'invagination de la membrane apicale déjà existante, qui va permettre l'extension de la lumière et la formation d'un tube unicellulaire creux.

III.2.5 Maturation

L'établissement d'un réseau vasculaire stable, imperméable et fonctionnel nécessite une étape supplémentaire, la maturation des néo-vaisseaux¹². Ce processus nécessite la prolifération et le recrutement des cellules murales (figure 21). Ces cellules libèrent des composants de la matrice extracellulaire (collagène I et élastine) fournissant aux vaisseaux force et élasticité, nécessaires pour répondre aux besoins changeants de la perfusion tissulaire^{22,29}. L'arrêt de la migration et de la prolifération des cellules endothéliales, l'induction de la différenciation des cellules musculaires, la stimulation de la production de la matrice extracellulaire ainsi que le renforcement des liens entre les cellules endothéliales et les cellules murales sont des étapes importantes pour la stabilité et la perfusion des néo-vaisseaux.



D'un point de vue moléculaire, le recrutement des péricytes est contrôlé par PDGFB et son récepteur PDGFR- β ¹⁶². Les cellules endothéliales expriment PDGFB activant le récepteur PDGFR- β exprimé par les cellules murales. Ceci entraîne le recrutement des péricytes sur les cellules endothéliales tout en stimulant leur prolifération et migration. Pour que le recrutement soit correct, il est nécessaire d'avoir une expression adéquate ainsi qu'une présentation spatiale correcte de PDGFB et PDGFR- β . L'inactivation de l'une ou de l'autre de ces protéines induit un défaut majeur dans le recouvrement péricytaire, des dysfonctions vasculaires et des hémorragies induites par l'absence de stabilisation du vaisseau¹⁶². Il a été montré également

que l'intégrine $\alpha_4\beta_1$ et son ligand VCAM-1 exprimés respectivement par les cellules endothéliales en prolifération et par les péricytes sont nécessaires à l'interaction physique entre les cellules endothéliales et les cellules murales pendant la formation des vaisseaux sanguins¹⁶³. La perte de cette interaction empêche en effet la maturation et la stabilisation du vaisseau en formation et induit un processus apoptotique dans les cellules endothéliales et murales¹⁶³.

La signalisation de l'angiopoïétine et son récepteur Tie2 contrôlent également le recrutement péricytaire. Parmi la famille angiopoïétine, angiopoïétine-1 et -2 ont été particulièrement étudiées dans le processus de maturation des vaisseaux. L'angiopoïétine-1 favorise l'interaction entre les péricytes et le tube endothélial, et donc la quiescence, tandis que l'angiopoïétine-2 déstabilise cette interaction, rendant le vaisseau immature. Un vaisseau immature sera plus sensible au VEGF, et donc à l'activation de l'angiogenèse. En fait, les péricytes sécrètent angiopoïétine-1 qui active de manière paracrine le récepteur Tie2 des cellules endothéliales et permet un recrutement efficace des péricytes. Les cellules endothéliales, pour leur part, libèrent l'angiopoïétine-2 qui agit de manière autocrine comme modulateur de cette signalisation.

Toutefois, il a très récemment été montré que cette signalisation pouvait dans certaines situations être bi-directionnelle entre les péricytes et les cellules endothéliales²⁷. Dans cette étude, les auteurs ont montré que les péricytes expriment également un récepteur Tie2 fonctionnel qui est activé par l'angiopoïétine-1 contribuant au recrutement et à la maturation des néo-vaisseaux.

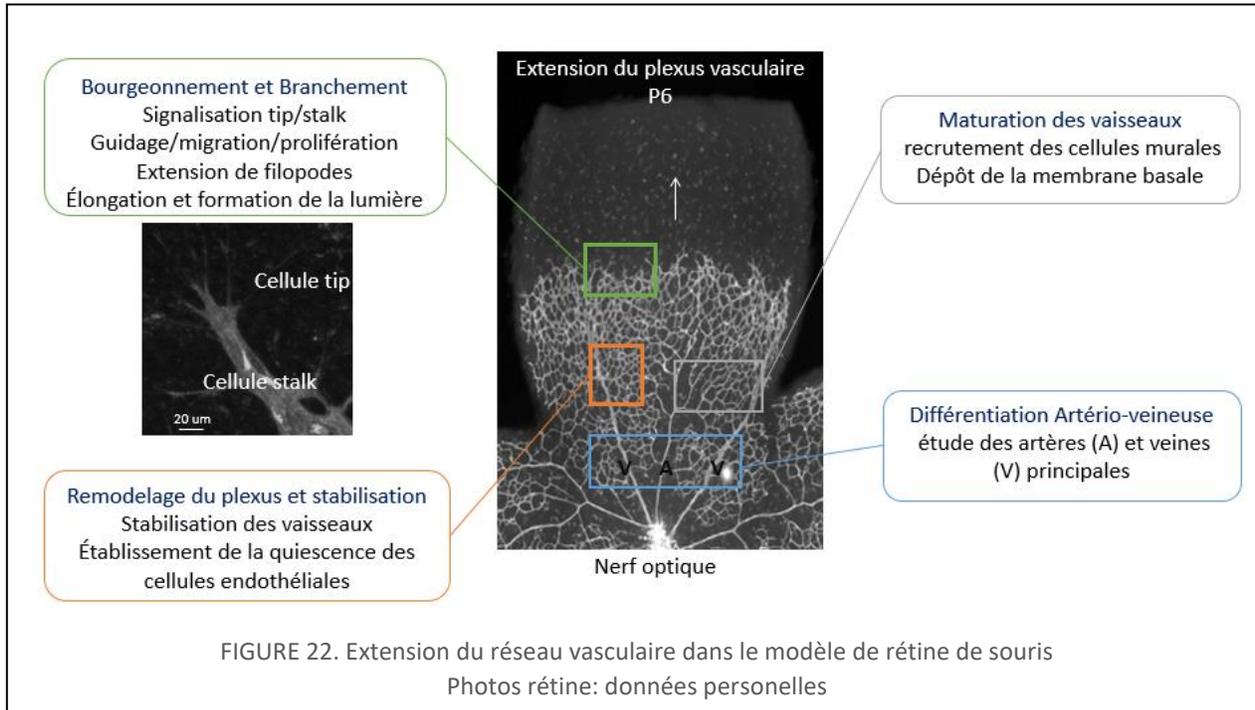
Enfin, les cellules murales nécessitent la présence de la protéine ephrinB2 pour leur association autour des cellules endothéliales. Son absence spécifiquement au sein des cellules murales de souris est létale quelques jours après la naissance. Les mutants ephrinB2 présentent des hémorragies et des oedèmes, anomalies attribuées, non pas à une diminution du nombre de cellules murales, mais à leur organisation autour des vaisseaux causant ainsi des anomalies d'intégrité vasculaire¹⁶⁴. La signalisation Notch est également importante dans la différenciation artérielle des cellules musculaires lisses. Chez l'homme, une mutation au niveau de *NOTCH3* a été identifiée lors de la maladie génétique CADASIL (artériopathie cérébrale autosomique dominante avec infarctus sous-corticaux et leucoencéphalopathie) et associée à la dégénération des cellules musculaires lisses^{165,166}.

III.3. Mécanisme de régulation de l'angiogenèse et implication au niveau du développement vasculaire rétinien

III.3.1 Modèle de la rétine de souris

La vascularisation de la rétine de souris permet d'étudier en un seul modèle les différentes étapes de l'angiogenèse que nous avons décrites dans la partie précédente. Sur la figure 22 ci-dessous, les rétines ont été disséquées 6 jours après la naissance des souris, puis les

vaisseaux ont été marqués à l'aide de l'anticorps primaire Isolectine-B4 qui reconnaît la terminaison du résidu α -galactose exprimé par les cellules endothéliales¹⁶⁷.



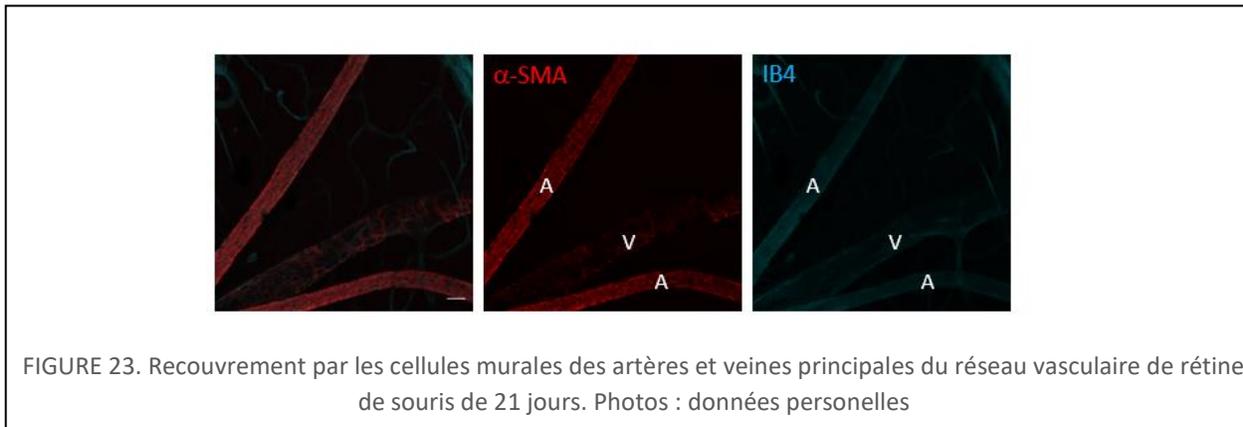
La figure 22 illustre les différents critères qui peuvent être analysés lors de la formation du réseau vasculaire rétinien post-natal chez la souris. Juste après la naissance, le réseau vasculaire s'étend superficiellement du nerf optique vers la périphérie. Il est ainsi possible d'analyser l'extension du réseau vasculaire rétinien à un jour donné, c'est-à-dire l'aire recouverte par le réseau vasculaire sur celle de la rétine.

En observant spécifiquement le front de migration on remarque des cellules qui présentent de nombreux filopodes mais n'ont pas de lumière. Ce sont les cellules *tip*, à la pointe des vaisseaux en formation. En analysant précisément cette zone du plexus vasculaire on peut étudier différents critères permettant d'appréhender les premières étapes de l'angiogenèse, et notamment le bourgeonnement et la **communication tip/stalk**. On peut étudier des critères tels que le nombre, la direction, la longueur des filopodes. On peut également déterminer des anomalies d'élongation ou de formation de la lumière du néo-vaisseau.

Le **remodelage** du plexus peut être étudié en analysant la densité vasculaire aux alentours des veines et des artères principales du réseau vasculaire en formation. La densité du réseau vasculaire global permet également d'avoir une information sur d'éventuelles anomalies de remodelage et d'extension du plexus primaire.

La **maturation** des vaisseaux peut également être analysée dans ce modèle. En effet, au fur et à mesure que s'étend le réseau vasculaire rétinien, le plexus est remodelé à l'arrière. En temps normal, 4 artères et 4 veines principales sont façonnées avant même que le réseau vasculaire atteigne la périphérie. Le recrutement correct des cellules murales sur ces gros

vaisseaux peut être visualisé par co-marquage entre l'Isolectine B4 et α -SMA qui marque spécifiquement les cellules musculaires lisses. Nous montrons sur la figure 23 ci-dessous un exemple de co-marquage effectué sur une souris contrôle de 21 jours. Il est intéressant de noter que, comme nous avons présenté dans l'introduction, les cellules musculaires lisses recouvrent préférentiellement les artères plus que les veines, car celles-ci sont plus à même de subir de fortes pressions.



D'autre part, en quantifiant les artères et les veines principales et en analysant leur ségrégation on obtient des informations sur le processus de **différenciation artério-veineuse**. Un nombre plus faible ou plus élevé d'artères ou de veines ou une superposition entre celles-ci (*shunt*) sont par exemple des phénomènes observés lorsqu'il y a des anomalies de différenciation artério-veineuse.

III.3.2 Participation cellulaire à la vascularisation rétinienne chez la souris

III.3.2.1 Astrocyte et neurones ganglionnaires

Les astrocytes migrent et prolifèrent radialement et antérieurement à la formation des vaisseaux du centre vers la périphérie de la rétine^{168,169} sous l'influence du PDGFA sécrété par les neurones ganglionnaires¹⁷⁰. Les astrocytes forment un maillage riche en fibronectine qui sert de support à l'expansion vasculaire du plexus superficiel^{51,171}. Les astrocytes non innervés, soumis à une hypoxie importante, secrètent du VEGF^{172,173}. Il a été ainsi proposé qu'un gradient de VEGF se crée entre le centre et la périphérie de la rétine qui stimule et guide la vascularisation rétinienne^{54,173}. Toutefois, une ablation génétique ou pharmacologique des astrocytes ne cause pas de modification majeure dans la formation du réseau vasculaire¹⁷⁴⁻¹⁷⁶. Ceci sous-entend que d'autres mécanismes entrent en jeu dans cette régulation vasculaire.

Récemment, l'équipe d'Yoshiaki Kubota a montré que les neurones ganglionnaires ont une expression plus élevée en VEGFR-2, le récepteur principal du VEGF, que les cellules endothéliales elles-mêmes. A l'aide de souris inactivées spécifiquement pour VEGFR-2 au niveau des cellules neuronales (*Vegfr2^{Δneuro}*), ils ont montré une augmentation du VEGF

extracellulaire ainsi qu'un défaut dans son internalisation et sa dégradation. Ainsi, les cellules ganglionnaires ont un rôle crucial dans le développement vasculaire rétinien en séquestrant le VEGF, et en régulant sa distribution spatio-temporelle au sein de la rétine. Ceci permet de guider l'expansion vasculaire et empêche le bourgeonnement vertical prématuré du plexus superficiel¹⁷⁴.

III.3.2.2 Les péricytes et cellules musculaires lisses

L'initiation de l'angiogenèse par bourgeonnement nécessite le détachement des péricytes pour permettre la migration des cellules endothéliales. Plus tardivement, le recrutement des péricytes et des cellules musculaires lisses par les néo-vaisseaux est essentiel au processus de maturation et de stabilisation du réseau vasculaire. Ceci illustre le rôle central de la communication entre les cellules murales et les cellules endothéliales.

Au niveau de la rétine, l'injection intra oculaire de PDGF-B, le facteur important dans le recrutement péricytaire dont nous avons parlé dans la partie précédente, entraîne le détachement des cellules murales¹⁷⁷. En contrepartie, l'administration d'un anticorps bloquant anti-PDGFR- β induit des anomalies de remodelage vasculaire rétinien en plus d'un mauvais recrutement péricytaire.

III.3.2.3 Les macrophages/ la microglie

Les macrophages, dont le rôle est largement connu dans la réponse immunitaire et inflammatoire, ont progressivement été décrits comme impliqués dans la régulation de l'angiogenèse, qu'elle soit positive ou négative¹⁷⁸⁻¹⁸⁰. Ils l'induisent par la sécrétion de facteurs pro-angiogéniques ainsi que par dégradation de la membrane basale et de la matrice extracellulaire. Les macrophages sont retrouvés au niveau de la rétine de souris avant même le début de la vascularisation¹⁸¹.

La délétion pharmacologique des macrophages a pour conséquence, une diminution de la densité du réseau vasculaire rétinien chez le rat. Cette délétion des macrophages résidents (présents en permanence dans les tissus), ou systémiques est effectuée respectivement, par injection intravitréenne ou intrapéritonéale de liposomes contenant du clodronate¹⁸².

Ce même phénotype, avec diminution du nombre de branchement dans le réseau vasculaire est retrouvé dans les rétines de souris dépourvues de macrophages (*csf-1op/op*). Dans ces souris, l'équipe de Yoshiaki Kubota a montré une diminution dans l'expression des métalloprotéinases MMP-2 et MMP-9, protéases qui agissent par dégradation de la membrane basale¹⁸³. De plus, il a été montré dans ces souris délétées en macrophages une diminution du nombre de filopodes¹⁸¹. Des études complémentaires ont permis de montrer qu'il existe une interaction étroite entre les macrophages et les cellules endothéliales, qui faciliterait la liaison entre deux bourgeons voisins neo-formés permettant la formation de branchements par effet paracrine et ou juxtacrine (*pruning*)¹⁸⁴. Les macrophages interagissent également avec les péricytes¹⁸⁵.

Une équipe a montré à l'aide de souris *LysMcre;Notch1^{flox/flox}*, dépourvues de Notch1 dans les macrophages, que l'activation de la signalisation Notch au sein des macrophages est nécessaire pour leur recrutement et leur localisation au niveau des cellules *tip* et des points de branchement vasculaire rétinien. Les vaisseaux rétiniens de ces souris sont en effet caractérisés par de longs filopodes qui ne se connectent pas entre eux et par l'absence de macrophages au niveau des cellules *tip*¹⁸⁶. Il semblerait ainsi que les cellules *tip* expriment du Dll4 qui activerait la voie Notch des macrophages environnant leur donnant ainsi un rôle de connecteur entre deux cellules endothéliales¹⁸⁶.

En 2011, d'autres travaux ont montré l'implication des macrophages dans l'angiogenèse, mais cette fois-ci par une action d'inhibition. Cette inhibition s'effectue par l'intermédiaire de la voie Wnt-Flt1¹⁸⁷, et prend place au niveau des zones de changement de direction nécessaire à la formation des couches profondes du réseau rétinien. Selon ces auteurs, les macrophages sécrètent le récepteur sFlt1, en réponse aux Wnt. sFlt1 est un récepteur soluble du VEGF, et semble piéger le VEGF environnemental. Il empêche ainsi son action angiogénique sur les cellules endothéliales voisines.

III.3.1 Participation moléculaire à la vascularisation rétinienne chez la souris

III.3.1.1 VEGF

Au niveau des rétines, le VEGF est produit et sécrété par les cellules de Müller, les cellules de l'épithélium pigmentaire, ainsi que les astrocytes¹⁸⁸.

Il est important de noter que le VEGF est sujet à un épissage alternatif générant différents isoformes (cf partiell). Les formes majoritaires sont le VEGF121, 165 et 189 chez l'homme, et respectivement VEGF120, 164 et 188 chez la souris. Ces différents isoformes vont contenir ou non un domaine de liaison aux héparanes sulfate protéoglycanes de la matrice extracellulaire les rendant plus ou moins solubles et diffusibles¹⁸⁹. Ceci permet la formation d'un gradient spatial de VEGF dans la rétine nécessaire à la régulation de l'élongation des vaisseaux ainsi qu'à la densité des capillaires¹⁸⁹.

Le VEGF121 diffuse librement et peut agir sur de longues distances. Le VEGF165 peut médier ces effets sur des distances courtes, comme sur des cellules distantes. Le VEGF189 lié à la matrice extracellulaire permet la mise en place de signaux uniquement à courte distance.

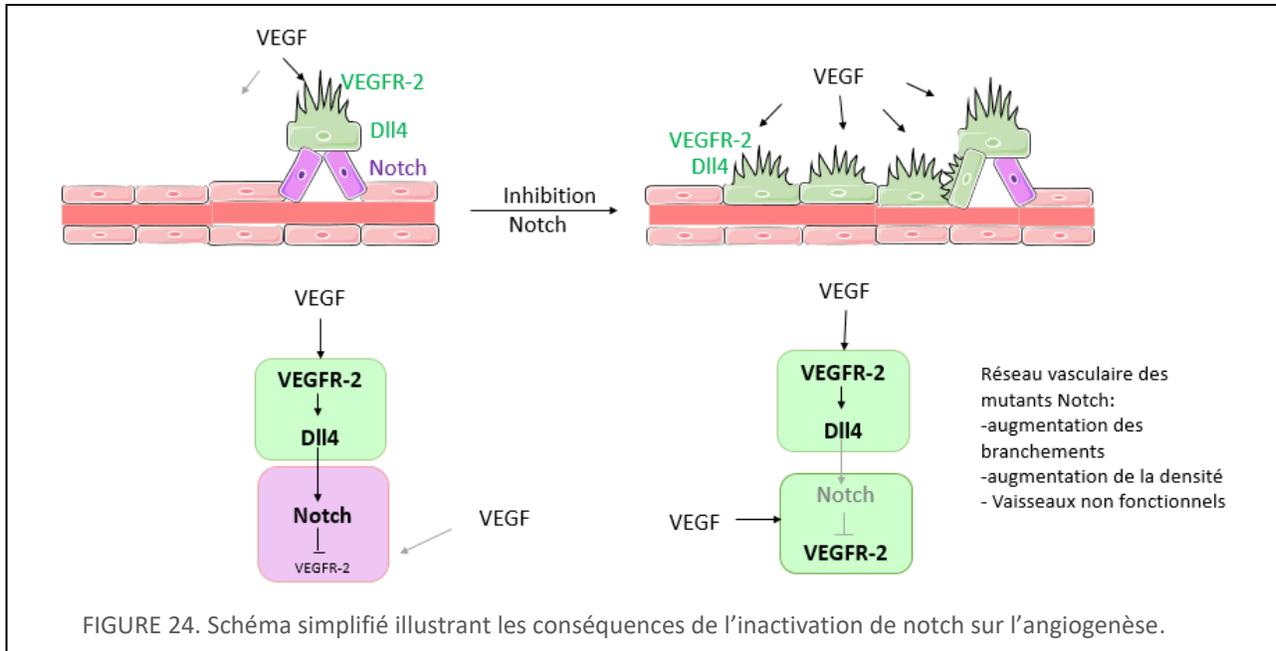
L'isoforme 165 est la plus abondante et est essentielle au processus d'angiogenèse. En effet, sa seule réactivation chez les souris KO VEGF^{-/-} suffit à rétablir la viabilité des souris, et permet un développement vasculaire rétinien similaire aux souris contrôle^{83,84,190}. L'expression exclusive de VEGF 120 entraîne la formation de vaisseaux très larges mais qui ne parviennent pas à former de branchements^{189,190}. Le phénotype inverse est retrouvé dans les souris exprimant exclusivement le VEGF 188, c'est à dire une profusion de vaisseaux très fins, associé à un excès de ramifications¹⁹⁰.

L'absence de VEGFR-2 chez la souris entraîne la mort embryonnaire, mais sa délétion spécifique et conditionnée au niveau des cellules endothéliales après la naissance, a permis

d'étudier le réseau vasculaire de ces souris (*Vegfr2*floxed/floxed/*VEcad*-CreERT2/+). En absence de VEGFR-2, les auteurs ont rapporté une diminution du processus de bourgeonnement, du nombre de filopodes ainsi que de la densité vasculaire, illustrant la perte de sensibilité au VEGF des cellules endothéliales¹⁴². Le phénotype inverse a été reporté dans les souris délétées spécifiquement au niveau des cellules endothéliales et conditionnellement pour VEGFR-1 (*Vegf*-1flox/flox/*Rosa26*CreERT2/+)¹⁹¹.

III.3.1.2 Conséquences d'anomalies de la signalisation Notch dans la vascularisation rétinienne

Comme nous avons vu précédemment, la voie de signalisation Notch est essentielle à l'inhibition latérale entre la cellule *tip* et *stalk*. La liaison de Notch avec son ligand Dll4 exprimé par la cellule *tip* entraîne son activation par la γ -sécrétase au niveau des cellules *stalk* (cf figure 18). Ceci va entraîner un programme transcriptionnel aboutissant à l'inhibition des récepteurs au VEGFs (VEGFR-2/R-3¹⁹²) dans ces cellules. Par conséquent, elles seront moins sensibles au VEGF environnant et arboreront ainsi un phénotype de cellules *stalk*. Compte tenu de l'importance de la voie Notch dans la limitation d'un comportement *tip*, son inhibition pharmacologique par le DAPT qui inhibe la γ -sécrétase, ou génétique (souris *dll4*+/-)¹⁰² conduit en une réponse accrue au VEGF caractérisée par la formation d'un réseau vasculaire extrêmement dense et ramifié, associé à une production anarchique et excessive de filopodes par les cellules endothéliales^{109,113,115,117,145,193,194} (figure 24).



Les structures vasculaires formées par ces cellules endothéliales n'ont généralement pas de lumière, générant des structures excessives mais peu fonctionnelles^{117,194,195}. Les souris

délétées spécifiquement pour DLL4 au niveau des cellules endothéliales présentent elles aussi un réseau vasculaire très dense et anormalement riche en cellule *tip*.

Jagged1 est un autre substrat de Notch. Contrairement à DLL4, il est préférentiellement exprimé au niveau des cellules *stalk* des vaisseaux en formation. Il a été montré que Jagged1 présente une fonction opposée à celle de DLL4 sur la vascularisation des rétines de souris. Jagged1 favorise la formation de cellules *tip* en empêchant l'activation de Notch par DLL4. Il a en effet été montré que la délétion de jagged1 au niveau des cellules endothéliales, entraîne une augmentation de l'activité de Notch, et conduit à un nombre réduit de protrusions et de cellules présentant un comportement de *tip*¹⁹⁶. Comme nous pouvons le voir dans le tableau ci-dessous, la surexpression de Jagged1 conduit à l'inverse en une augmentation de protrusions, et de filopodes^{196,197}.

	Dll4+/-	Dll4 ^{flxed/flxed} / Pdgfb-iCre ^{T/+}	Rbpj ^{flxed/flxed} / Pdgfb-iCre ^{T/+}	Notch1 ^{flxed/flxed} / VEcad-CreER ^{T2}	Jag1 ^{flxed/flxed} / Pdgfb-iCreER
Expansion du plexus primaire	Augmentée	Diminuée	Diminuée	X	Diminuée
Densité vasculaire	Augmentée	Augmentée	Augmentée	X	Diminuée
Point de branchements	Augmenté	Augmenté	Augmenté	X	Diminué
Anomalie des artères ou veines	X		Diamètre des veines augmenté	X	X
Nombre de cellules tip	Augmenté			Augmenté	Diminué
Nombre de Filopodes	Augmenté	Augmenté	Augmenté	Augmenté	Diminué
Régression vasculaire (colIV)				X	X
Maturation des vaisseaux (NG2 α -sma)	Normale			X	Diminuée
Prolifération	Normale			X	Diminuée
Référence	145 / 108	143	143	108	204

III.3.1.3 Autres facteurs et interactions impliqués dans l'angiogenèse

Les voies de signalisation VEGF et Notch, bien qu'essentielles, ne sont évidemment pas les seules à gouverner le processus de formation de nouveaux vaisseaux sanguins. D'autres familles de molécules et interactions cellulaires sont impliquées dans ce processus. Nous allons brièvement en présenter quelques unes ici.

Comme nous avons vu, les angiopoïétines sont impliquées dans le recrutement des cellules murales lors de la maturation des vaisseaux sanguins¹⁹⁸. Au niveau de la rétine, il a été

montré qu'une délétion de l'angiopoïétine-2 chez les souris entraîne des altérations du plexus superficiel et une absence de plexus vasculaire profond, ainsi qu'une persistance anormale du réseau hyaloïdien¹⁹⁹.

Les membres de la famille FGFs sont des facteurs de croissance également impliqués dans l'angiogenèse. Ces facteurs ont été les premiers « stimulateur de l'angiogenèse » à avoir été découverts²⁰⁰⁻²⁰³. Les FGFs ont toutefois été délaissés avec l'avènement des recherches sur le VEGF. Ceci en partie, car l'ablation génétique de certains membres de cette famille (FGF-1 et -2), n'entraîne pas de phénotype vasculaire particulier. Il faut savoir que cette famille comprend 23 membres (FGF-1 à FGF-23) et 4 récepteurs pouvant entraîner une compensation fonctionnelle expliquant cette absence de phénotype. Il a été montré que le blocage fonctionnel des FGFs dans l'épithélium pigmentaire rétinien entraîne une diminution des vaisseaux choroïdiens, et de la vascularisation rétinienne²⁰⁴. D'autres études ont montré l'implication des FGFs dans le maintien de l'intégrité vasculaire²⁰⁵.

La délétion d'Alk1, un récepteur de la famille TGF- β exprimé par les cellules endothéliales impliqué dans l'angiogenèse, entraîne la mort embryonnaire chez la souris, à 11 jours de gestation et est associée à de sévères anomalies vasculaires. On retrouve dans ces embryons de sévères altérations morphologiques des veines et des artères principales²⁰⁶. BMP9 est un substrat d'Alk1 impliqué dans le remodelage vasculaire^{207,208}. Une étude de l'équipe de Sandrine Bailly a permis de montrer que l'inhibition de BMP9 par injection d'un anticorps monoclonal entraîne une augmentation de la densité vasculaire rétinienne²⁰⁷. Les auteurs ont montré également que les souris délétées pour BMP9 (BMP9^{-/-}) ne présentent pas de phénotype vasculaire rétinien particulier. L'injection dans ces souris du domaine extracellulaire du récepteur Alk1 entraîne toutefois une augmentation de la densité vasculaire et une diminution de l'expansion radiale du réseau vasculaire. Ceci suggère une compensation par la souris en réaction à la perte chronique de BMP9. Les auteurs ont montré que le blocage de BMP10 dans les souris BMP9^{-/-} entraîne la formation d'un réseau vasculaire très dense, mais avec une expansion radiale sévèrement diminuée²⁰⁷. Ainsi BMP10 compense l'activité de BMP9. Enfin, Larrivée *et al.* et Ricard *et al.* ont montré que Alk1 via sa liaison avec ses ligands BMP9 et BMP10 contrôle l'angiogenèse par augmentation de la signalisation Notch²⁰⁹.

Les voies de signalisation wingless(WNT) / Frizzled (FZD) sont impliquées dans de nombreux processus cellulaires tels que la prolifération, la différenciation, la migration et jouent un rôle crucial lors de la morphogenèse au cours du développement des vertébrés¹⁸⁷. Il a été montré que ces voies sont également impliquées dans le développement du réseau vasculaire rétinien et interviennent notamment au cours de la régression du réseau hyaloïde primitif²¹⁰⁻²¹².

Il a été montré que de nombreuses molécules de guidage axonal sont également impliquées dans le processus d'angiogenèse. Parmi celles-ci, on retrouve les ligands PlexinD1, Robo1/4 ou Unc5B, ainsi que les récepteurs de ces ligands, à savoir Sema3E, Slit1/2 et Netrin1. Ces molécules sont impliquées dans la vascularisation post-natale de la rétine en régulant notamment, le processus de bourgeonnement et le remodelage vasculaire²¹³⁻²¹⁷.

D'autre part, il a été montré qu'il existe des facteurs stimulateurs d'angiogenèse «non classiques» tel que l'érythropoïétine (EPO), l'angiotensine II (ANGII) et les endothélines (ET)²¹⁸. Enfin, Il faut savoir que certains miRNA sont spécifiquement exprimés dans les cellules endothéliales et jouent un rôle clé dans le développement vasculaire²¹⁹

IV. DIFFÉRENCIATION ARTÉRIO-VEINEUSE

IV.1. Une distinction génétique précoce lors du développement embryonnaire

La différenciation entre les artères et les veines, ou différenciation artério-veineuse se produit tôt lors du développement embryonnaire et a longtemps été présentée comme uniquement contrôlée par le débit sanguin. Les travaux de Thomas Addison en 1860 dans un modèle d'embryons de poulet complété par des travaux plus récents ont permis d'illustrer le rôle important du débit dans la spécification des artères ou des veines^{220,221}. Grâce à ces travaux, nous savons que les cellules endothéliales conservent une plasticité vis-à-vis de leur différenciation artérielle ou veineuse, et ce en relation avec le flux sanguin.

Cependant, les travaux de ces dernières années ont permis de montrer l'existence de marqueurs moléculaires spécifiques pour les cellules endothéliales artérielles ou veineuses^{3,222,223}. Ces marqueurs sont exprimés par les cellules endothéliales dès les tous premiers stades du développement, avant même les premiers battements du cœur embryonnaire, et donc avant même la mise en place du flux sanguin^{3,222,223}. Ainsi, la force de pression exercée par la circulation sanguine ne peut pas à elle seule expliquer le façonnage des artères et des veines.

Ceci illustre la complexité de cette spécification, régie à la fois par des facteurs génétiques, des signalisations spécifiques, et des facteurs mécano-dynamiques. Les mécanismes régulant la différenciation artério-veineuse font ainsi toujours à ce jour l'objet de nombreuses études.

On retrouve le ligand membranaire ephrinB2 spécifiquement au niveau des cellules endothéliales artérielles alors que son récepteur EphB4 est exprimé par l'endothélium veineux²²⁴. Leur expression complémentaire et mutuellement exclusive permet la ségrégation correcte entre les veines et les artères en formation²²⁵. La délétion d'ephrinB2 chez la souris provoque une mort embryonnaire (E9.5) associée à de graves défauts angiogéniques ainsi qu'un manque général de remodelage vasculaire. Ceci illustre le rôle indispensable de la signalisation réciproque ephrinB2-EphB4 dans l'établissement d'un phénotype artériel ou veineux^{224,226,227}. En plus du marqueur ephrineB2, la Neuropiline1 et Notch3 sont retrouvés spécifiquement au niveau des cellules endothéliales artérielles de la souris, du poisson zèbre et du poulet^{224,228}. Les cellules endothéliales veineuses expriment quant à elles EphB4, la Neuropiline2, et COUP-TFII^{224,226,229}.

IV.2. Implication de VEGF et Notch dans le processus de différenciation artérioveineuse

Nous avons présenté la voie de signalisation Notch et VEGF dans la partie précédente en illustrant leurs rôles essentiels dans la communication *tip/stalk*. Il faut toutefois savoir que VEGF⁸³⁻⁸⁶ et Notch^{124,145,222} sont également impliqués dans la différenciation artério-veineuse (A/V)

IV.2.1 Implication de la signalisation VEGF dans la différenciation A/V

L'équipe de David J. Anderson a montré que la délétion des nerfs périphériques, ou des cellules de Schwann chez la souris conduit à de graves défauts dans la formation d'artères. En complétant cette observation avec des études *in vitro*, les auteurs ont démontré que le VEGF est à la fois sécrété par les neurones et est suffisant pour induire l'expression de gènes spécifiques d'un programme artériel sur des cellules embryonnaires²³⁰. En parallèle, l'équipe de Thomas N. Sato a remarqué que la surexpression de VEGF dans le cœur des souris provoque une augmentation du nombre de vaisseaux artériels cardiaques²³¹. Ces études illustrent le rôle indispensable de VEGF dans la formation d'artères; ceci a également été démontré chez le poisson zèbre. De plus, le blocage de sa traduction par injection d'oligonucléotides antisens modifiés (morpholino) provoque la perte d'expression des marqueurs artériels de l'aorte dorsale, une expansion des marqueurs veineux et des défauts morphologiques dans l'aorte embryonnaire²³².

Au niveau moléculaire, il est important de noter que l'activation de ERK par VEGF est critique dans le processus de formation d'artères²³³. Les mutants de souris portant des mutations qui réduisent l'activation par VEGF de la signalisation MAPK/ERK présentent en effet une diminution de la vascularisation artérielle mais non veineuse. On peut citer par exemple les souris À l'inverse, la stimulation de cette activation entraîne une angiogenèse excessive^{233,234}.

IV.2.1.1 Implication de la signalisation Notch dans la différenciation A/V

Les embryons mutants pour la signalisation de Notch, comme par exemple Dll4, présentent de sévères malformations artério-veineuses, ainsi que des superpositions anormales entre les artères et les veines^{102,232,235,236}. La perte d'un seul allèle de Dll4 résulte en une déficience dans l'expression des marqueurs spécifiques aux artères et des malformations artérielles^{103,236}.

Chez la souris, la délétion spécifiquement au niveau des cellules endothéliales et combinée de *HEY1* et *HEY2*, les gènes cibles de la signalisation Notch entraîne l'absence totale de remodelage du plexus primitif, et des hémorragies¹²⁹ qui provoquent une mort *in utero* au stade E9.5. Il faut savoir que l'expression des marqueurs artériels comme ephrin-B2 sont

réduits dans ces souris, illustrant une implication de ces facteurs dans l'acquisition d'un phénotype artériel¹²⁹. La délétion de l'homologue de *HEY2* (*grl*) chez le poisson zèbre a permis de montrer que la signalisation Notch est nécessaire et suffisante pour induire l'expression de marqueurs artériels²³⁵.

D'autre part, des microarray sur des cellules endothéliales en culture provenant de différents vaisseaux sanguins et de différents tissus, ont permis de montrer qu'elles ont des profils d'expression génique distincts et caractéristiques. *HEY2* a été spécifiquement retrouvé dans les cellules endothéliales artérielles²³⁷. Les auteurs ont également montré que l'activation de l'expression de *HEY2* est suffisante pour conférer des caractéristiques d'expression artérielle, et diminuer l'expression de marqueurs veineux à des cellules endothéliales provenant de veines²³⁷.

Toutefois, les cellules endothéliales artérielles ou veineuses humaines ont tendance à perdre leurs marqueurs moléculaires spécifiques associés lorsqu'elles sont mises en culture, rendant difficile leur étude. Ainsi, une étude génomique complémentaire sur des cellules endothéliales artérielles et veineuses fraîchement isolées a permis d'apporter des informations supplémentaires sur l'expression des marqueurs spécifiques aux veines ou aux artères²³⁸. De nouveau, *HEY2* a été identifié parmi les 64 gènes artériels déterminés par cette technique. Les auteurs sont allés plus loin, puisqu'ils ont montré que *HEY2* associé à 7 autres facteurs de transcription était capable de restaurer robustement le profil génétique artériel à des cellules endothéliales en culture²³⁸. *HEY2* est ainsi considéré comme marqueur essentiel à la spécification artérielle.

IV.2.2 La spécialisation des cellules endothéliales

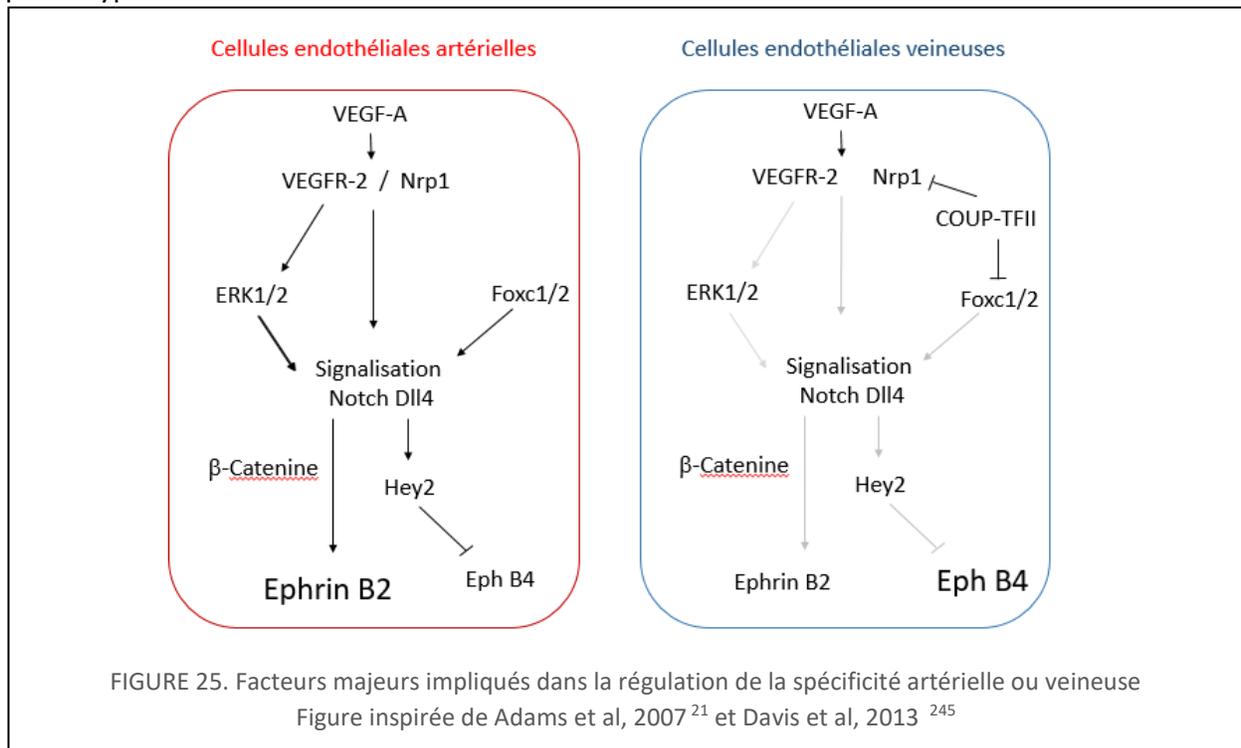
Il a été montré chez la souris et le poisson zèbre que VEGF agit en amont de Notch. En effet, l'injection de VEGF dans des poissons zèbres déficients pour Notch n'induit pas l'expression de marqueurs artériels¹⁴⁷, tandis que l'activation de Notch dans des poissons zèbres, dans lesquels la traduction de l'ARNm de VEGF est bloquée, restaure une correcte différenciation artérielle²³².

Lors de la différenciation artério-veineuse, le VEGF se lie au VEGFR-2 et à son co-récepteur la Neuropiline-1 ce qui conduit à l'activation de la signalisation Notch. Ceci induit l'expression de marqueurs artériels tel qu'ephrinB2 et bloque celle d'EphB4^{239,240}. La signalisation Wnt est également impliquée dans la spécification artérielle des cellules endothéliales. Le β -catenin, un co-activateur transcriptionnel de la signalisation canonique de Wnt, induit en effet l'expression de Dll4 et amplifie la signalisation Notch en formant un complexe avec NICD. Ce complexe induit l'expression de marqueurs artériels par les cellules endothéliales tels que EphrinB2, Dll4 ou CXCR4^{241,242} (figure 25).

L'induction d'une spécification veineuse est quant à elle gouvernée par le facteur de transcription Il du promoteur de l'ovalbumine de poulet (COUP-TFII). Sa délétion spécifiquement au niveau des cellules endothéliales entraîne l'artérialisation des veines, tandis que sa surexpression conduit à la formation de vaisseaux larges, qui fusionnent entre eux sans

distinction artério-veineuse²²⁹. Dans les deux cas il y a mort embryonnaire des souris transgéniques respectivement à (E12), et (E10.5/11.5)²²⁹.

Plus spécifiquement, COUP-TFII induit l'acquisition d'un phénotype veineux par régulation négative de Notch1 et HEY1/2^{229,236,243}. De plus, Il a été montré que COUP-TFII peut directement inhiber l'expression des facteurs de transcription FOXC1, 2 (Forkhead box C1 et C2), et de la Neuropiline1²⁴³. FOXC1 et 2 agissent en amont de la signalisation Notch, tandis que la Neuropiline1 module la voie de signalisation VEGF^{3,232}. Les souris déficientes pour FOXC1 et FOXC2 ont une diminution de leur vascularisation artérielle, mais pas d'anomalies dans l'expression des marqueurs veineux illustrant ainsi leur implication dans l'acquisition d'un phénotype artériel²⁴⁴.



La délétion globale ou spécifiquement au niveau des cellules endothéliales de la Neuropiline-1 chez les souris est létale (E12.5) et est associée à de sévères défauts de remodelage vasculaire²⁴⁶. Les souris n'exprimant plus la partie cytoplasmique de la Neuropiline-1 sont quant à elles viables mais présentent un grand nombre de superpositions entre les artères et les veines illustrant le rôle critique de ce domaine dans la séparation des artères et des veines, mais pas dans le processus d'angiogenèse²⁴⁷.

PARTIE 2 : SYSTÈME VEGF/VEGFR: ACTEURS DE L'ANGIOGENÈSE

I. PRÉSENTATION

I.1. Historique de la découverte du VEGF

La découverte du VEGF est associée aux études de l'angiogenèse anormale, excessive et dérégulée retrouvée au sein des tumeurs. Judah Folkman postula en effet dès les années 1970 l'existence de facteurs diffusibles ayant la capacité de stimuler l'angiogenèse tumorale, les TAF (*tumor angiogenic factors*)⁷². Ceci conduisit en 1989 à l'identification et l'isolation d'un facteur mitogénique soluble, le VEGF par l'équipe de Napoleone Ferrara²⁴⁸. Ces travaux ont été effectués à partir du milieu conditionné de cellules folliculaires pituitaires bovines²⁴⁸. La même année deux autres équipes ont montré que le VEGF avait des propriétés angiogéniques dans le modèle de la membrane chorioallantoïdienne de l'embryon de poulet (CAM)^{249,250}. L'équipe d'Harold Dvorak quelques années avant, en 1983, avait anticipé cette découverte en décrivant un facteur inducteur de la perméabilité vasculaire tumorale, nommé à l'époque le VPF²⁵¹, qui était en fait la première description du VEGF²⁵².

I.2. Les différents membres de la famille VEGF

Lors de toute cette introduction nous avons parlé du VEGF, mais il ne faut pas oublier que ce VEGF fait partie d'une famille de glycoprotéines secrétées comprenant d'autres membres le VEGF-B, C, D, E et le PlGF (Placental Growth Factor)²⁵³

L'invalidation de PlGF chez la souris n'induit pas d'anomalie au niveau du développement vasculaire. Toutefois, il a été montré qu'il était impliqué dans l'angiogenèse tumorale. Il semble qu'il augmente la disponibilité du VEGF en favorisant la liaison de celui-ci avec VEGFR-1 plutôt que VEGFR-2²⁵⁴. Son absence diminue en effet la réponse des cellules endothéliales au VEGF. Le PlGF peut se lier avec VEGFR-1 et la Neuropiline-1²⁵⁵. Des études ont permis de montrer la présence d'un isoforme alternatif de PlGF, PlGF-1, qui présente une action anti-angiogénique dans des conditions tumorales²⁵⁶.

L'activité du VEGF-B dépend de sa liaison avec le récepteur VEGFR-1. Les souris invalidées pour VEGF-B sont viables et fertiles et n'ont pas d'anomalies au niveau de leur réseau vasculaire rétinien²⁵⁷. Elles présentent toutefois des anomalies de développement cardiaque et pulmonaire²⁵⁸⁻²⁶⁰. L'implication de VEGF-B dans l'angiogenèse est encore débattue^{257,261-264}. Cette forme serait impliquée dans la survie des cellules endothéliales²⁶¹.

La double délétion de VEGF-C et VEGF-D entraîne une altération du réseau lymphatique illustrant leur implication dans la lymphangiogenèse, la formation de vaisseaux lymphatiques²⁶⁵. VEGF-C et -D interagissent principalement avec VEGFR-3, récepteur exprimé

au niveau des cellules de ces vaisseaux²⁶⁵. Néanmoins, VEGF-C est synthétisé sous forme de précurseur qui va ensuite être maturé en plusieurs formes par clivage protéolytique. La forme courte de VEGF peut se lier avec le VEGFR-3 mais également avec VEGFR-2²⁶⁶. Ceci suggère un rôle double de VEGF-C dans l'angiogenèse et la lymphangiogenèse. D'autre part, VEGF-D est impliqué dans le développement du réseau vasculaire chez le poisson zèbre²⁶⁷, et sa surexpression dans les tumeurs induit une augmentation de l'angiogenèse et de la lymphangiogenèse²⁶⁸. D'autre part, il existe un phénomène compensatoire entre VEGF-C et -D lors de la mise en place du réseau lymphatique embryonnaire²⁶⁵.

Pour finir, le VEGF-A (VEGF), est la forme majeure dont nous avons parlé durant la première partie de cette introduction. Le VEGF est essentiel à la mise en place du réseau vasculaire⁸⁴, et la délétion d'un seul de ces allèles entraîne la mort embryonnaire dès le stade E8.5 associée à une absence totale de vasculature que ce soit au niveau de l'embryon ou extra embryonnairement^{83,84}.

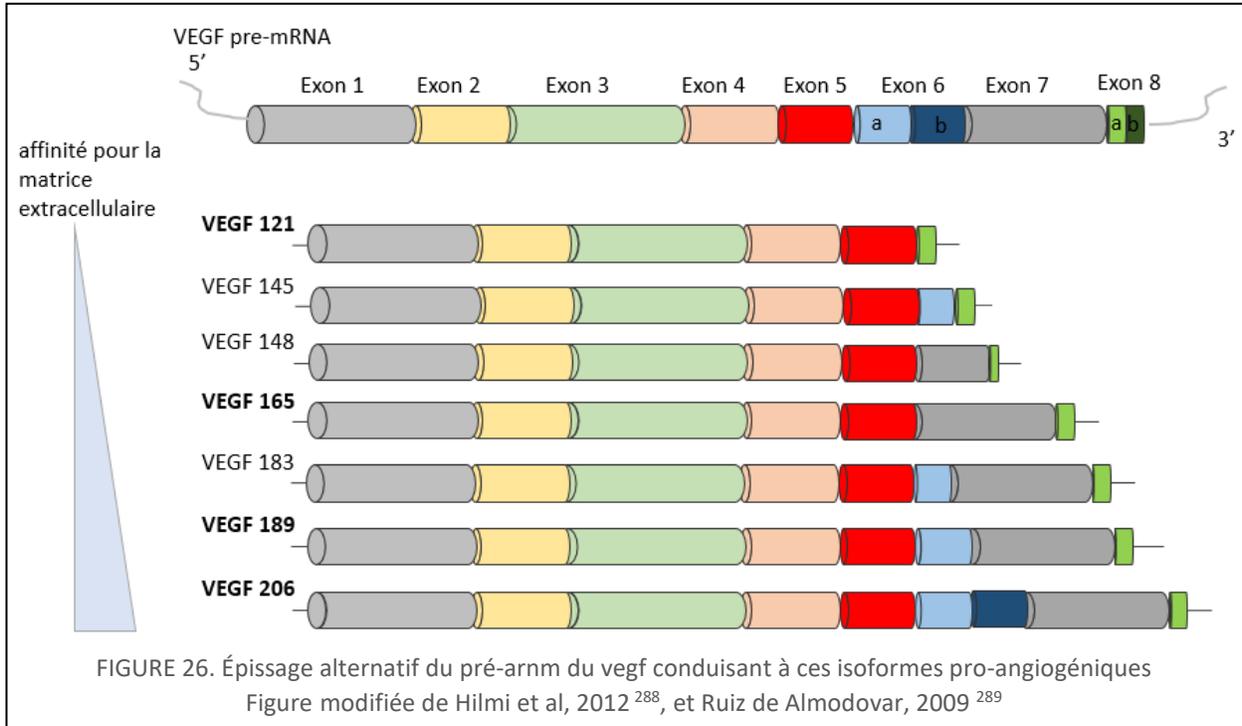
Bien que principalement connu pour agir au niveau du système vasculaire, il régule également d'autres événements par exemple au niveau du système nerveux central, du foie, des poumons ou dans le système reproducteur²⁶⁹⁻²⁷¹.

Chez l'adulte beaucoup de cellules produisent du VEGF, les fibroblastes²⁷², les cellules hématopoïétiques²⁷³, les myofibroblastes cardiaques²⁷⁴, les cellules neurales²⁷⁵, les macrophages²⁷⁶, les neutrophiles²⁷⁷, les cellules T²⁷⁸, ainsi que les cellules endothéliales²⁷⁹.

Un des inducteurs de l'expression du VEGF est l'hypoxie via le facteur de transcription HIF-1 α . Celui-ci se lie en effet au promoteur du *veg*f et induit son expression chez la souris, et l'humain^{280,281}. L'expression de *veg*f est également contrôlée par certains facteurs de croissance, des cytokines et des oncogènes tels que p53, Src, c-Myc, Fos and Bcl-2²⁸². Ainsi, le VEGF est aussi associé à l'angiogenèse pathologique et notamment à la croissance tumorale²⁸³. La prolifération démesurée des cellules tumorales induit une très forte demande énergétique qui ne peut être comblée localement par le réseau vasculaire existant. Certaines cellules tumorales se retrouvant ainsi dans un environnement faible en oxygène, vont voir leur programme transcriptionnel lié à l'hypoxie enclenché, conduisant à la libération du VEGF. Ceci stimule de manière excessive et dérégulée la formation de nouveaux vaisseaux sanguins, dit vaisseaux tumoraux.

I.3. Les différentes isoformes du VEGF

Comme nous avons vu brièvement dans la partie I, le transcrite de *vegf* est sujet à un épissage alternatif conduisant à la formation de différentes isoformes²⁸⁴⁻²⁸⁶. Ceci entraîne une protéine de taille variant entre 34 à 46 kDa. On distingue chez l'homme quatre isoformes principales comprenant 121, 165, 189 et 206 acides aminés, d'autres isoformes plus rares ont également été reportées (VEGF145 148 et VEGF183)²⁵³ (figure 26.). Au cours du développement embryonnaire le ratio de ces isoformes varie²⁸⁷.



Au sein du gène *vegf*, l'exon 1 code pour une séquence de clivage nécessaire à la sécrétion de la protéine, les exons 2 à 5 codent pour les domaines de liaison au récepteur et sont partagés par toutes les isoformes. La région codée par les exons 6 et 7 est riche en acides aminés basiques ce qui permet la fixation à des polysaccharides aux héparanes sulfates localisées sur les surfaces cellulaires et dans la matrice extracellulaire. C'est cette région qui est soumise à l'épissage alternatif aboutissant à des formes qui se diffusent plus ou moins bien car elles sont plus ou moins freinées par liaison à la matrice extracellulaire. Le VEGF120/1 ne possédant pas cette séquence basique est ainsi l'isoforme la plus diffusible. Au contraire, le VEGF188/9 est pour sa part fortement lié aux héparanes sulfates et est ainsi séquestré par la matrice extracellulaire (cf partie I).

L'expression exclusive de VEGF120 chez la souris entraîne une mortalité à la naissance d'environ 50% des souriceaux avec de graves hémorragies, tandis que les autres meurent dans les 15 jours suivant la naissance par insuffisance cardiaque. L'expression exclusive de VEGF-A188 entraîne des anomalies globales de vascularisation. Le VEGF165 quant à lui est l'isoforme prédominante et présente l'activité angiogénique la plus importante²⁹⁰. Il faut savoir qu'il existe

également des formes découvertes plus récemment qui sont anti-angiogéniques et contiennent l'exon 8b comme dernier exon^{291, 292, 293}.

I.4. Les VEGFR

I.4.1 Les VEGFRs : structure et fonctions

Il existe chez l'humain trois récepteurs sur lesquels peuvent se lier les ligands de la famille du VEGF: le VEGFR-1 ou Flt1 (*Fms-like tyrosine kinase 1*), le VEGFR-2 ou Kdr ou Flk1 (*Fetal Liver Kinase 1*) et le VEGFR-3 ou Flt4 (*Fms-like tyrosine kinase 4*)²⁵³.

Structurellement les récepteurs au VEGF comprennent un domaine extracellulaire organisé en sept domaines apparentés aux immunoglobulines (Immunoglobuline-like), un segment transmembranaire et un domaine intracellulaire qui leur permettent d'exercer leur activité catalytique. Ce sont en effet des récepteurs tyrosine kinase, ils peuvent ainsi phosphoryler certains résidus tyrosine intracellulaires, et induire l'activation de voies de signalisation spécifiques.

Ces récepteurs présentent des mécanismes de régulation similaires à d'autres récepteurs tyrosine-kinases impliqués dans l'angiogenèse, comme le PDGFR et l'EGFR. En fait le processus d'activation est le même pour tous ces récepteurs. Il y a tout d'abord liaison du ligand sur la partie extracellulaire, suivit d'une dimérisation des récepteurs (homo- ou hétéro-dimère). Ceci entraîne l'auto- ou la trans-phosphorylation qui permet le recrutement des acteurs indispensables à la transduction du signal. Cette cascade de signalisation, que nous détaillerons plus tard, entraîne divers processus tels que la prolifération, la migration ou la survie cellulaire. Il faut savoir que l'activité du VEGF est régulé très finement et à différents niveaux. Ceci inclut classiquement, son expression génique, la stabilité et la traduction de son ARNm, ainsi que l'interaction ligand/récepteur, le recyclage, et la signalisation intracellulaire induite²⁹⁴.

I.4.2 Expression

VEGFR-1-2 et -3 ne sont pas retrouvés au niveau des mêmes tissus. On retrouve, le VEGFR-1 et VEGFR-2 au niveau de l'endothélium mais l'expression de VEGFR-1 est plus forte au niveau des cellules *stalk* tandis que celle de VEGFR-2 est essentiellement au niveau des filopodes des cellules *tip*⁵⁴. Le VEGFR-2 est également exprimé au niveau des cellules hématopoïétiques^{295, 296}, et des plaquettes²⁹⁷. On le retrouve également au niveau des neurones du système nerveux central et périphérique où il joue un rôle neuroprotecteur²⁹⁸, et permet de moduler VEGF biodisponible¹⁷⁴. Le VEGFR-3 quant à lui est principalement exprimé par les vaisseaux lymphatiques chez l'adulte mais son expression est retrouvée également dans tous les vaisseaux sanguins durant le développement embryonnaire. Son expression est augmentée au niveau des bourgeons endothéliaux en formation chez l'adulte¹⁴³, et plus précisément au niveau des filopodes des cellules *tip*¹⁴³. On note que son expression est également augmentée dans la vascularisation tumorale^{299, 300}, mais aussi induite par le VEGF^{299, 301}.

I.4.3 Rôle

I.4.3.1 VEGFR-1

Le VEGFR-1 a un rôle essentiel dans l'organisation et dans le maintien de l'intégrité des vaisseaux sanguins. Il est également impliqué dans l'angiogenèse tumorale³⁰² et dans l'activation des macrophages³⁰³. Les souris déficientes pour VEGFR-1 (*Vegfr-1^{-/-}*) présentent une désorganisation du réseau vasculaire primitif et des anomalies d'hématopoïèse menant à la mort *in utero* au jour E8.5-9⁸⁵. L'expression d'une forme mutante où seul le domaine kinase de VEGFR-1 est délété résulte quant à elle en une angiogenèse normale, suggérant que le rôle de VEGFR-1 dans l'angiogenèse est contrôlé par sa capacité d'interaction avec ses ligands plutôt que par son activité catalytique³⁰⁴. De plus, La délétion de *vegfr1* spécifiquement au niveau des cellules endothéliales chez les souris entraîne quant à elle une létalité embryonnaire associée à une angiogenèse excessive et anarchique⁸⁶.

Le VEGFR-1 lie le VEGF-A avec une affinité très forte ($K_d \approx 10-20$ pmol/L) dix fois supérieure à celle du VEGFR-2 ($K_d \approx 75-125$ pmol/L) mais présente une activité kinase dix fois plus faible³⁰⁵⁻³⁰⁷. Ceci permet au VEGFR-1 de s'opposer à la signalisation induite par VEGFR-2 par séquestration, et donc par modulation de la biodisponibilité du VEGF environnemental. Cette atténuation de la signalisation VEGFR-2 est confirmée par l'augmentation de sa phosphorylation, et donc, de son activation retrouvée lors de la délétion du gène VEGFR-1 chez les souris³⁰⁸.

VEGFR-1 est également retrouvé sous une forme soluble, sFlt1. Ce variant plus court et soluble est issu d'un épissage alternatif. sFlt1 agit également en séquestrant le VEGF et est nécessaire à la guidance des néo-vaisseaux lors de l'angiogenèse rétinienne³⁰⁹.

I.4.3.2 VEGFR-2

VEGFR-2 est une glycoprotéine transmembranaire de 200kDA connue également sous le nom de *Fetal Liver Kinase-1* (Flk1) chez la souris et KDR chez l'humain³⁰⁹. Le VEGF-A est le principal ligand du VEGFR-2, mais VEGFR-2 peut également lier le VEGF-C et -D.

C'est le principal effecteur de la voie VEGF. Son rôle est si important que sa délétion chez la souris entraîne une mort embryonnaire précoce (E8.5) et est associée à une absence totale de vaisseaux sanguins embryonnaires ainsi qu'un défaut d'hématopoïèse^{85,310,311}. Il est en effet essentiel à la différenciation des cellules endothéliales, leur survie, leur prolifération, leur migration, ainsi qu'à la régulation de la perméabilité vasculaire³⁰⁹.

L'expression de VEGFR-2 est détectable très tôt durant le développement^{87,312}, puis celle-ci diminue dans les vaisseaux matures³¹³. Il restera toujours dans ces vaisseaux un niveau basal de la signalisation VEGF/VEGFR-2 indispensable au maintien de l'homéostasie des cellules endothéliales^{314,315}. L'expression de VEGFR-2 est fortement augmentée en condition angiogénique et son rôle est critique dans la vascularisation tumorale³¹⁶. Comme pour le VEGFR-1, il existe une forme soluble de VEGFR-2 qui pourrait avoir un rôle négatif sur l'angiogenèse³¹⁷.

I.4.3.3 VEGFR-3

Structurellement, le VEGFR-3 diffère de VEGFR-1 et -2. Il présente toujours les 7 domaines extra-cellulaires apparentés aux immunoglobulines, mais le cinquième est clivé de manière protéolytique et les sous-unités sont maintenues entre elles par des liaisons disulfures (-S-S-). Le VEGFR-3 possède deux ligands, VEGF-C et -D, et il a été rapporté que la stimulation par ces ligands est capable d'induire la formation d'hétérodimères VEGFR-2 /R-3^{318,319}.

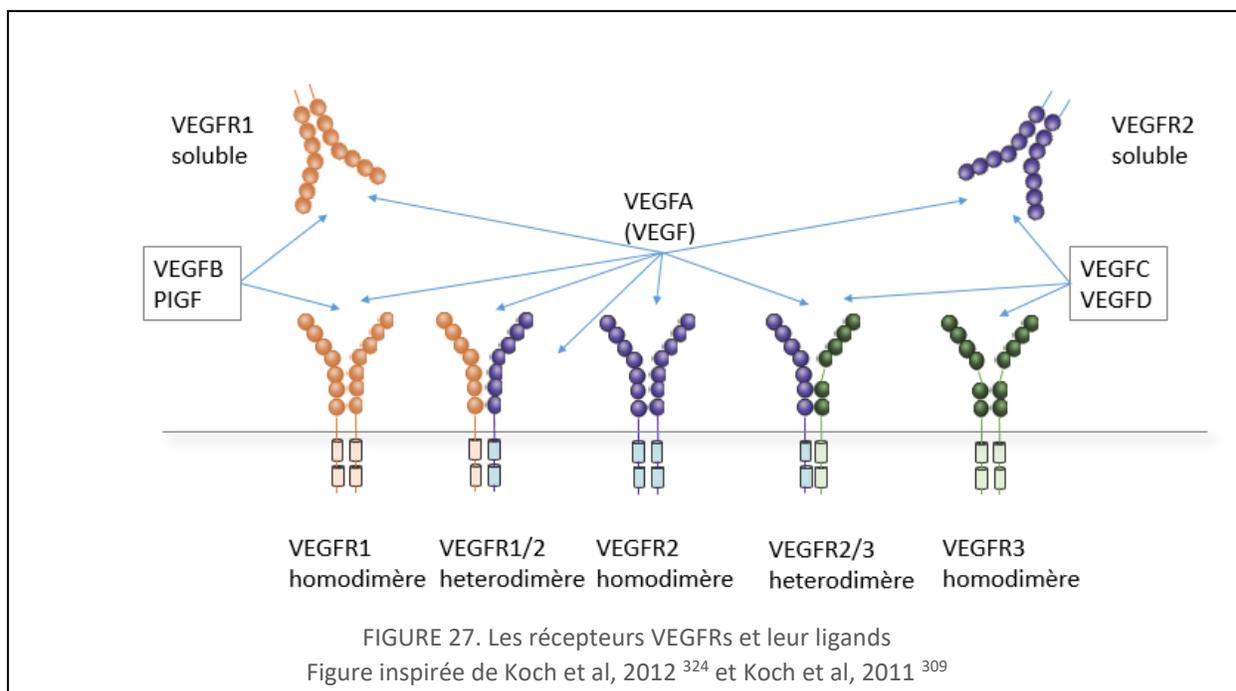
Le rôle de VEGFR-3 a tout d'abord été décrit lors de la lymphangiogenèse³²⁰⁻³²². Cependant, on lui connaît également un rôle dans l'angiogenèse^{142,192}. En effet, sa délétion globale chez la souris (*vegfr3^{-/-}*) conduit à la mort *in utero* au stade E10-12.5, avant l'émergence des vaisseaux lymphatiques, et est associée à une faible vascularisation, des malformations cardiaques, et des anomalies de différenciation artério-veineuse⁸⁷. Curieusement, la délétion des deux ligands du VEGFR-3 (VEGF-C and VEGF-D) n'entraîne pas d'anomalie vasculaire²⁶⁵. Ceci suggère un rôle du VEGFR-3 indépendamment de son ligand.

Les travaux de Ralf Adams ont permis de montrer que VEGFR-3 est exprimé au niveau des cellules tip des vaisseaux en formation¹⁴². Toutefois son rôle dans l'angiogenèse est encore débattu. En effet, alors que Ralf Adams a proposé que le récepteur VEGFR-3 est essentiel à l'angiogenèse, et jouerait même un rôle plus important que VEGFR-2¹⁴², l'équipe de Kari Alitalo a démontré par la suite l'inverse à l'aide de modèles d'inactivation conditionnelle chez la souris¹⁴⁶.

I.4.4 Les différents complexes avec VEGFR-2

I.4.4.1 Homo/hétérodimérisation de VEGFR-2

La liaison du ligand sur le domaine extracellulaire du récepteur VEGFR-2 induit sa dimérisation ce qui permet la transphosphorylation et l'activation de sa signalisation. Cette dimérisation peut s'effectuer entre deux récepteurs VEGFR-2, on parle alors d'homodimérisation, mais il existe également des possibilités de combinaison entre les différents récepteurs au VEGF, les hétérodimères VEGFR-1-VEGFR-2³²³ et VEGFR-2-VEGFR-3. Le complexe VEGFR-1-VEGFR-2 est le moins connu mais a été identifié dans des lignées de cellules endothéliales³²³. Le dimère VEGFR2-VEGFR3 est pour sa part induit par VEGF-C et VEGF-D au niveau des cellules lymphatiques *in vitro* et *in vivo*³¹⁹. VEGF peut également entraîner la formation de l'hétérodimère VEGFR-2-VEGFR-3 sans pour autant avoir de capacité de liaison sur VEGFR-3 seul³¹⁸. La présence d'un ligand capable d'association avec les deux membres du dimère n'est ainsi pas essentielle à la formation d'un hétérodimère (Figure 27).



1.4.4.2 Les Neuropilines

Les neuropilines sont des protéines transmembranaires ne présentant pas de fonction catalytique. Il existe deux types de neuropilines Nrp1 et Nrp2. Comme nous avons vu dans la première partie, lors du développement embryonnaire, Nrp1 est préférentiellement exprimée au niveau de l'endothélium artériel, tandis que Nrp2 est plus représentée au niveau veineux et lymphatique^{228,325}.

Les neuropilines ont été identifiées initialement comme récepteurs des sémaphorines de classe III jouant un rôle dans la modulation du signal de croissance axonal Raper 2000, ce n'est que plus tard qu'il a été montré que les neuropilines peuvent former des complexes avec VEGFR-2. Nrp1 est le co-récepteur de VEGFR-2 et entraîne une augmentation de son activité en présence de VEGF165^{326,327}. Par contre, la formation de dimères en *trans* c'est à dire entre deux cellules adjacentes Nrp1/VEGFR2 a un effet inhibiteur sur l'angiogenèse et favorise la quiescence des cellules endothéliales³²⁸. Nrp1 a également la capacité de former des complexes avec VEGFR-1³²⁶ et VEGFR-3³²⁹. D'autre part, Nrp1 peut lier le VEGF, PLIGF, VEGF-B, -C et -D,^{329,330} tandis que Nrp2 interagit préférentiellement avec VEGFR-3 et peut lier le VEGF, VEGF-C et -D³²⁹.

La délétion des deux formes de Neuropilines chez la souris entraîne une létalité embryonnaire précoce (E8.5) associée à des anomalies de formation du plexus primaire plus sévère que lors de simple délétion, et ressemblant à celles retrouvées lors de la perte d'un seul allèle du VEGF^{83,84,331}. Ceci suggère que les deux membres de neuropilines sont requis au bon déroulement du développement vasculaire embryonnaire, et que les fonctions de Nrp1 sont sûrement partagées au moins en partie avec Nrp2.

I.4.4.3 Les intégrines

Les intégrines constituent une famille de récepteurs transmembranaires qui permettent la liaison entre les protéines de la matrice extracellulaire, comme le collagène la fibronectine, et la laminine³³², et le cytosquelette d'actine à l'intérieur des cellules. Les intégrines présentent une structure hétérodimérique associant, une chaîne alpha et une chaîne bêta. Les intégrines $\beta 1$ et $\beta 3$ s'associent au VEGFR-2 après stimulation au VEGF. Cette association est cruciale pour l'activité de VEGFR-2, et notamment pour l'induction de la migration cellulaire^{333,334 335 336,337}.

I.4.4.4 VE-Cadhérine

La VE-cadhérine (« *Vascular Endothelial-Cadherin* ») est une protéine majoritairement exprimée par l'endothélium qui est localisée au niveau des jonctions entre deux cellules endothéliales adjacentes. Elle a un rôle essentiel dans l'organisation, l'adhésion et la perméabilité de l'endothélium³³⁸. L'invalidation génétique de la VE-cadhérine chez la souris entraîne une létalité à mi-gestation associée à des malformations vasculaires, et une absence de bourgeonnement. Lorsque le domaine vasculaire est muté, les souris présentent un phénotype similaire^{339 340}. De plus, la VE-cadhérine est essentielle dans la régulation de l'internalisation de VEGFR-2, comme nous allons le voir dans le chapitre III de cette partie.

II. LES MÉCANISMES D'ACTIVATION DU VEGFR-2

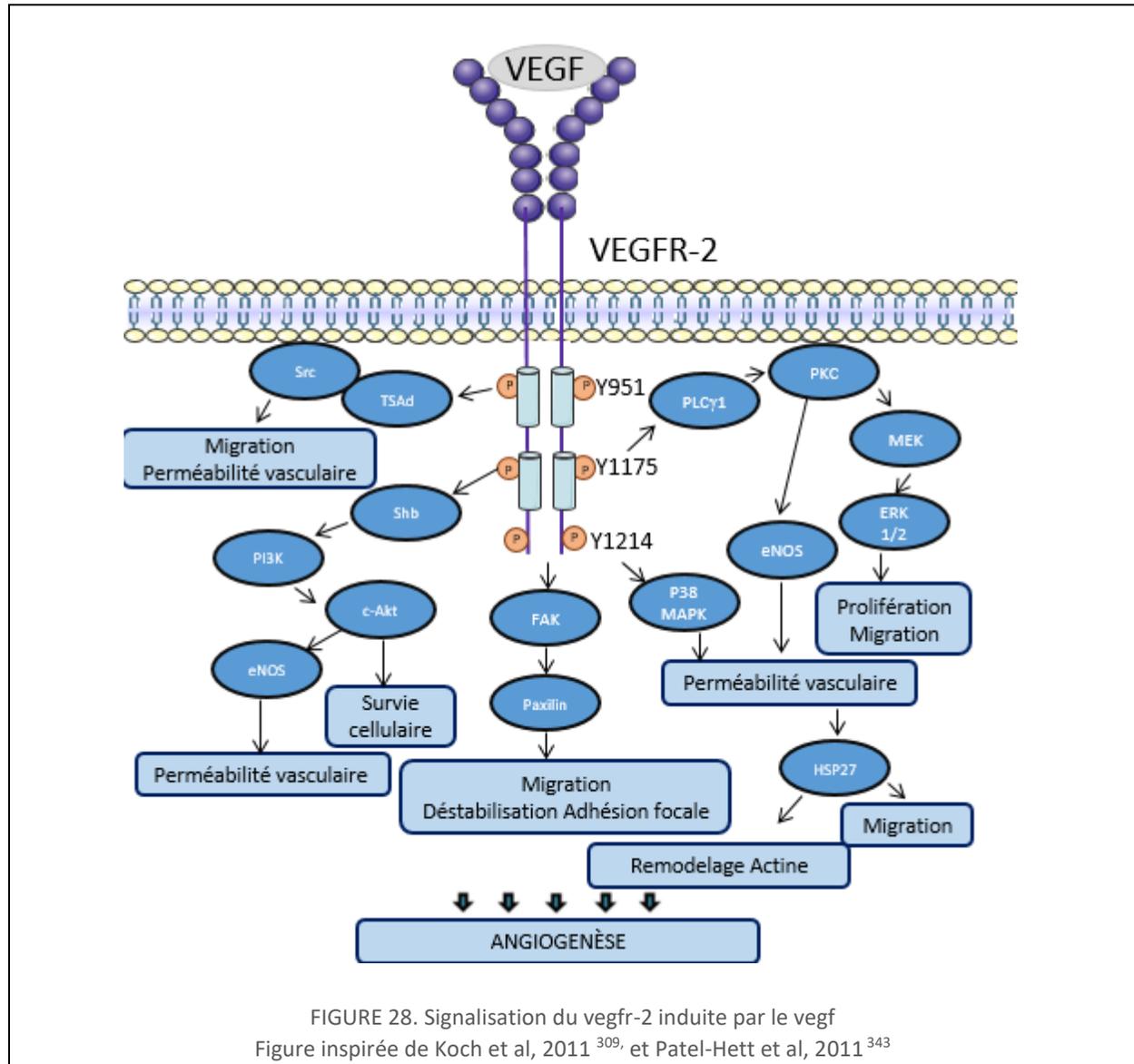
II.1. Description

Le VEGF se lie au VEGFR-2 par l'intermédiaire de ses domaines apparentés aux immunoglobulines 2 et 3. Cette liaison entraîne la dimérisation du récepteur induisant un changement conformationnel³⁴¹.

Ceci entraîne l'autophosphorylation de VEGFR-2 par l'intermédiaire de son activité tyrosine kinase. Les sites de phosphorylations principaux sont, chez l'humain, les résidus Y801 dans la partie juxta membranaire, Y951 et Y996 dans le domaine kinase, Y1054 et Y1059 au niveau de la boucle d'auto-activation, et les Y1175 et Y1214, au niveau du domaine carboxy-terminal³⁰⁹. Ces sites phosphorylés permettent l'interaction entre le VEGFR-2 et ses partenaires, induisant ainsi des voies de signalisation diverses. Ceci inclut, la voie PI3K–AKT–mTOR, impliquée dans la survie cellulaire et la régulation de la fonction de barrière endothéliale, la voie phospholipase $C\gamma$ (PLC γ)-ERK1/2 qui est cruciale lors du développement vasculaire et la formation des artères. Enfin, la voie SRC est également une voie de signalisation activée par la phosphorylation de VEGFR-2. Cette dernière est impliquée dans la structure des cellules, leur migration et leur polarisation ainsi que dans les jonctions intercellulaires³⁰⁹. La migration des cellules endothéliales en réponse au VEGF, critique pour l'angiogenèse implique des transducteurs de signaux se liant aux tyrosines phosphorylées Y951 et Y1175. Certaines de

ces voies utilisent des effecteurs communs, permettant une redondance dans l'activation des voies de signalisation.

Il existe également des voies qui permettent d'activer le récepteur VEGFR-2 mais indépendamment du VEGF. Les forces mécaniques et le stress de cisaillement peuvent par exemple induire la phosphorylation de VEGFR-2, notamment, à l'aide de la VE-cadhérine ou d'autres protéines des jonctions cellulaires comme PECAM1³⁴². Dans cette thèse nous allons nous concentrer sur la signalisation induite par liaison du VEGF, la voie canonique (Figure 28).



II.2. Phosphorylation de la tyrosine 1175 (1173 chez la souris)

L'action du VEGF est principalement gouvernée par la tyrosine 1175, ou 1173 chez la souris. La phosphorylation de ce site régule la prolifération, la migration, et la spécification artérielle des cellules endothéliales et participe à l'homéostasie^{233,344-346}.

Plusieurs effecteurs peuvent se lier à ce résidu: PLC γ et les protéines adaptatrices Shb («*SH2-domain-containing 49adaptor protein B*») et SCK (SHC («*Src homology and collagen homology-related adaptor protein*»)).

Une mutation au niveau du résidu Y1173 empêchant la phosphorylation de ce site (Y1173F) provoque une mort précoce chez l'embryon de souris (E8.5 à E9.5), associée à des anomalies de vascularisation similaires à celles retrouvées chez les souris déficientes pour VEGFR-2³⁴⁵. La délétion de l'enzyme PLC- γ ³⁴⁷, ou une mutation au niveau de son site de liaison au Y1173, induit également chez la souris des anomalies de vasculogénèse et la mort embryonnaire à 10 jours illustrant l'importance cruciale de cette enzyme^{347,348}.

La phosphorylation du site 1175 du VEGFR-2 entraîne la phosphorylation et l'activation de la PLC- γ . Cette dernière entraîne la formation d'inositol 1,4,5-trisphosphate (IP3) et de diacylglycerol (DAG) par hydrolyse du PIP2 (phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate) membranaire. L'induction d'IP3 augmente le niveau de calcium intracellulaire, ce qui va permettre l'activation de la protéine kinase C (PKC)^{349,350}. La PKC une fois active, va induire la cascade de signalisation MEK-ERK1/2. La voie de signalisation PLC γ -PKC régule des processus essentiels à la biologie des cellules endothéliales. Par exemple, leur spécification artérielle³⁵¹, leur prolifération, et leur migration³⁵². Ceci en partie par activation de facteurs de transcriptions de la famille E26 transformation-specific (ETS)³⁵³. D'autre part, des équipes ont montré que l'activation de la voie PLC γ -PKC par VEGF, module la migration des cellules endothéliales par l'intermédiaire de la phosphorylation de l'histone deacetylase HDAC7. Cette enzyme est un régulateur essentiel de la structure de la chromatine et donc, favorise l'expression de gènes impliqués dans l'angiogénèse^{354,355}.

La phosphorylation de la tyrosine 1175 permet également la liaison de la protéine adaptatrice SHB et SCK, ceci permet la régulation de la migration cellulaire induite par le VEGF^{346,356}. SHB en effet interagit avec la protéine tyrosine kinase FAK *in vitro*³⁴⁶. La signalisation impliquant FAK et son substrat paxilline agit au niveau de la migration des cellules endothéliales³⁵⁷. La perte de Shb chez la souris provoque des malformations de l'embryon qui conduisent à une létalité embryonnaire avant E8.5³⁵⁸. La signalisation induite par SCK et SHB n'est pas encore comprise entièrement.

II.3. Phosphorylation de la tyrosine 951 (949 chez la souris)

Après liaison du VEGF sur VEGFR-2, la protéine adaptatrice TAd («*T-cell specific adaptor*») vient se fixer transitoirement au niveau de la tyrosine 951 phosphorylée, ceci induit le recrutement et l'activation de c-Src («*cellular SRC kinase*») par phosphorylation de sa

tyrosine Y418 et déphosphorylation de Y527^{359,360}. Cette activation est essentielle à la formation de fibres de stress en réponse au VEGF, et participe à la régulation de la perméabilité vasculaire.

Parmi les substrats de c-Src on retrouve en effet des composés du cytosquelette, comme l'actine, des composés impliqués dans l'interaction cellules/cellules régulant la perméabilité vasculaire, mais aussi les interactions cellules/matrice extracellulaire régulant l'adhésion cellulaire. Ainsi, ce n'est pas surprenant qu'une mutation au niveau de la tyrosine 951 (Y951F), ou le blocage de TSA_d entraîne des anomalies de migration et de réorganisation du cytosquelette d'actine après induction au VEGF *in vitro*.

La délétion de TSA_d chez la souris entraîne une diminution de la perméabilité vasculaire en réponse au VEGF associée à des perturbations des jonctions cellulaires gouvernée par la VE-Cadhérine³⁵⁹. En fait, c-Src, phosphoryle la VE-Cadhérine après induction du VEGF³⁶¹, ce qui entraîne son internalisation. Ceci conduit à une rupture des jonctions adhérentes et donc, une augmentation de la perméabilité vasculaire³⁶².

L'activation de c-Src entraîne également la phosphorylation sur des sites de la protéine tyrosine kinase FAK, qui siège au niveau des plaques d'adhérence, zone qui assure l'accrochage des filaments d'actine à la membrane cellulaire. L'activation de FAK par c-Src est essentielle à la régulation de la forme des cellules, de l'adhésion cellulaire³⁶³, ainsi que de la perméabilité³⁶⁴ en réponse au VEGF-A.

II.4. Phosphorylation de la tyrosine 1214 (1212 chez la souris)

La phosphorylation de VEGFR-2 sur la tyrosine 1214 entraîne le recrutement de la protéine adaptatrice NCK³⁶⁵ et la tyrosine kinase cytoplasmique FYN. Ce complexe NCK/FYN induit la phosphorylation de PAK-2 et activation de CDC42 puis p38-MAPK. Ceci induit le remodelage de l'actine intracellulaire nécessaire à la migration endothéliale sous l'effet du VEGF. Une substitution de la tyrosine 1212 par une phénylalanine (Y1212F) chez la souris n'entraîne pas d'anomalie majeure chez les souris qui sont viables et fertiles³⁴⁵.

III. RÉGULATION DE LA SIGNALISATION

III.1. Description générale

La régulation des signalisations gouvernées par des facteurs extracellulaires sur leur récepteur, tel que celle du VEGF et VEGFR-2, s'effectue à différents niveaux. Le contrôle strict de la quantité de récepteurs présents à la surface cellulaire permet par exemple la modulation de la sensibilité cellulaire au facteur extracellulaire. A court terme, ce contrôle est dépendant du phénomène de trafic intracellulaire des récepteurs membranaires, aussi appelé : « endocytose ». C'est un processus physiologique d'internalisation des récepteurs à l'intérieur des cellules par bourgeonnement de vésicule d'endocytose puis adressage à différents compartiments endosomaux. Initialement l'unique rôle attribué au phénomène d'endocytose

était l'atténuation du signal comme nous venons de le présenter, mais, il est clair maintenant que la signalisation se poursuit dans divers compartiments endosomaux. Le trafic d'endosomes contenant des récepteurs activés (Récepteurs Tyrosine Kinase et GPCR) sert de moyen majeur pour réguler la signalisation des récepteurs. La perte ou l'enrichissement des substrats et le recrutement d'effecteurs variables selon les compartiments vont ainsi permettre de moduler la force et la durée du signal.

Grâce à ce phénomène, l'ensemble de signaux très similaires entraînant l'activation des récepteurs tyrosine kinase et permettant de réguler la prolifération, la survie, ou la migration cellulaire, et peut également entraîner des conséquences biologiques très variables. Par exemple, l'activation de la voie ERK1/2 par VEGF, fortement modulée par le trafic intracellulaire du VEGFR-2, est essentielle pour le contrôle de la spécification du devenir artériel³⁵¹, mais l'activation de cette même voie ERK1/2 spécifiquement par FGF ne présente pas cet effet.

III.2. Trafic vésiculaire de VEGFR-2

Le récepteur principal au VEGF, VEGFR-2 voit son internalisation stimulée par liaison au VEGF, mais le récepteur inactif est également recyclé constitutivement³⁶⁶. La formation de la vésicule d'endocytose s'effectue à l'aide de molécules qui vont déformer la membrane plasmique dans le domaine intracellulaire, aboutissant au bourgeonnement de la vésicule vers le cytosol. Il existe différents mécanismes d'endocytose reposant sur des composantes protéiques différentes. En condition normale, la voie prédominante pour VEGFR-2 est celle dépendante de la clathrine³⁶⁷. On observe également une possibilité d'internalisation de VEGFR-2 par la voie cavéoline-dépendante ou par macropinocytose³⁶⁸.

Une fois internalisées, les vésicules vont perdre leur manteau de clathrine et fusionnent avec les endosomes précoces³⁶⁷. Ces endosomes sont caractérisés par la présence des GTPases Rab5 et de EEA1. Une fois au niveau des endosomes précoces, deux devenir sont possibles : le recyclage lent ou rapide des récepteurs à la membrane plasmique via les endosomes de recyclage, ou leur dégradation par un adressage aux endosomes tardifs. Ces derniers sont formés par invagination de petites vésicules intraluminales³⁶⁹. Une fois au niveau de ces endosomes multivésiculaires, les récepteurs seront adressés vers les lysosomes où ils seront dégradés.

Comme nous avons vu dans la partie précédente, VEGFR-2 est souvent sous forme de complexe au niveau de la membrane plasmique, avec VEGFR-1 et VEGFR-3³⁰⁹ mais également Nrp1³²⁶, VE-Cadhérine³⁷⁰ des intégrines et Ephrin B-2³⁷¹. À l'intérieur de la cellule, VEGFR-2 est également impliqué avec de nombreux partenaires, et notamment des protéines tyrosine phosphatases tel que PTP1B, VE-PTP³⁷², DEP1, ou TC PTP³⁷³. Ces protéines sont impliquées dans la régulation de l'endocytose de VEGFR-2.

La délétion d'Ephrin B-2 dans les cellules endothéliales par exemple inhibe l'endocytose de VEGFR-2 et ceci malgré des stimulations au VEGF. *In vivo* une mutation dans le domaine cytoplasmique d'EphrinB2 entraîne une diminution du nombre de filopodes ainsi que de la densité vasculaire des rétines de souris. Ceci illustre qu'en absence d'endocytose du récepteur

au niveau de la cellule tip, la signalisation de celui-ci ne s'effectue pas efficacement et entraîne des anomalies de bourgeonnement et de formation de filopodes³⁷¹.

La VE-Cadhérine est également impliquée dans ce contrôle de l'internalisation de VEGFR-2, mais en le maintenant à la membrane plasmique. Elle forme en effet un complexe avec VEGFR-2 au niveau des jonctions cellulaires et maintient VEGFR-2 en état inactif par liaison avec les complexes comprenant les protéines tyrosine phosphatases VE-PTP et DEP-1. La perte de la VE-cadherine *in vitro* entraîne ainsi une augmentation de l'endocytose de VEGFR-2 et de la signalisation ERK.

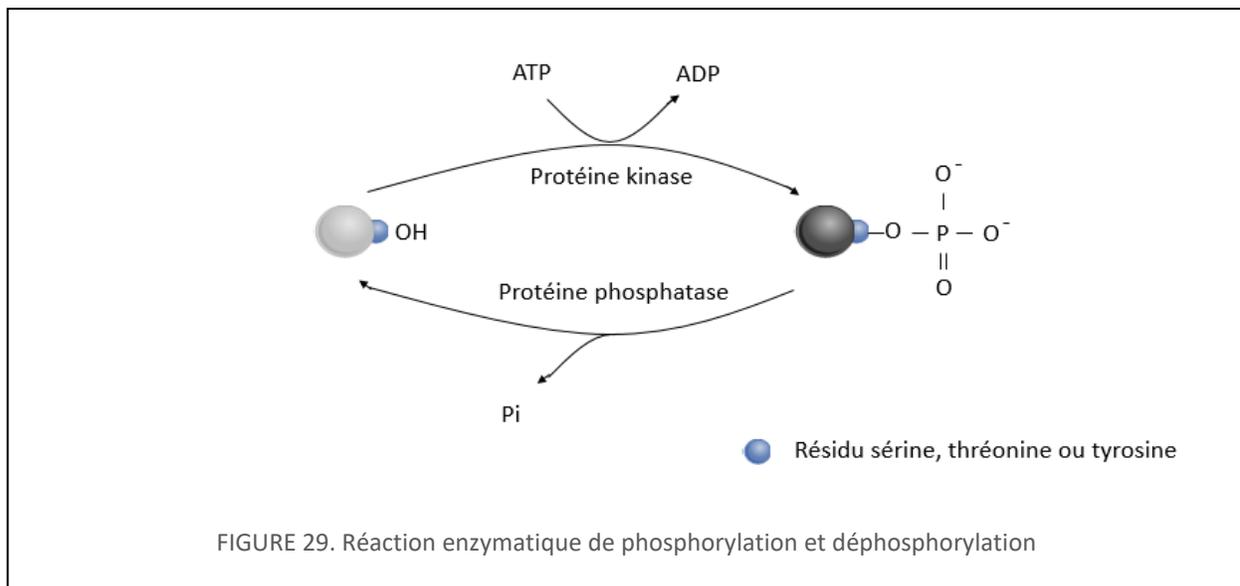
PARTIE 3 : LES PROTÉINES TYROSINES PHOSPHATASES

I. PRÉSENTATION GÉNÉRALE DES PHOSPHATASES

I.1. Phosphatases et Kinases

Le processus de phosphorylation est effectué par les protéines kinases et consiste en l'ajout d'un groupement phosphate sur une protéine. À l'inverse, la déphosphorylation permet l'hydrolyse de ce groupement et est catalysée par les protéines phosphatases. Ces dernières ont longtemps été perçues comme des enzymes servant uniquement à contrecarrer passivement les activités des kinases. Il est clair maintenant que les activités des phosphatases sont spécifiques et finement régulées et que la coordination avec celles des kinases est essentielle à une régulation adéquate des événements de signalisation intracellulaire en réponse à des stimuli.

Le processus de phosphorylation et de déphosphorylation est une modification post-traductionnelle très rapide, ne nécessitant pas la synthèse ou la dégradation de nouvelles protéines. Cet équilibre gouverne la propagation d'un signal permettant de contrôler des processus biologiques aussi variés que le métabolisme, la transmission des signaux extracellulaires, l'expression génétique ou encore les différentes étapes du cycle cellulaire. Ainsi, il n'est pas surprenant qu'une activité aberrante des phosphatases ait été rapportée dans la pathogenèse de nombreuses pathologies allant du cancer aux maladies d'immunodéficiences.



Il est estimé qu'environ 30% des protéines codées par le génome humain sont phosphorylables³⁷⁴ et il existe 538 protéines kinases et 150 protéines phosphatases connues^{375,376}. Chacun de ces deux groupes, kinase et phosphatase ont historiquement été subdivisés en fonction des acides aminés sur lesquels le groupement phosphate est ajouté ou

enlevé. Parmi ces acides aminés, on retrouve majoritairement les sérines, thréonine et tyrosine. On parle ainsi de: protéine Sérine/Théonine kinase ou phosphatase ainsi que de: protéine tyrosine kinase ou phosphatase. Il faut savoir cependant qu'il existe également des phosphorylations sur des résidus cystéines, glutamate, aspartate, arginine et histidine^{377,378}.

Une étude protéomique sur des cellules eucaryotes a permis de montrer que les phosphorylations sur les résidus sérine (pSer) représentent environ 86% des phosphorylations totales, celles sur les résidus thréonine (pThre) 12%, et celles sur les tyrosines (pTyr) 2% environ³⁷⁹.

Ainsi la phosphorylation des résidus sérine/thréonine est plus abondante dans les cellules eucaryotes. Cependant, la régulation de la phosphorylation des résidus tyrosine est un mécanisme clé dans l'activation de voies de signalisation essentielles pour un très large panel d'activités cellulaires primordiales à la physiologie des eucaryotes³⁸⁰. Il est intéressant d'ajouter également, que la phosphorylation régulée des résidus de sérine (pSer) et de thréonine (pThr) est apparue avec les tous premiers organismes unicellulaires, tandis que la transduction des signaux par phosphorylation de résidus tyrosines a émergé plus tard dans l'évolution, coïncidant avec l'évolution des animaux multicellulaires. Il a ainsi été proposé que l'émergence des mécanismes permettant la phosphorylation des tyrosines auraient eu un rôle essentiel à l'apparition des métazoaires multicellulaires^{381,382}.

Les protéines tyrosine phosphatases (PTPs) sont des régulateurs essentiels qui modulent la transduction des signaux à différents niveaux. Les cibles des PTPs peuvent être, par exemple des récepteurs membranaires tels que les protéines tyrosine kinases (PTK), des canaux ioniques, des molécules adaptatrices, des kinases intracellulaires ou des facteurs de transcription.

I.2. Historique

La première description de l'activité de phosphorylation remonte aux années 1950 avec les travaux de Burnett et Kennedy sur la caséine kinase³⁸³. Peu de temps après, l'implication de ce processus dans la régulation de la signalisation protéique a été mise en lumière par E.H. Fisher et E.G. Krebs³⁸⁴. Ils ont démontré que la forme B de la phosphorylase pouvait être convertie en forme A en présence de Mg-ATP et d'une enzyme appelée: la phosphorylase kinase³⁸⁵. Ce fut la première sérine/thréonine kinase identifiée. Leurs travaux ont été récompensés par le prix Nobel de physiologie et de médecine en 1992^{386,387}.

En 1978, il a été rapporté pour la première fois une phosphorylation sur un résidu tyrosine en même temps que l'identification de la première tyrosine kinase, SRC^{388,389}. Bien que quelques groupes aient identifié des PTPs au début des années 1980³⁹⁰, ce n'est que dix ans plus tard qu'a lieu la purification par l'équipe de Nick Tonks^{391,392} puis, le clonage par l'équipe de Jack Dixon³⁹³ de la première protéine tyrosine phosphatase, PTP1b. S'en est suivie une phase d'identification d'un très grand nombre de PTPs, et la mise en place de méthodes d'identification de leurs substrats.

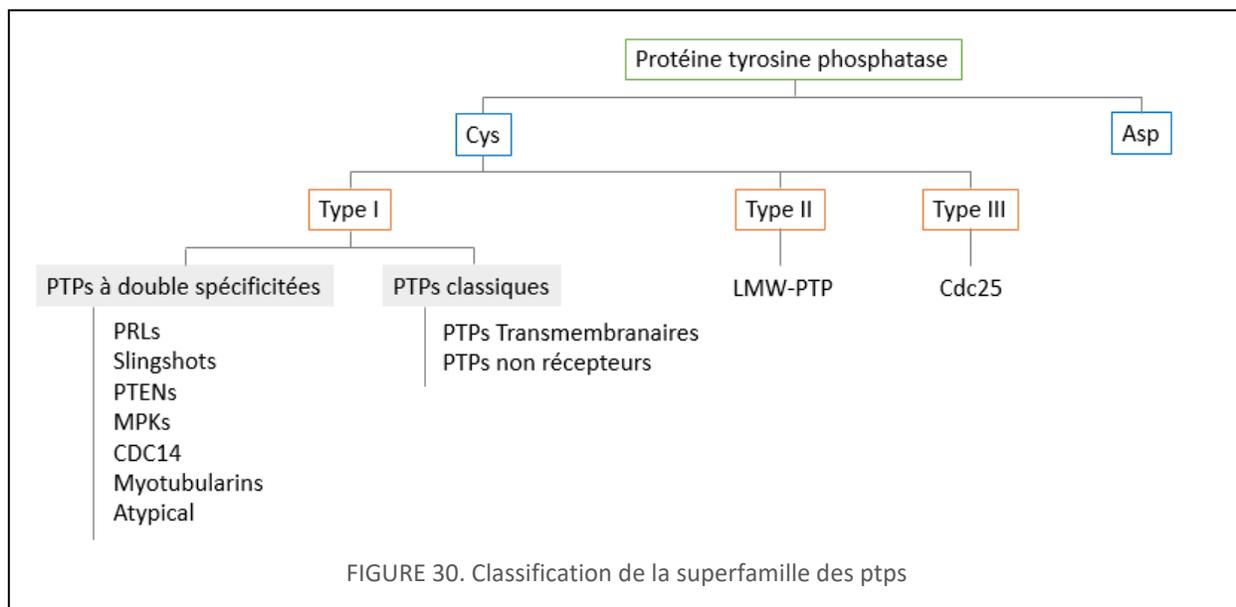
I.1. Les Protéines Tyrosines Phosphatases

I.1.1 Classification

Chez l'homme, la famille des PTPs comprend une centaine (107) de gènes très divers qui rend difficile leur classification. Les membres de cette famille présentent tous une séquence consensus caractéristique, C(x)5R. Nous allons décrire ici la classification des principales 107 PTPs, mais, il faut savoir que de récentes classifications se basant sur des études géniques associées à des critères de fonction et de structures comptabilisent un plus grand nombre de phosphatases avérées ou prédites (189) parlant de PTPome étendu^{376,394}.

Généralement la famille PTPs, est répartie en quatre groupes selon leur séquence en acides aminés de leur domaine catalytique³⁹⁵. Le groupe I, II et III, partagent la même séquence HC-X₅-R au niveau de leur domaine catalytique contenant un acide aminé clef, une cystéine qui initie l'attaque nucléophile nécessaire à la déphosphorylation de leur cible. Le groupe IV pour sa part utilise un mécanisme catalytique dépendant non plus d'une cystéine mais d'un acide aspartique³⁹⁴.

La majorité des PTPs, soit environ 99 membres est classée dans le groupe I. Ce groupe est subdivisé en PTP classiques comprenant des PTP transmembranaires (PTPRs) et non transmembranaires (PTPNs), et en PTPs à double spécificités (DSP~65 membres) qui ont la capacité de déphosphoryler leur substrat à la fois sur des résidus tyrosine mais également sur des sérines/thréonines³⁹⁶. Cette dernière catégorie est également nommée VH1-like phosphatase (Vaccinia H1-like phosphatases). Les PTPs à double spécificités présentent une grande variabilité et sont subdivisées en 7 groupes. La famille PRL, constitue un de ces groupes.

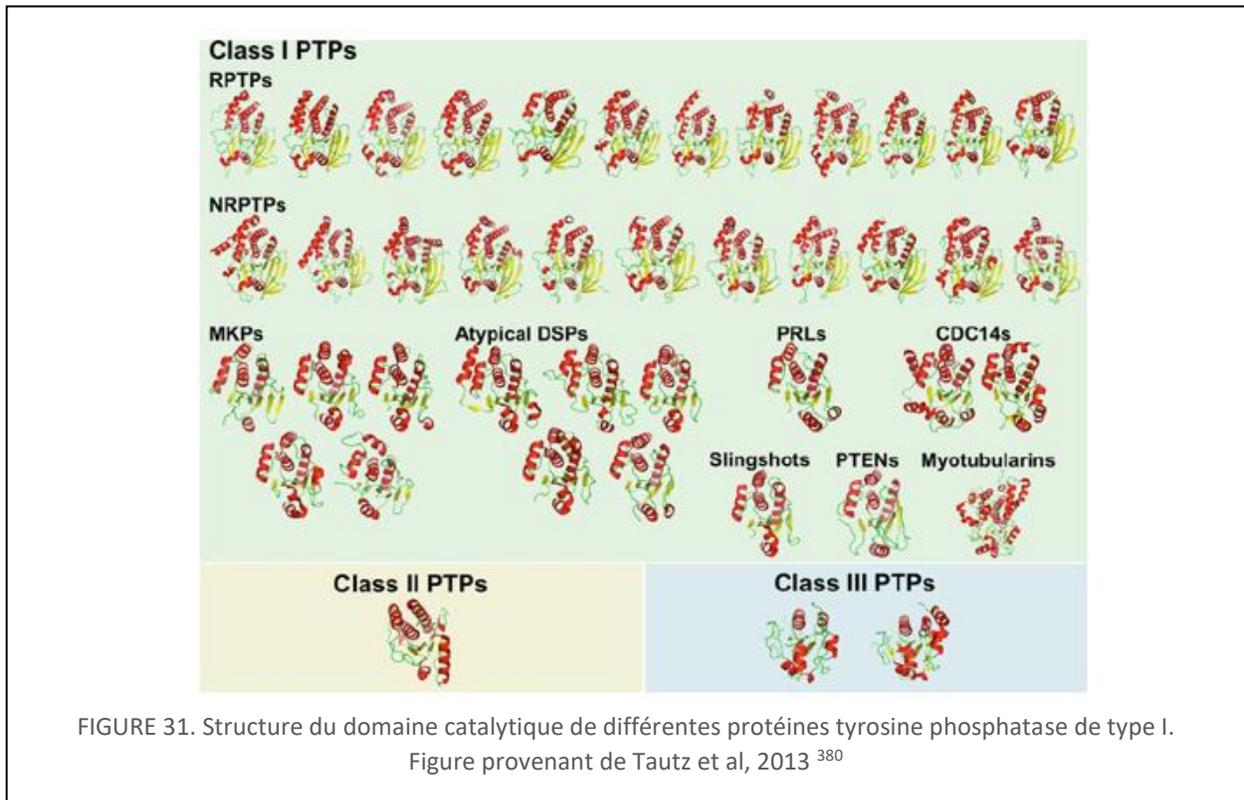


Parmi les PTP classiques, les PTPRs sont ancrés dans la membrane plasmique et possèdent un domaine extracellulaire leur permettant de lier des substrats solubles ou d'interagir avec la matrice extracellulaire. Le domaine catalytique des PTPRs est localisé dans la

partie cytosolique de ces PTPs. Les PTPNs sont quant à elles retrouvées dans le cytosol et peuvent être localisées dans différents compartiments intracellulaires. La plupart du temps les PTPNs présentent des domaines supplémentaires permettant l'association avec différents régulateurs (domaines riches en prolines, FERM, PDZ). Le groupe II consiste en une seule phosphatase de faible poids moléculaire (LMW-PTP)³⁹⁷ (18kDa) alors que les régulateurs du cycle cellulaire et de l'apoptose³⁹⁸ cdc25a, cdc25b et cdc25c sont répartis dans le groupe III³⁹⁹.

I.1.2 Caractéristiques structurales des protéines tyrosine phosphatase type I (classique et DSPs)

La première structure résolue par cristallographie d'une PTP fut celle de PTP1B en 1994⁴⁰⁰. Depuis lors, de nombreuses autres structures des PTP humaines ont été résolues⁴⁰¹. La comparaison du domaine catalytique de ces différentes PTP a permis l'identification de dix domaines caractéristiques extrêmement conservés^{396,401-404}. Certains de ces domaines sont essentiels à la réaction de catalyse, tandis que d'autres ne sont partagés que par certaines PTPs⁴⁰⁵. La figure 31 ci-dessous souligne la grande conservation de structure des domaines catalytiques de différentes PTPs.

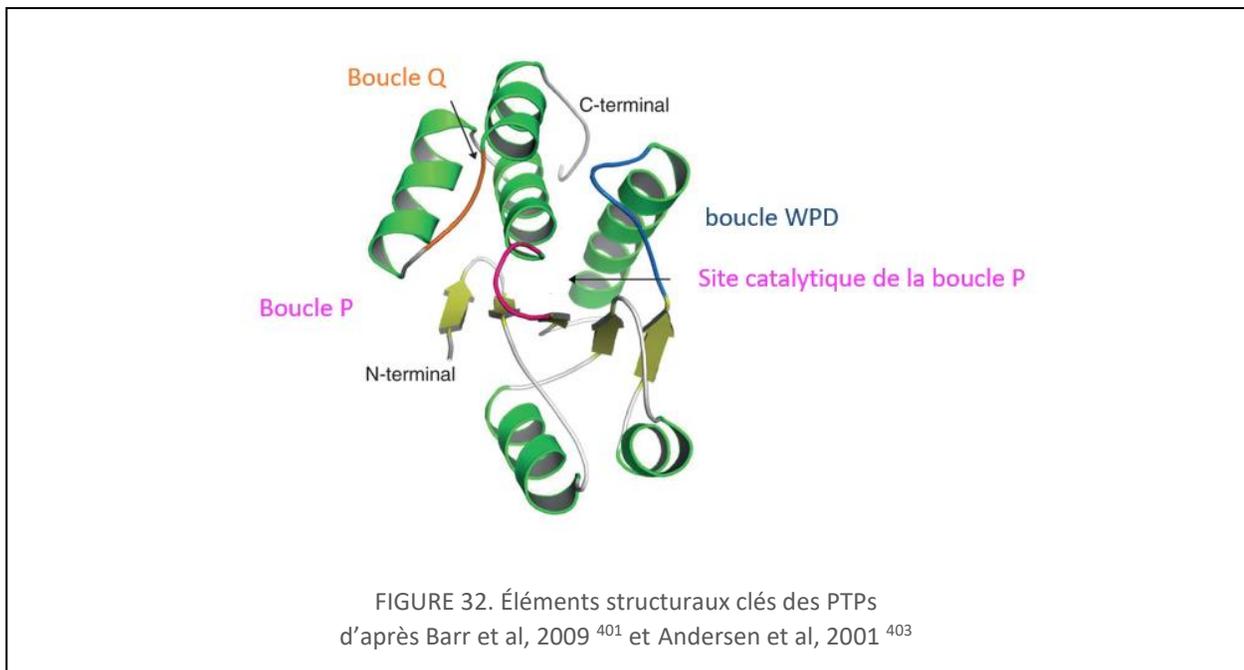


Tous les membres de la famille PTP sont caractérisés par la présence du motif signature, HC-(X5)-R (motif M9) sur une boucle nommée boucle P au creux de la poche catalytique (figure 32). Cette séquence contient la cystéine catalytique (C), ainsi qu'une arginine (R) qui stabilise les différentes étapes intermédiaires de la réaction. Ces deux résidus sont essentiels à l'activité

catalytique de l'enzyme. La boucle P est l'unique domaine commun à toutes les PTPs. Il faut noter la présence d'un résidu sérine ou thréonine proche de l'arginine qui est retrouvé dans la plupart des PTPs classiques et DSPs et dont le groupement hydroxyle (-OH) aide à la réaction de catalyse^{406,407}.

La liaison du substrat au niveau de la boucle P favorise la fermeture d'une boucle flexible conservée entre les différentes PTPs portant la séquence WPD (tryptophane, proline, acide aspartique) (Motif M8). L'acide aspartique de cette boucle est critique au bon fonctionnement de la catalyse du substrat. En fait, cette boucle, nommée WPD existe sous deux conformations distinctes, une "ouverte" permettant une interaction faible avec la boucle P, et une "fermée", où la boucle WPD est repliée sur le site actif, amenant le résidu Acide aspartique conservé au plus près du substrat^{400,408}. En absence de substrat cette boucle fluctue entre une conformation fermée et ouverte, par contre, seule la conformation ouverte permet la fixation d'un substrat. Cette boucle WPD est localisée approximativement de 30 à 40 résidus avant le motif signature des PTPs de la boucle P dans la structure primaire. La boucle WPD est très conservée entre les PTPs de la classe I (classique et DSP), mais n'est pas retrouvée au niveau des CDC25 par exemple.

Les PTPs classiques présentent une boucle particulière, la boucle de reconnaissance pTyr, qui entraîne la formation d'une poche catalytique profonde permettant uniquement l'insertion des résidus pTyr. Cette boucle permet en effet de discriminer entre les résidus pTyr plus longs et les pSer et pThr plus courts, seuls les résidus pTyr seront capables d'atteindre le fond de la poche catalytique. Les DSPs, ne présentant pas cette boucle de reconnaissance, ont une poche catalytique moins profonde de 3 Ångstroms qui permet à la fois l'insertion des résidus pThr et pSer et celle des pTyr^{409,410}.



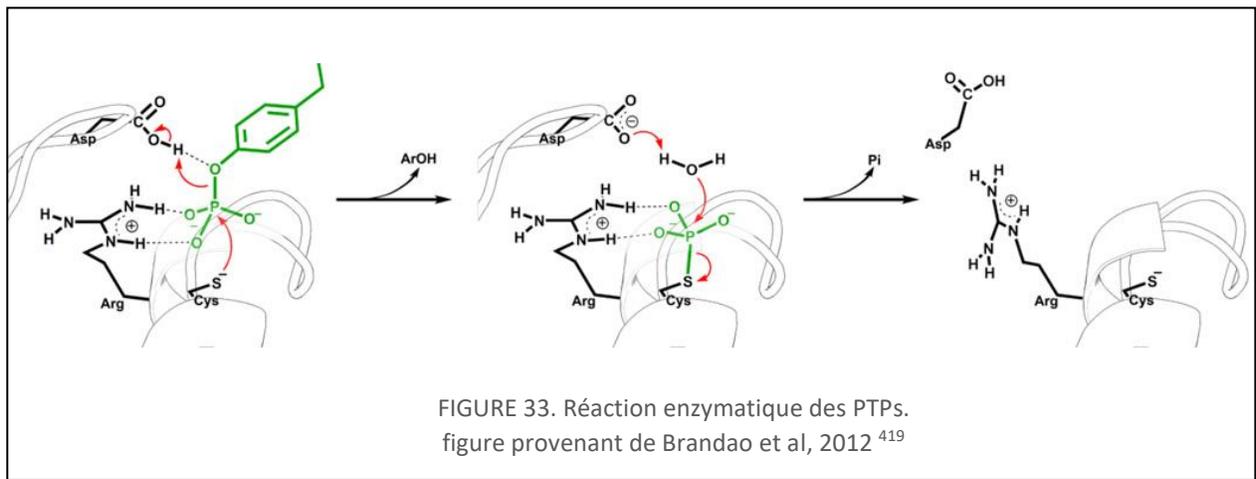
La boucle Q est retrouvée au niveau des PTPs classiques uniquement. Cette boucle est nommée ainsi car elle contient des résidus glutamine (Q) conservés à 97%. Il existe une boucle similaire au niveau des DSPs mais qui ne contient pas de résidus glutamine ni d'acide aminé fortement conservé.

I.2. Le processus de déphosphorylation gouvernés par les PTPs (Cys)

Des études cinétiques⁴¹¹⁻⁴¹³ associées à des informations structurales^{400,408,409,413} ont permis d'élucider le mécanisme de catalyse effectué par des PTPs. En fait, la déphosphorylation des protéines par les PTP implique tout d'abord l'insertion du phosphoamino-acide du substrat dans la poche catalytique de la phosphatase, où il se trouve alors à proximité de la cystéine catalytique de la boucle P. Le mécanisme s'effectue par la suite en deux étapes chimiques successives, présentées sur la figure 33 ci-dessous.

Dans un premier temps, l'acide aminé catalytique de l'enzyme (la cystéine) initie une attaque nucléophile sur le groupement phosphate du substrat. En effet, la cystéine catalytique des phosphatases, enfouie dans la poche catalytique qui lui crée un microenvironnement chargé positivement, présente un $pK_a \approx 5$. Ceci la rend extrêmement réactive à des pH physiologiques⁴¹⁴. Cette attaque nucléophile conduit à la formation d'un intermédiaire phosphocystéine⁴¹⁵ et est couplée à la protonation de l'oxygène du groupement phénol du substrat. Ceci entraîne la libération du substrat déphosphorylé⁴¹⁶. Le proton nécessaire à cette étape est fourni par l'acide aspartique situé sur la boucle WPD se trouvant à proximité du substrat grâce à la conformation fermée de celle-ci. Le résidu arginine de la boucle P forme des liaisons faibles avec les deux atomes d'oxygène libre du groupement phosphate et permet à la fois, la reconnaissance du substrat mais également la stabilisation de celui-ci ainsi que de l'intermédiaire thiophosphate dans la poche catalytique de l'enzyme⁴¹⁷.

Enfin, dans une seconde étape le phosphate du complexe phosphocystéine est transféré à une molécule d'eau aidé de nouveau par l'acide aspartique de la boucle WPD. Ceci permet la restauration de l'enzyme initiale, et le retour à une conformation ouverte de la boucle WPD. La stabilisation de la molécule d'eau nécessaire à cette dernière étape est effectuée par une glutamine de la boucle Q des PTPs classiques. D'autre part, le groupement hydroxyle d'une sérine ou thréonine avoisinant l'arginine de la boucle P est importante pour la séparation du complexe intermédiaire et pour la stabilisation du groupement thiol (-S) de la cystéine catalytique^{406,407}. La mutation S131A dans la DSPs VHR a dramatiquement affecté la capacité de VHR d'hydrolyser le complexe intermédiaire^{407,418}.



Il est très difficile d'isoler des PTPs en association stable avec leurs substrats en raison de la nature transitoire de ce complexe⁴⁰³. Par contre, une mutation du résidu cystéine de la boucle catalytique (C) pour une sérine (S)⁴²⁰ ou une alanine (A)^{421,422} abroge toute activité enzymatique tout en conservant une affinité pour les substrats *in vitro*. Cette caractéristique a été utilisée pour isoler des complexes stables formés de la phosphatase liée à ses substrats⁴⁰⁹. C'est grâce à ces mutants, nommé C/S, que de nombreux substrats physiologiques pour plusieurs PTPs ont été identifiés^{409,420,423,424}.

Une autre stratégie pour piéger les substrats consiste à muter l'acide aspartique (D) de la boucle WPD. En effet, comme nous venons de voir, cet acide aspartique est également un résidu critique pour la fonction enzymatique des PTPs puisqu'il fournit au substrat un atome d'hydrogène, lui permettant de se libérer de son groupement phosphate et de se détacher de la phosphatase. Il est également essentiel à la deuxième étape de catalyse, celle de renouvellement au statut initial de l'enzyme. La mutation de ce résidu pour une alanine génère un mutant que l'on appelle D/A. Il possède une très grande capacité de rétention de manière stable du substrat^{423,425,426}.

II. PTP ET ANGIOGENÈSE: RÉGULATION DES ACTIVITÉS DU RÉCEPTEUR VEGFR2 PAR LES PTPS

II.1. Vue d'ensemble des phosphatases connues pour agir sur la signalisation VEGFR-2 directement ou indirectement

Les PTPs sont impliquées dans une très grande variété de processus biologiques, ainsi ce n'est pas surprenant qu'un certain nombre de PTPs favorisant ou réprimant l'angiogenèse ait été identifié.

Parmi les PTPs impliquées dans le système vasculaire, certaines agissent par déphosphorylation du récepteur clef VEGFR-2, tandis que d'autres modulent sa signalisation. Parmi les phosphatases connues pour déphosphoryler des sites de VEGFR-2, on retrouve, VE-PTP³⁷² et DEP-1⁴²⁷ qui sont des PTPs transmembranaires, ainsi que PTP1B⁴²⁸, TC-PTP³⁷³, Shp1⁴²⁹, Shp2⁴³⁰, PTP-MEG2⁴³¹ et LMW-PTP⁴³². Toutes ces phosphatases modulent négativement la signalisation de VEGFR-2 par déphosphorylation du récepteur au VEGF. D'autres phosphatases ont été montrées comme régulant positivement la signalisation de VEGFR-2, mais ceci a été

reporté en aval de VEGFR-2. Nous allons présenter ici quelques unes des PTPs connues pour agir directement sur VEGFR-2.

II.2. VE-PTP

La VE-PTP, ou PTPRB chez l'homme, est un exemple de phosphatase impliquée dans le processus d'angiogenèse. C'est une PTP de type récepteur dont l'expression est restreinte chez l'adulte aux cellules endothéliales, et particulièrement au niveau de l'endothélium artériel⁴³³. Sa délétion globale chez la souris entraîne la mort embryonnaire au stade E9.5-10 associée à des anomalies majeures de remodelage du plexus vasculaire primitif en un réseau fonctionnel^{433,434}. Dans l'endothélium adulte, VE-PTP s'associe et déphosphoryle des substrats situés au niveau des jonctions cellulaires, comme le récepteur de l'angiopoïétine Tie2, et un des composants des jonctions adhérentes, VE cadherine, ainsi que le VEGFR-2^{372,435,436}. En fait, VE-PTP permet le maintien de la VE-cadherine dans un état déphosphorylé, entraînant une stabilisation du vaisseau mature et une diminution de la perméabilité vasculaire⁴³⁵. Lorsque VEGFR-2 est activé par le VEGF, il y a dissociation du complexe entraînant une augmentation de la perméabilité vasculaire essentielle à l'initiation de l'angiogenèse⁴³⁷. De ce fait, les souris mutées dans lesquelles le complexe VE-PTP/VE-cadherine est impossible à dissocier ont une diminution de la perméabilité vasculaire induite par le VEGF⁴³⁸.

Des études *in vitro* à l'aide de la méthode de 'trapping' effectuées à l'aide de mutant D/A de VE-PTP ont permis de montrer que cette phosphatase nécessite Tie2 pour se lier au VEGFR-2⁴³⁹. La diminution de VE-PTP dans les cellules endothéliales entraîne une augmentation de la signalisation en réponse au VEGF³⁷². On retrouve ainsi, une persistance de la phosphorylation des sites Y951 et Y1175 de VEGFR-2, ainsi qu'une augmentation de la prolifération. D'autre part, le modèle de corps embryonnaire a permis de montrer qu'en l'absence de VE-PTP le bourgeonnement est excessif et le nombre de filopodes augmente en réponse au VEGF⁴³⁹. VE-PTP permet l'orchestration de la maturation des jonctions cellulaires, de la polarisation de la CE et de la formation de la lumière lors de l'angiogenèse en réponse au VEGF.

II.3. PTP1B

PTP1B est une phosphatase intracellulaire exprimée ubiquitairement. Structuellement cette phosphatase possède en plus de son domaine catalytique, un domaine d'ancrage au réticulum endoplasmique qui lui permet de s'orienter vers le cytoplasme et de déphosphoryler des cibles intracellulaires^{440,441}, ou membranaires lorsque le RE se trouve intimement en contact avec la membrane plasmique⁴⁴². De plus sa position ancrée au RE lui permet d'agir également sur des protéines nouvellement synthétisées.

Parmi les nombreux substrats connus de PTP1B, on retrouve le récepteur à l'insuline^{443,444} et VEGFR-2⁴²⁸. La délétion de PTP1B chez les souris n'affecte ni leur viabilité, ni leur fertilité, mais entraîne une hypersensitivité à l'insuline apportant une résistance à l'obésité⁴⁴⁴. La délétion spécifique de PTP1B au niveau des cellules endothéliales est associée à une augmentation de la densité vasculaire, du nombre de branchement et du nombre de filopodes du réseau vasculaire

rétinien sans affecter la vitesse de recouvrement. Les souris présentent également une augmentation de l'angiogenèse en réponse au VEGF entraînant une accélération du processus de cicatrisation après blessure⁴⁴⁵.

Au niveau des cellules endothéliales, la diminution de PTP1B entraîne une persistance de la phosphorylation du site 1175 de VEGFR-2, entraînant une persistance de la voie RAF–MEK–ERK ce qui aboutit à une augmentation de la prolifération cellulaire⁴²⁸. Par contre, la migration induite par le VEGF n'est pas affectée⁴²⁸.

PTP1B pourrait agir sur VEGFR-2 lorsqu'il est encore à la membrane plasmique mais le mécanisme n'est pas encore connu. Par contre il est établi maintenant que PTP1B agit sur VEGFR2 une fois internalisé^{351,446}. PTP1B déphosphoryle VEGFR-2 sur le site Y1175 préférentiellement lorsque VEGFR-2 se trouve dans les endosomes précoces exprimant EEA1⁴⁴⁶.

II.4. DEP-1

DEP-1, une phosphatase de type récepteur, est exprimée par plusieurs types cellulaires dont les cellules endothéliales⁴⁴⁷, épithéliales et hématopoïétiques⁴⁴⁸. L'expression de cette phosphatase augmente avec la confluence cellulaire⁴⁴⁹, et il a été montré que DEP-1 contribue à l'inhibition de contact, un processus permettant aux cellules confluentes de cesser de proliférer.

Parmi les différents substrats de DEP-1 on retrouve, VEGFR-2⁴⁵⁰ et Src⁴⁵¹. En fait, DEP-1 s'associe directement au VEGFR2 et semble le déphosphoryler préférentiellement sur les résidus Y1054 et Y1059, essentiels à l'autoactivation du récepteur. Ainsi, la déphosphorylation de ces résidus par DEP-1 se traduit par une baisse de la phosphorylation globale de VEGFR2 sur les sites majeurs de phosphorylation⁴⁵⁰. Ainsi, la diminution de DEP1 *in vitro*, se traduit par une augmentation de la phosphorylation globale de VEGFR-2 après induction au VEGF⁴⁵⁰.

Parallèlement à cet effet inhibiteur sur VEGFR-2, il a été démontré que DEP-1 va activer src en déphosphorylant son site inhibiteur Y527. Ceci entraîne l'activation de plusieurs fonctions biologiques qui dépendent de la signalisation induite par src, telles que la survie cellulaire, la perméabilité vasculaire et l'invasion^{450,452,453}. La déplétion de DEP-1 dans les cellules endothéliales humaines entraîne en effet une anomalie dans la perméabilité induite par le VEGF, celle ci est plus faible qu'en condition normale⁴⁵³. Afin d'illustrer la perméabilité vasculaire *in vivo*, du bleu evans est injecté dans le système vasculaire de la souris puis une injection locale de VEGF est effectuée en intra-dermique. En condition normale, la perméabilité est augmentée localement et se traduit par dispersion du bleu evans dans le tissu environnant, qui peut être quantifiée par extraction. Cette méthode a permis de démontrer que des souris délétées globalement pour DEP-1 ont une diminution de la perméabilité induite spécifiquement par VEGF⁴⁵⁴.

Malgré ce défaut de perméabilité, les souris délétées pour DEP-1 sont viables, fertiles, et ne présentent pas d'anomalie de croissance^{455,456}. Par contre, il existe un autre modèle de souris dans lesquelles la partie intracellulaire de DEP-1 a été remplacée par eGFP. Cette mutation est létale embryonnairement pour les souris au stade E10.5/E11.5. L'analyse des embryons a

permis de révéler des anomalies majeures du système vasculaire associées à une désorganisation des vaisseaux périphériques ainsi qu'une augmentation de la prolifération des cellules endothéliales⁴⁵⁷. Les raisons de ces différences phénotypique ainsi que le rôle de DEP-1 dans la vascularisation adulte sont encore à éclaircir. En effet, DEP-1 de par son action négative sur VEGFR-2 et activatrice sur la signalisation Src est complexe et son rôle semble être dépendant à la fois de son niveau d'expression mais également du contexte.

II.5. PRL-3: une phosphatase mystérieuse

PRL-3 est une protéine tyrosine phosphatase à double spécificité, faisant partie de la sous famille PRL contenant deux autres membres PRL-1 et PRL-2. Nous allons présenter dans la partie suivante cette famille, mais il faut savoir que globalement très peu de choses sont connues sur les rôles et les mécanismes d'action de ces 3 PTPs en conditions physiologiques. Contre toute attente cette PTPs semble réguler positivement la signalisation VEGF en modulant directement le niveau de phosphorylation de VEGFR-2.

III. LA FAMILLE PRL (PHOSPHATASES OF REGENERATING LIVER)

III.1. Identification et caractérisation

III.1.1 Historique

La famille PRL est composée de trois membres PRL-1 PRL-2 PRL-3, et forme un sous-groupe des protéines tyrosine phosphatase à double spécificité, les PRL-PTPs. Le premier membre de cette famille à avoir été découvert, PRL-1, a été initialement identifié en 1991 comme un gène précoce dont l'expression est très fortement augmentée lors du processus de régénération du foie chez le rat, et dans les cellules stimulées par des mitogènes⁴⁵⁸. C'est l'équipe de Diamond et al. qui caractérisa en 1994 cette protéine et la nomma, *Phosphatase of Regenerative Liver* en référence à cette découverte (littéralement : la phosphatase de la régénération du foie). Ils ont montré également que la séquence en acides aminés de cette nouvelle protéine comprenait la séquence consensus de 8 acides aminés caractéristiques des PTPs⁴⁵⁹. Subséquemment, PRL-2 a été identifiée chez l'homme par analyse génétique^{460,461}. Enfin, PRL-1,2 et 3 de souris ont été clonées et analysées⁴⁶¹⁻⁴⁶³. Ces trois protéines sont codées respectivement par les gènes PTP4A1, PTP4A2 et PTP4A3.

Les trois PRLs sont parmi les plus petites phosphatases dans la famille des PTPs avec une taille d'environ 20kDa, et leur locus est situé sur trois chromosomes différents chez l'homme (6,1 et 8) au niveau des régions suivantes: 6q12 pour PRL-1, 1p35 pour PRL-2 8q24.3 pour PRL-3³⁹⁵. Les trois protéines PRL partagent une faible similarité de séquence avec d'autres phosphatases à double spécificité (<20%)⁴⁶⁴⁻⁴⁶⁷, mais sont hautement conservées entre elles⁴⁶⁴. Chez l'homme PRL-1 et PRL-2 partagent en effet 87% d'homologie, tandis que PRL-3 présente respectivement 79% et 76% d'identité avec PRL-1 et 2^{460,467,468}. D'autre part, les PRLs présentent un très haut degré de conservation entre espèces suggérant un rôle critique de ces

protéines dans les fonctions cellulaires. Par exemple, les séquences protéiques de PRL-1 et 2 humain et de souris sont complètement identiques tandis que PRL-3 est à 96% identique^{462,469}.

Malgré cette très forte homologie, les trois enzymes de la famille présentent une expression tissulaire distincte suggérant un rôle indépendant de ses membres. Mystérieusement, aucun substrat physiologique ne leur a été clairement associé à ce jour, et leur activité de phosphatase sur des substrats non naturels est extrêmement faible. Cela rend cette famille très intrigante et suggère un rôle complexe, d'autant plus qu'une surrexpression de ces différents membres est hautement corrélée à la progression tumorale. De nombreuses études se sont ainsi focalisées sur l'implication de ces phosphatases dans un contexte tumoral. Ce n'est que très récemment que les premières études pointent un rôle essentiel de ces phosphatases dans des processus physiologiques tels que le contrôle de la régulation du magnésium intra-cellulaire⁴⁷⁰.

III.1.2 Distribution tissulaire

Initialement des Northern blot ont montré une expression très forte de PRL-2 au niveau des muscles squelettiques⁴⁶². Des études complémentaires d'hybridation *in situ* ont montré une expression élevée de l'ARNm de PRL-2 dans presque tous les tissus humains, suggérant un rôle fondamental de PRL-2 dans des fonctions physiologiques⁴⁷¹. PRL-1 a une distribution tissulaire plus variable, généralement moins forte que PRL-2 dans les mêmes tissus⁴⁷¹. PRL-1 est à peine détectable au niveau du foie humain ou des muscles squelettiques et totalement indétectable dans le cœur humain et dans l'artère coronaire. Au niveau de la rétine de souris, l'expression de PRL-2 est la plus forte au niveau de la couche nucléaire externe et interne et de la couche des ganglions⁴⁷². PRL-1 et PRL-2 sont aussi fortement exprimées au niveau du système nerveux lors du développement des drosophiles et des poissons zèbres⁴⁷³. PRL-3 présente quant à elle chez l'homme une expression restreinte au niveau du cœur et des muscles squelettiques en condition physiologique⁴⁶². Ainsi les trois PRLs présentent une distribution tissulaire ainsi que des niveaux d'expression variables.

III.1.3 Phénotype associé aux souris déficientes pour chacun des membres de la famille PRLs

Dans le tableau ci-dessous nous présentons les différents phénotypes qui ont été reportés dans la littérature pour les différents modèles génétiques de souris. Certaines études (en gris dans le tableau) ont été effectuées sur des fonds génétiques mix (129P2/OlaHsd:C57BL/6N) ou sur un nombre de rétrocroisement inférieur à 6 générations. Il est connu qu'un fond génétique « non pur » peut entraîner une atténuation des phénotypes observés, ou carrément des conséquences non relatives aux gènes étudiés. Une étude récente par Noriko Uetani a par exemple montré, que la fréquence des homozygotes pour PRL-2 à la naissance était différente entre un fond génétique mix et rétrocroisé pour plus de 6 générations⁴⁷⁴.

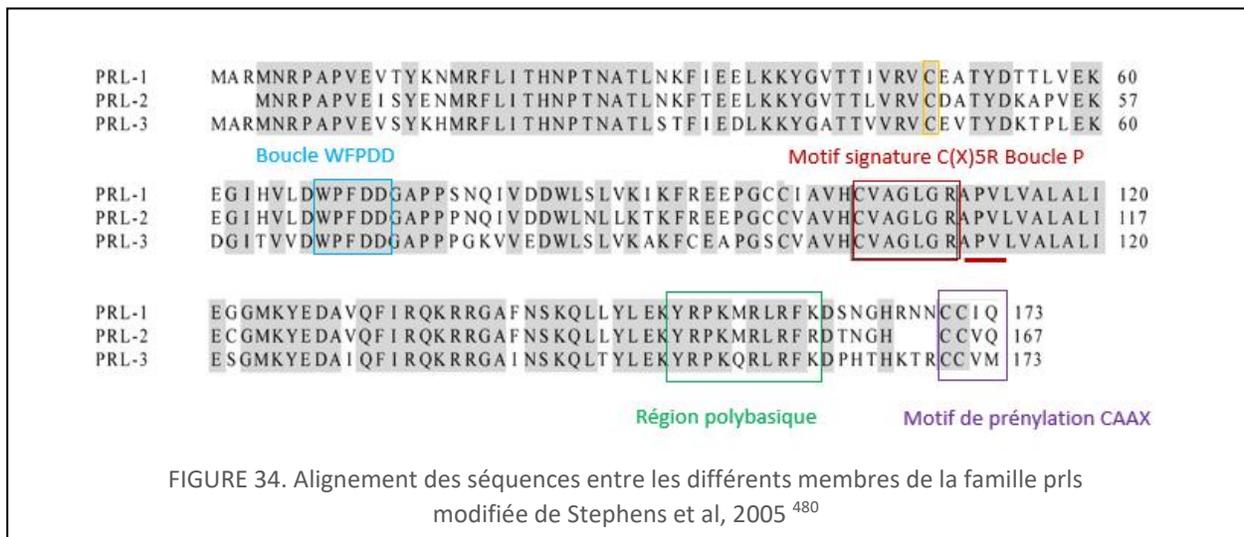
Il est intéressant de noter que même si les souris délétées pour chacune des PRLs sont viables à la naissance, la fréquence des homozygotes est plus faible que celle attendue⁴⁷⁵. D'autre part, la délétion de PRL-2 entraîne une mortalité précoce dans les 5 jours après la naissance suggérant un désavantage fort pour ces souris⁴⁷⁴. Enfin, la double délétion de PRL-1 et PRL-2 provoque la mort embryonnaire avant le stade E9.5 illustrant une possible compensation entre les membres de la famille PRLs.

	Phénotype	référence
PRL-1 -/-	<ul style="list-style-type: none"> - Similaire au wt - Fréquence des homozygotes légèrement plus faible que celle attendue 	475
PRL-2 -/-	<ul style="list-style-type: none"> - Environ 80% des femelles mortes dans les 3 jours après la naissance - Retard de croissance - Poids et taille plus faible que wt - Poids de la rate plus faible - altérations sex-dépendantes de la thermogenèse, du poids des tissus adipeux brun/blanc, des poumons, et de la taille des fibres musculaires - hématopoïèse inefficace et altération de la capacité de repeuplement à long terme des cellules souches hématopoïétiques - Niveau de magnésium dans le sérum plus élevé que la normale - Hypotrophie des testicules - Anomalie du développement du placenta 	474 475 470 476 477
PRL-3 -/-	<ul style="list-style-type: none"> - Fréquence des homozygotes plus faible que celle attendue - Poids légèrement plus faible - Perméabilité induite par VEGF diminuée - réponse anormale des souris à une injection intrapéritonéale de glucose (IPGTT) 	478 479
PRL-1 -/- /PRL-2 -/- double délétion	<ul style="list-style-type: none"> - mortalité embryonnaire < E9.5 	475

III.2. Caractéristiques structurales des PRLs

III.2.1 Caractéristiques communes aux autres PTPs

La structure de PRL-3 chez l'homme a été élucidée en 2004 par RMN⁴⁶⁴. Peu de temps après la structure cristallographique de PRL-1 a été publiée⁴⁶⁶. Comme les autres protéines tyrosine phosphatases, les PRL-PTP contiennent le site actif CX₅R dans la boucle catalytique, le motif WPD contenant le résidu acide aspartique qui aide à la formation et à l'hydrolyse de la phosphoenzyme intermédiaire (figure 34). Des alignements de séquences avec les autres DSPs montrent un pourcentage d'homologie inférieur à 20%, ce qui est typique dans cette classe d'enzymes relativement divergentes^{464,466}. Les PRLs présentent ainsi également des différences structurales qui affectent leur activité et spécificité.



III.2.2 Motif de prénylation, une caractéristique unique

Une caractéristique unique qui différencie les PRLs de toutes les autres PTPs est la présence d'un motif de prénylation CAAX à côté d'une région polybasique dans son domaine C-terminal, respectivement en violet et vert dans la figure 34^{462,481}. Ce motif peut être modifié post traditionnellement par ajout de lipide isoprénoïde farnésyl (15 carbones) ou géranylgeranyl (20 carbones), via une liaison thioether, sur la cystéine.

Ce phénomène est connu pour augmenter l'hydrophobicité des protéines facilitant ainsi leur localisation vers la membrane plasmique. Il a été démontré que ceci était vrai également pour les PRLs. En effet, la séquence CAAX des PRLs peut être farnésylée *in vivo*^{482,483}, et géranylgeranylée *in vitro*^{461,483,484}, même si ce phénomène semble plus controversé pour PRL-3^{483,484}. D'autre part, la prénylation des PRLs entraîne leur relocalisation au niveau de la membrane plasmique et dans des structures intracellulaires similaires à des endosomes précoces^{481,482,485}. Une mutation de la séquence CAAX⁴⁸¹ ou le traitement de cellules avec des inhibiteurs de l'enzyme farnésyl transférase (FTI-277) qui ajoute les groupements farnésyl sur ces substrats⁴⁸³, empêche en effet cet adressage membranaire et redirige les PRLs vers le

noyau. Une région polybasique adjacente au motif CAAX, semble impliquée dans cet adressage membranaire^{464,465,481}, toutefois, elle pourrait également être impliquée dans l'adressage nucléaire des PRLs en absence de prénylation sur le motif CAAX⁴⁸². En effet, la mutation de cette région pour des alanines non chargées entraîne une localisation uniquement cytosolique des PRLs et non plus nucléaire.

Le motif de prénylation est également critique pour l'activité biologique des PRLs. Ceci a été démontré la première fois par une mutation de la cystéine du motif CAAX de PRL-1 et 3 dans des cellules d'adénocarcinome du colon SW480 entraînant des mutants non prénylés incapables de favoriser la migration et l'invasion de ces cellules. D'autres études ont par la suite confirmé ces observations pour PRL-1 et 3 dans d'autres types cellulaires^{414,424,481}. Enfin, ceci a également été démontré pour PRL-2 dans des cellules cancéreuses des poumons (A549) dans lesquelles la surexpression d'un mutant délété au niveau C-terminal entraîne un défaut de migration et d'invasion cellulaire⁴⁸⁶.

III.2.3 Deux caractéristiques uniques au sein de la boucle P

III.2.3.1 Une boucle P très hydrophobe

La présence de la cystéine catalytique et du résidu aspartique au niveau de la boucle P, est la signature principale de toutes les PTPs, y compris les PRLs (Cys_{104/101} et Arg_{110/107} respectivement pour PRL-1,-3 et PRL-2). La séquence située entre ces deux acides aminés, qui aide à la reconnaissance des substrats, est extrêmement conservée entre les PRLs, mais n'est partagée avec aucune autre DSPs ou PTPs classique^{487,488}. Cette séquence, Val-Ala-Gly-Leu-Gly apporte un caractère très hydrophobe unique à la poche catalytique des PRLs. Ceci pourrait sous-entendre une préférence par les PRLs, pour des substrats hydrophobes.

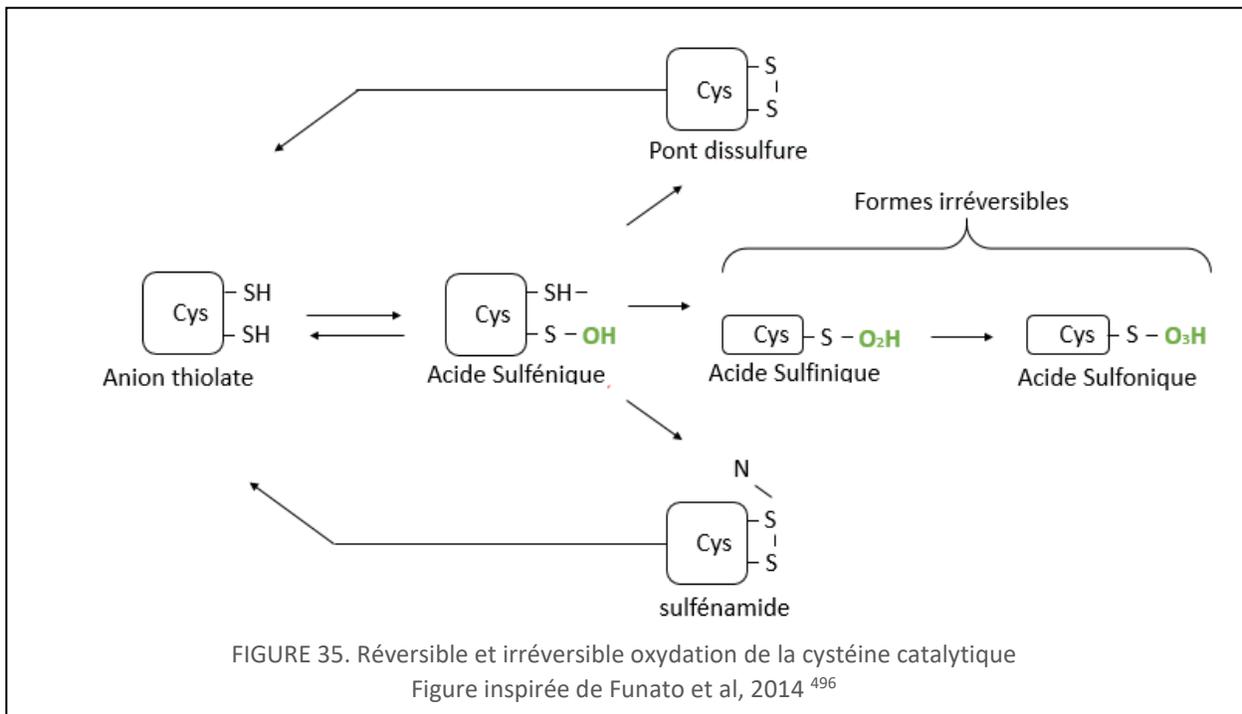
III.2.3.2 Séquence C-terminal de la boucle P contenant une alanine inhabituelle

Une autre caractéristique structurale qui différencie les PRLs de pratiquement toutes les autres PTPs classiques et DSPs, à l'exception de CDC25⁴⁶⁴ est l'absence de groupement hydroxyle porté normalement par un acide aminé sérine ou thréonine au niveau de la séquence C-terminal de la boucle P. Ce groupement hydroxyle facilite normalement la dégradation de l'intermédiaire phosphoenzyme dans la catalyse gouvernée par des PTPs^{406,407}. Au niveau des PRLs, ce groupement est remplacé par une alanine selon la séquence Ala-Pro-Val⁴⁶⁴ (souligné en rouge sur la figure 34). Ce résidu Proline est commun aux trois PRLs et fournit probablement une restriction conformationnelle unique des PRLs.

III.2.4 Une cystéine catalytique très sensible à l'oxydation

L'environnement du site actif des phosphatases confère un pKa anormalement bas à la cystéine catalytique, elle se trouve ainsi sous forme d'anion thiolate (Cys-S). Cette forme est essentielle à l'initiation efficace de l'attaque nucléophile sur le groupement phosphate du substrat par la cystéine. Cependant, cette valeur faible de pKa rend cette cystéine très sensible à l'oxydation⁴⁸⁹. La cystéine oxydée ne peut plus fonctionner comme un nucléophile, ainsi, l'activité enzymatique des phosphatases s'en trouve généralement diminuée⁴⁹⁰. Les anions thiolates de la cystéine peuvent être facilement oxydés en acides sulféniques (Cys-SOH), même dans des conditions d'oxydation modérée⁴⁹¹. Les groupements Cys-SOH, sont cependant très réactifs et donc, très sensibles à une oxydation rapide et irréversible en sulfure oxydé (Cys-SO₂) et sulfonique (Cys-SO₃)⁴⁹¹⁻⁴⁹⁴ (figure 35). Des études biochimiques et cristallographiques indiquent que les PTPs ont développé une variété de mécanismes pour stabiliser leur cystéine catalytique sous forme oxydée de manière réversible et ainsi, les protéger d'une oxydation irréversible très dommageable⁴⁸⁹⁻⁴⁹¹. Un moyen de défense est de stabiliser soit le groupement Cys-SOH, soit directement la cystéine, interne à la structure protéique.

Ainsi, l'oxydation de la cystéine catalytique des PTPs LMW, cdc25 ou PTEN, entraîne la formation d'un pont disulfure réversible, ce qui la protège d'une oxydation terminale^{495,496}. Sur d'autres PTPs tel que PTP1B, l'oxydation va entraîner la formation réversible d'un intermédiaire sulfénamide⁴⁹¹.



La structure tridimensionnelle de PRL-3 et PRL-1 a permis de montrer la présence d'une cystéine (en orange sur la figure 34) qui se retrouve très proche spatialement de la cystéine catalytique (Cys_{101/104})⁴⁶⁴. Cette cystéine est conservée entre les trois PRLs (Cys_{49/46}

respectivement pour PRL-1,-3 et PRL-2). PRL-1 a été cristallisée avec la cystéine catalytique 104 à la fois sous forme réduite et oxydée, où elle forme un pont disulfure avec la Cys₄₉⁴⁶⁴⁻⁴⁶⁶. Des études complémentaires ont confirmé *in vivo* et *in vitro* que l'oxydation de la cystéine 104 de PRL-1 conduit à la formation d'un pont disulfure avec la cystéine conservée Cys₄₉, et que ce mécanisme peut être contrecarré par des agents réducteurs^{414,497}. Le cristal de PRL-2 a permis de montrer que la Cys₁₀₁ de PRL-2 peut également être oxydée en formant un pont disulfure avec la Cys₄₆ avoisinante⁴⁹⁸. Différentes études montrent que le statut redox du site catalytique et la formation des ponts disulfures intra-moléculaire pourraient, en plus de protéger la cystéine catalytique, permettre de réguler l'activité des PRLs^{414,497,499}.

La plupart du temps les PTPase isolées *in vitro* sont sous leur forme active, mais afin d'éviter d'isoler une forme oxydée une précaution supplémentaire est généralement d'ajouter des fortes concentrations d'agents réducteurs. Ce qui est très curieux pour PRL-1, c'est que malgré ces agents réducteurs, une forme oxydée a été isolée suggérant que PRL-1 pourrait être plus sujette à l'oxydation que les autres PTPase⁴¹⁴. En fait les PRLs en général requièrent un très haut niveau d'agent réducteur pour maintenir leur cystéine catalytique sous forme anion thiolate⁴⁹⁸.

III.2.1 Motif WPFDD des PRL

Les PRLs arborent une boucle WPD distincte de celles des PTPs classiques. Ceci est relativement fréquent dans la famille DSPs. Les PRLs ont ainsi un motif WFPDD plutôt que WPD⁵⁰⁰. Le rôle des acides aminés supplémentaires de cette boucle reste encore à définir. Des mutations au niveau des deux résidus acide aspartique (D) de la boucle WPFDD ont permis de montrer que le deuxième était catalytiquement actif pour PRL-1 et PRL-3^{464,482}. Une mutation de cet acide aspartique pour une alanine (D92A) dans la boucle WPD de PRL-3 entraîne un mutant structurellement stable qui ne déphosphoryle plus le substrat non naturel 3-O-méthylfluorescein phosphate (OMFP)⁵⁰¹.

III.2.2 Une capacité d'oligomérisation pour PRL-1 et -3

Une autre caractéristique structurelle, révélée par la structure de PRL-1 est sa capacité à former des trimères⁴⁶⁴⁻⁴⁶⁶. L'équipe de Jeong et al a montré que l'oligomérisation de PRL-1 est un processus dépendant de la prénylation et qu'elle semble impliquée dans sa localisation membranaire⁴⁶⁶. Un autre équipe a montré que le mutant tronqué pour la séquence CAAX C-terminal de PRL-1 présente un taux d'oligomérisation très faible⁴⁸¹. La trimérisation de PRL-1 ne module pas son activité catalytique envers des substrats non naturels (pNPP)⁴⁸¹. Par contre, les mutants (Gly97Arg et Thr-13) qui affichent une faible tendance à l'association oligomérique ont été utilisés pour montrer le rôle probable de cette trimérisation de PRL-1 dans la migration et la prolifération cellulaire⁴⁸¹. D'autre part, les structures de RMN de PRL-3 montrent une protéine monomérique^{464,502}, mais il a également été montré oligomérisé dans les cellules^{481,503}. La farnéylation de PRL-3 pourrait aussi contribuer à son oligomérisation⁵⁰³, mais, cette oligomérisation de PRL-3 *in vitro* inhiberait son activité catalytique envers des substrats non

naturels⁵⁰³. La plupart des résidus permettant la trimérisation de PRL-1 sont conservés dans PRL-2, ainsi il serait possible que PRL-2 soit également sujet à une trimérisation, cependant PRL-2 n'a pas été observée à ce jour sous forme de trimère⁴⁹⁸.

III.3. Les PRLs, des phosphatases peu conventionnelles

III.3.1.1 Pas de substrat biologique direct clairement identifié à ce jour

Comme les autres DSPs, le site actif de PRL-1 et 3 est très peu profond et présente la cystéine catalytique à la base de la poche catalytique. Ceci permet la reconnaissance et la fixation à la fois des résidus tyrosine, mais également sérine et thréonine^{409,465,466,502}. Cependant, la poche catalytique des PRLs est encore plus large et peu profonde que les autres DSPs. De ce fait, on s'attendait à une spécificité élargie et donc à découvrir une grande variété de substrats pour PRLs⁴⁶⁷. Or, aucun substrat biologique n'a pour le moment été clairement identifié pour aucune des trois PRLs. Quelques substrats ont été toutefois proposés notamment pour PRL-3. Pour ce dernier, les protéines cibles potentielles qui ont été reportées sont pour la plupart reliées à la membrane plasmique (ezrin^{504,505}, integrine $\beta 1$ ^{506,507} ou paxiline⁵⁰⁸) ou le cytosquelette (la keratine 8⁵⁰⁹). Il semblerait également que PRL-3 ait la capacité de déphosphoryler le PI(4,5)2P dans un essai de chromatographie sur couche mince *in vitro*⁵⁰¹. Par contre, la déphosphorylation directe a été démontrée uniquement pour PI(4,5)2P et ezrin, les autres ont été déterminées indirectement car leur niveau de phosphorylation est abaissé lorsque PRL-3 est délétée *in vivo*. Des études indépendantes dans d'autres lignées cellulaires n'ont pas permis de confirmer l'influence de la surexpression de PRL-3 sur la phosphorylation de l'ezrin ou de paxilline⁵¹⁰.

Tout cela illustre qu'à l'heure actuelle les substrats proposés dans la littérature pour être directement déphosphorylés par les PRLs nécessitent des études complémentaires pour être suffisamment robustes.

Par contre, il existe des partenaires se liant aux PRLs qui sont maintenant bien connus. Par exemple, Hardy et al. ont montré pour la première fois en 2014 la formation d'un hétérodimère fonctionnel entre PRL-2 et le transporteur de magnésium CNNM3⁴⁷⁰. Ils ont également montré qu'une déplétion de magnésium *in vitro* entraînait une augmentation de la formation du complexe et que le niveau de magnésium du sérum des souris KO PRL-2 était plus élevé que celui des souris Wt. L'implication de ce complexe dans la promotion tumorale *in vivo* et *in vitro* a ensuite été reportée^{511,512}. Par la suite, des études complémentaires ont permis de montrer que les membres de la famille CNNM pouvaient également se lier à PRL-1 et 3^{513,514}.

Cette découverte est extrêmement intéressante car le magnésium est un cofacteur essentiel pour des centaines d'enzymes dans le corps humain. Ces études sont les premières qui ouvrent la voie de la compréhension du rôle de ces enzymes dans des conditions physiologiques. Elles pourraient expliquer la sévérité du phénotype associé à la délétion de ces protéines chez les souris.

III.3.1.2 Une capacité catalytique très limitée *in vitro*

Comme mentionné dans le paragraphe I.2, l'étape de catalyse s'effectue en deux étapes, une première où il y a attaque nucléophile de la cystéine catalytique sur le phosphate du substrat. Le résidu d'acide aspartique conservé dans la boucle WPD agit comme un donneur de proton. Puis vient une seconde étape où le phosphate du complexe phosphocystéine est transféré à une molécule d'eau aidé de nouveau par l'acide aspartique de la boucle WPD. Ceci permet la restauration de la cystéine catalytique sous sa forme réduite. Ainsi, l'enzyme se retrouve dans son état d'origine et est disponible pour un nouveau cycle de catalyse (Cf fig)

Une méthode largement répandue afin de déterminer l'activité enzymatique des PTPs *in vitro* est de mesurer la déphosphorylation du substrat synthétique chromogène, le p-Nitrophenyl Phosphate (pNPP)⁵¹⁵. Un autre substrat non naturel et plus réactif est utilisé également pour mesurer cette activité, en particulier pour les DSPs, le 3-O-méthylfluorescein phosphate (OMFP)⁵¹⁶. Ces études de cinétique enzymatique ont permis d'appréhender cette réaction de catalyse pour les PRLs. Il se trouve qu'une extrêmement faible activité catalytique a été reportée pour les 3 membres des PRLs^{481,498}. La réaction de catalyse en général est très lente en comparaison à d'autres PTPs, et c'est l'étape de restauration de l'enzyme qui est limitante pour les PRLs. Pour les autres PTPs la réaction de catalyse est rapide et c'est la liaison au substrat qui est généralement limitante⁴⁰⁷.

La valeur de la constante catalytique pour PRL-3 est si faible qu'elle n'a pas pu être mesurée avec le substrat pNPP⁵⁰³ tandis qu'elle est d'environ 10^{-4} s^{-1} pour OMFP ce qui est grandement inférieure aux valeurs retrouvées pour les PTPs. Pour comparaison, la PTPs cdc25 a une valeur de constante catalytique déterminée avec ce même substrat de 1.2 s^{-1} ⁵¹⁷.

Certaines différences structurelles des PRLs par rapport aux autres PTPs que nous avons décrites dans la partie III.2 peuvent expliquer cette très faible vitesse de catalyse.

Tout d'abord, la présence du résidu alanine à la place du résidu portant un groupement hydroxyle (ser ou Thr) au niveau de la boucle P. En effet, nous savons grâce à des études structurelles et cinétiques que ce résidu est nécessaire à l'étape de régénération de l'enzyme. Cependant, même si une mutation de cette alanine pour une serine (A111S) au niveau de PRL-1 et PRL-3 augmente sa capacité de dissociation avec le complexe intermédiaire^{464,481,501}, cette étape reste malgré tout très lente supposant que cette alanine n'est pas seule à expliquer la lenteur de cette étape ($k_{\text{cat}} \text{ PRL-3}_{\text{wt}} = 2.5 \times 10^{-4}$ vs $k_{\text{cat}} \text{ PRL-3}_{(\text{A111S})} = 7.1 \times 10^{-3}$)⁴⁶⁴. D'autre part, une autre étude a montré que la délétion du motif de prénylation CAAX de PRL-3 entraînait une augmentation légère de son activité catalytique ($k_{\text{cat}} \text{ PRL-3}_{\text{wt}} = 2.3 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ vs $k_{\text{cat}} \text{ PRL-3}_{(\Delta\text{C4})} = 2.7 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$)⁵⁰³. Ceci suggère un probable effet inhibiteur de ce motif de prénylation sur la réaction enzymatique contrôlée par PRL-3. Il a été montré également que la formation de pont disulfure intramoléculaire ne peut expliquer cette faible vitesse enzymatique. En effet, lorsque cette formation de pont disulfure est empêchée par mutation de la Cys49 (C49A) l'activité catalytique de PRL-3 n'est pas affectée⁴⁶⁴.

III.4. Propriété oncogénique des PRLs

Une activité aberrante de phosphorylation a été reportée dans la pathogenèse de nombreuses pathologies humaines incluant le cancer. Les PTPs jouant un rôle important dans l'inhibition ou le contrôle de la croissance étaient pressenties comme suppresseur de tumeur. Ceci est en effet vrai pour une grande partie des PTPs, cependant de nombreuses études ont permis de montrer que certaines d'entre elles exercent des fonctions pro-tumorales⁴¹⁰. Parmi la vingtaine de PTPs reportées comme oncogéniques on retrouve les trois membres de la famille PRLs.

En effet, une régulation positive des PRLs a été observée dans de nombreux types de tumeurs de stade avancé ainsi que dans des lésions métastatiques. La surexpression des PRLs est fréquemment retrouvée dans de nombreuses lignées cellulaires tumorales, et les cellules exprimant des niveaux élevés de PRL présentent une prolifération, une migration et une invasion augmentée^{459,461,518-520}.

Ce sont les travaux du groupe de Vogelstein en 2001 qui ont pour la première fois établi un lien entre une PRL, PRL-3 et des métastases hépatique de cancer colorectal⁵²¹. Dans cette étude pionnière, ils ont trouvé que parmi les 144 gènes régulés à la hausse, seulement PRL-3 était constitutivement surexprimée dans des échantillons de foie colorectal métastatique. Ils ont également montré que le niveau d'expression de PRL-3 dans les tumeurs primaires du cancer colorectal était beaucoup plus faible que dans les lésions métastatiques hépatiques correspondantes suggérant que PRL-3 pourrait jouer un rôle important dans les métastases⁵²¹. De plus, dans le cancer colorectal, la surexpression de PRL-3 est retrouvée au niveau des métastases du foie, mais également des poumons, du cerveau, des ovaires, du péritoine et des ganglions lymphatiques⁵²¹⁻⁵²³. Cette surexpression de PRL-3 a ensuite été retrouvée dans beaucoup d'autres types de cancer comme par exemple celui de l'estomac⁵²⁴⁻⁵²⁷, des ovaires^{528,529}, du sein^{530,531}, de la vessie⁵³², des poumons⁵³³, les gliomes⁵³⁴, les mélanomes^{535,536}, ou de l'oesophage⁵³⁷. PRL-3 a également été retrouvée surexprimée dans les tumeurs malignes hématologiques, comprenant par exemple la leucémie myéloïde aigue⁵³⁸, ou des myélomes multiples⁵³⁹. Ces études ont montré que la surexpression de PRL-3 est fréquemment associée à l'acquisition d'un potentiel métastatique^{395,540}. Cette surexpression est très largement associée à un taux de survie faible, en faisant un facteur de mauvais pronostic pour de nombreux types de cancer⁵⁴¹.

PRL-1 est exprimé à des niveaux élevés dans les métastases ganglionnaires des adénocarcinomes⁵⁴². Son expression est également élevée dans les cancers du colon⁵⁴², du pancréas⁴⁶⁹ et de l'oesophage⁵⁴³. Des études *in vitro* sur diverses cellules cancéreuses, ont permis de montrer que PRL-1 confère une motilité cellulaire et des propriétés invasives accrues qui peuvent être inversées lorsque l'expression de PRL-1 est diminuée^{544,545}.

Une expression différente de PRL-2 entre tumeur primaire et métastatique a quant à elle été montrée dans l'adénocarcinome du colon⁵⁴² et de le cancer de la prostate^{469,519}. Les propriétés oncogéniques de PRL-2 dans le cancer du sein ont été ensuite démontrées par Hardy et al. Leurs travaux ont permis de montrer que le niveau d'ARNm de PRL-2 est d'une part,

significativement élevé dans les tumeurs du sein primaires par rapport au tissu environnant, et est également augmentée dans les ganglions lymphatiques métastatiques par rapport aux tumeurs primaires⁵⁴⁶. Cette étude a été complétée *in vivo* par l'intermédiaire de trois types de souris transgéniques, l'une exprimant une version oncogénique de ErbB2, l'une co-exprimant ErbB2 et PRL-2(wt), et la dernière co-exprimant ErbB2 et PRL-2(C101S). Ils ont montré que la co-expression ErbB2/PRL2(wt) conduisait plus rapidement à la formation de tumeur du sein en comparaison aux souris contrôle et délétées pour le domaine catalytique de PRL-2⁵⁴⁶, prouvant ainsi l'implication de PRL-2 dans la progression tumorale. PRL-2 est également fortement exprimée dans les hémopathies malignes, par exemple, dans la leucémie myéloïde aiguë (LMA), la leucémie myéloïde chronique (LMC) ou le myélome multiple (MM)⁵⁴⁷⁻⁵⁴⁹. De plus, il a été reporté une surexpression de PRL-2 dans les tumeurs pancréatiques⁴⁶⁹ et du poumon⁴⁸⁶.

Une étude d'hybridation *in situ* réalisée par l'équipe de Dumauval et al. a montré que l'ARNm de PRL-2 est également fortement augmentée dans les carcinomes hépatocellulaires (cancer primitif du foie)⁵⁵⁰. Curieusement, les auteurs ont également montré que l'ARNm de PRL-1 et -2 était le plus souvent détecté à des niveaux plus élevés que la protéine correspondante. Cela pourrait indiquer un contrôle post-transcriptionnel de ces molécules. Il faut savoir qu'une répression traductionnelle par la protéine liant PolyC-RNA 1 (PCBP1) a été proposée par une équipe pour PRL-3⁵⁵¹.

IV. IMPLICATION DES DIFFÉRENTES PRLs DANS DES VOIES DE SIGNALISATION ET CONSÉQUENCES BIOLOGIQUES CONNUES À CE JOUR

Bien que les fonctions biologiques exactes de ces trois phosphatases restent floues, mécaniquement les PRLs ont été liées à plusieurs voies de signalisation impliquées dans l'invasion et la motilité cellulaire. Dans différentes études PRL-3 a par exemple été identifiée comme activateur de la voie de la famille Rho GTPases⁴⁶⁸, la voie MAPK/ERK⁵⁵², la voie de signalisation du récepteur du facteur de croissance épidermique EGFR⁵⁵³, la voie mTORC⁵⁵⁴, et la voie PI3K / AKT⁵¹⁰ et de la tyrosine protéine kinase Src⁵¹⁸. Nous allons présenter l'implication connue des PRLs dans ces différentes voies, mais il faut savoir que PRL-2 et PRL-1 ont largement moins été étudiées que PRL-3. D'autre part, depuis la découverte du potentiel oncogénique de PRL-3, la plupart des études sur les PRLs se placent dans un contexte tumoral, et certaines études présentées ici n'ont pas été confirmées par d'autres équipes indépendantes.

IV.1. PRLs et migration cellulaire / invasion

IV.1.1 PRL-1 et -3 et transition épithélium-mésenchyme (EMT)

Plusieurs études ont démontré le rôle promoteur de PRL-3 dans la transition épithélio mésenchymateuse^{508,555}. La transition épithélio mésenchymateuse, ou EMT entraîne la perte des propriétés épithéliales, comme par exemple, l'adhésion cellule-cellule et la polarité baso-apicale, associée au gain des propriétés mésenchymateuses, ce qui facilite la motilité cellulaire et l'invasion. C'est un processus retrouvé dans divers contextes physiologiques, mais il a

également été montré que ce phénomène est moteur de la progression tumorale. En effet, c'est par le processus d'EMT que les cellules tumorales d'origine épithéliale (carcinome) deviennent invasives, étape essentielle à la formation des métastases⁵⁵⁶.

L'induction de l'EMT par PRL-3 semble être effectuée par régulation négative de la phosphatase et de l'homologue de la tensine (PTEN)⁵⁰⁸ ou de la famille des cadhérines^{555,557}.

Une étude publiée dans le journal *cancer research* a permis de montrer que l'expression stable de PRL-3 catalytiquement active dans des lignées de cancer colorectal (DLD-1) présente un niveau d'expression de PTEN plus faible que lorsque son domaine est inactif (mutation C/S)⁵⁰⁸. Une autre équipe a observé cela également dans des cellules de cancer gastrique⁵⁵⁸. PTEN étant un régulateur négatif de la voie de signalisation intracellulaire PI3K / AKT il n'est pas étonnant que le taux de phosphorylation d'AKT soit également affecté par cette expression stable de PRL-3 ou de son mutant C/S. La voie PI3K/AKT est centrale dans la promotion tumorale et l'induction de la transition épithélio-mésenchymateuse⁵⁵⁹.

La diminution de l'expression du marqueur épithélial E-cadhérine est caractéristique de l'EMT, et la perte de cette protéine est corrélée avec la progression tumorale et les métastases dans divers cancers humains. Il a été montré que la surexpression de PRL-1 dans des cellules de cancer pulmonaire et hépatocellulaire est associée à la diminution de l'expression de E-Cadherine^{545,560}. Cette diminution est également retrouvée lorsque PRL-3 est exprimée de manière stable dans des cellules du cancer colorectal⁵⁰⁸. L'expression de PRL-3 est également associée à l'augmentation du marqueur mésenchymateux, snail⁵⁰⁸.

IV.1.2 PRL-1, -2, -3 et motilité cellulaire

Les trois membres de la famille PRL ont été associés à la motilité et l'invasion cellulaire *in vivo* et *in vitro*^{414,424,461,481,486,546}. Toutefois les mécanismes sous-jacents ne semblent pas être les mêmes pour les trois phosphatases.

IV.1.2.1 PRLs et plaques d'adhérence focale

Les plaques d'adhérence focale sont des zones riches en complexe protéique dynamique permettant la connexion entre le cytosquelette d'une cellule et la matrice extracellulaire. La motilité cellulaire est dépendante de la formation et la déstabilisation de ces plaques d'adhérence. La protéine centrale de ces plaques d'adhérence est la kinase des adhésions focale (FAK) qui, à l'aide de connexions moléculaires diverses peut influencer la stabilité des sites d'adhésion cellulaire, le cytosquelette, et la formation de protrusions membranaires nécessaires à la motilité cellulaire⁵⁶¹. Le recrutement de Src au niveau des plaques d'adhérence⁵⁶², permet la formation d'un complexe de signalisation FAK-Src qui facilite la phosphorylation de diverses protéines associées à FAK comme par exemple la protéine adaptatrice p130^{CAS} et paxilline. La kinase c-Src est sur-activée dans un très grand nombre de cancers et de métastases^{563,564}. FAK régule également les facteurs d'échange guanine (GEF) et les protéines activant la GTPase (GAP) qui agissent sur les Rho-GTPases. Ceci conduit au renouvellement de la plaque d'adhésion focale et à la motilité cellulaire⁵⁶⁵.

Il a été montré que PRL-3 est impliquée dans la migration et l'invasion cellulaire par déstabilisation des plaques d'adhérence. La formation d'adhérence focale dans les cellules exprimant PRL-3 est défectueuse. En effet, ces cellules contiennent significativement moins d'adhérence focale que les contrôles^{468,508}. D'autre part, la diminution de l'expression de PRL-1 entraîne une phosphorylation anormalement maintenue de FAK lorsque les cellules sont stimulées par de la fibronectine⁵⁶⁶. Ceci suggère également une anomalie au niveau des plaques d'adhésion focale qui peut s'expliquer par déstabilisation et désassemblage de celles-ci, ou par un turnover défectueux⁵⁶⁶.

Une équipe a montré *in vitro* sur des cellules non tumorales (HEK293), que la kinase Src semble être activée par PRL-3, mais de manière indirecte. Selon cette équipe, PRL-3 inhibe la traduction de la protéine Csk (*C-terminal-Src Kinase*). Cette protéine est une kinase qui inactive le domaine catalytique de Src par phosphorylation de sa tyrosine 527^{518,567}. De la même manière que PRL-3, PRL-1 semble impliquée dans la voie de signalisation intégrine/src. Toutefois, le mécanisme de régulation semble être différent de celui décrit pour PRL-3. Deux groupes ont en effet montré que PRL-1 favorise, respectivement l'autophosphorylation de Src⁵⁴⁴ ou son niveau d'expression dans des cellules tumorales⁵⁶⁶. Enfin une étude très récente a montré dans des fibroblastes humains que PRL-1 interagit avec SRC et inhibe son activation basale⁵⁶⁸. Par contre, aucune modification du niveau d'expression, ou de la phosphorylation de Src n'a été décrite dans des cellules tumorales par modulation de l'expression de PRL-2^{486,568}.

D'autre part, l'activation indirecte de Src par PRL-3 entraînerait la phosphorylation et l'activation du facteur de transcription STAT3 et p130^{CAS} ainsi que ERK1/2⁵¹⁸. De la même manière, la modulation de l'expression de PRL-1 entraîne des répercussions sur le niveau de phosphorylation de p130^{CAS} dans des cellules non tumorales (HeLa)⁵⁶⁹.

Le niveau d'expression de PRL-3 et PRL-1 influence également l'activité des protéines de la famille Rho (RhoA, RhoC). Ces protéines ainsi que Rac et Cdc42 régulent la polymérisation de l'actine l'assemblage des fibres de stress, la formation des plaques d'adhérence focale ainsi que les structures cellulaires mobiles telles que les lamellipodes et les filopodes, ce qui permet la mobilité cellulaire^{485,508}. Toutefois cette modulation de l'activité de la famille Rho GTPase semble dépendante du type cellulaire. Ainsi l'équipe de James Fiordalisi a montré dans les cellules du cancer colorectal SW480 que PRL-3 et PRL-1 induisent une augmentation de l'activité de RhoA et RhoC. Tandis que l'inverse a été reporté par l'équipe de Wang pour PRL-3 dans les cellules colorectales DLD1 et les cellules non tumorales CHO.

IV.1.2.2 PRL-1 -3 et production/activation de MMP

Les MMPs sont des protéines secrétées qui dégradent la matrice extracellulaire, et ainsi facilite la motilité cellulaire. Ceci est essentiel aux cellules tumorales pour la formation des métastases. Une modulation positive de l'activité des MMP dépendantes de PRL-3 a été observée dans plusieurs types de cancers, y compris les cellules du cancer du sein⁵⁷⁰, du colon^{552,554,571}, du foie⁵⁷², et les gliomes⁵³⁴. Toutefois, cet effet semble être spécifique au type de cellule et dépendant du contexte. En effet, tandis que l'invasion des cellules du cancer

colorectal LOVO est dépendante de la voie de signalisation integrin β 1, de la phosphorylation de ERK1/2 et de la production de MMP2⁵⁵², c'est MMP9, et non MMP2, dans les cellules du cancer du sein⁵⁷⁰. Dans le carcinome hépatique il a été reporté une corrélation positive entre PRL-3 et MMP1, MMP2, MMP9 et MMP10^{572,573}. D'autre part, il a été reporté dans une lignée cellulaire issue du cancer du colon (HCT116), une augmentation de MMP2 lorsque PRL-3 est surexprimée. Cette augmentation semble dépendante de la voie mTOR puisque l'inhibition de cette voie par traitement des cellules à la rapamycine inhibe cette production de MMP2 ainsi que la motilité cellulaire⁵⁵⁴.

PRL-1 a aussi été reportée comme impliquée dans la modulation des MMPs. Sa surexpression dans des cellules HEK293 entraîne en effet une augmentation de l'expression et de l'activité de MMP2 et MMP9⁵⁴⁴. De la même manière, un niveau élevé de PRL-1 dans des cellules tumorales corrèle avec une augmentation de l'activité de ces deux MMPs⁵⁴⁴.

IV.2. PRL-1,-2,-3 et cycle cellulaire

Une étude de 2008 par l'équipe de Basak et al. a permis de démontrer que le facteur de transcription oncogénique p53 facilite de manière directe la transcription du gène de PRL-3⁵⁷⁴. Cette étude ainsi que d'autres en contexte tumoral positionne PRL-3 comme régulateur du cycle cellulaire⁵⁷⁴. En condition non tumorale, les auteurs ont observé un arrêt du cycle cellulaire en phase G1 après surexpression de PRL-3. Ils ont montré que cet arrêt s'effectue par boucle de régulation rétro-négative impliquant la voie PI3K/AKT. Curieusement cet arrêt du cycle cellulaire en phase G1 a également été démontré par ces mêmes auteurs lorsque PRL-3 était diminué. Ceci suggère une implication dose dépendante de PRL-3 dans la promotion du cycle cellulaire.

PRL-1 et PRL-2 sont également impliquées dans la régulation du cycle cellulaire en favorisant le passage en phase S⁵⁷⁵.

V. PRL-3 ET SYSTÈME VASCULAIRE

V.1. Expression de PRL-3 lors de la morphogenèse vasculaire

L'expression de PRL3 est détectable dès les tous premiers stades du développement au niveau du tissu cardiaque ainsi que des petits vaisseaux en formation chez l'humain et le rat^{478,576}. Cependant cette expression n'est pas maintenue dans leur forme mature, ceci suggère un rôle potentiel de PRL-3 dans le développement du système cardiovasculaire.

V.2. Importance de PRL-3 dans les cellules tumorales pour l'induction d'une angiogenèse pathologique

Comme nous avons vu dans la partie III.5.2.3, il a été décrit que PRL-3 contribue à l'invasion tumorale et que son expression est corrélée positivement à celle des métalloprotéinases matricielles (MMP-2, MMP-9). Or, des études ont montré qu'à la fois MMP-2^{577,578} et MMP-9⁵⁷⁹ jouent un rôle actif dans l'angiogenèse tumorale. Leur absence réduisant en effet la dégradation de la matrice extracellulaire, et donc le recrutement des cellules endothéliales par les cellules tumorales est diminué. Le processus angiogénique ainsi que la progression tumorale est ainsi diminué.

D'autre part, le traitement des cellules tumorales A549 par un anticorps bloquant de PRL-3 entraîne une diminution de l'expression de VEGF⁵⁸⁰.

De plus, l'équipe de Qi Zeng a montré que les cellules tumorales surexprimant PRL-3 ont la capacité de recruter les cellules endothéliales *in vivo*. Pour ce faire, ils ont effectué des injections intra-veineuse (veine de la queue de souris) de cellules tumorales colorectal sur-exprimant PRL-3 dans des souris immunodéficientes et ont analysé la vascularisation environnant les métastases au poumon⁵⁸¹. Les auteurs ont également démontré cette capacité *in vitro* dans des expériences de co-cultures avec des cellules endothéliales humaines (HUVEC). De plus, le domaine catalytique de PRL-3 est essentiel à la réponse angiogénique des cellules endothéliales. En effet, ils ont observé que la surexpression de PRL-3 dans les cellules tumorales, mais pas son mutant C/S, induit la réorganisation des cellules endothéliales en tubes vasculaires *in vitro*⁵⁷⁶.

Une étude supplémentaire par l'équipe de John S. Lazon a montré également l'implication de PRL-3 dans la formation de micro-vaisseaux tumoraux. Ils ont utilisé l'Azoxymethane (AOM) en combinaison avec du dextran sodium sulfate (DSS) des agents carcinogènes pour entraîner le développement de tumeurs colorectales dans des souris délétées pour PRL-3.

Ces études soulignent l'implication probable de PRL-3 exprimée par les cellules tumorales dans l'angiogenèse pathologique requise pour la progression tumorale ainsi que pour la colonisation métastatique.

V.3. Expression de PRL-3 dans le réseau vasculaire tumoral humain

L'étude spécifique de la vascularisation tumorale a ajouté des informations au sujet de l'implication de PRL-3 dans l'angiogenèse. En effet, PRL-3 a été trouvé dans les cellules endothéliales en plus des cellules malignes, ce qui suggère que PRL-3 peut jouer un rôle fonctionnel dans le compartiment endothélial des tumeurs, comme la promotion de l'angiogenèse^{540,582-585}.

L'équipe de Parker et al. a réalisé une analyse d'expression génique (SAGE *Serial Analysis of Gene Expression*⁵⁸⁶) de cellules endothéliales immunopurifiées à partir de tissus provenant de cancers du sein et de tissus normaux issus de mamoplasties. Cette méthode leur

a permis d'identifier PTP4A3 parmi les gènes principalement enrichis dans le système vasculaire du cancer du sein invasif^{584,585}.

PLR-3 a été montrée par hybridation *in situ*, exprimée au niveau du système vasculaire des tissus métastatiques dérivés du cancer colorectal (foie, poumons, cerveau, ovaires). Cette expression n'a pas été retrouvée dans le système vasculaire des tumeurs primaires ni des tissus normaux⁵⁴⁰. Enfin, son ARNm a été retrouvé plus fortement exprimé au niveau des cellules endothéliales isolées de tissus provenant de tumeur du colon par rapport à celles isolées de tissus non tumoraux^{582,584,587}.

Une autre équipe a également montré cette localisation de PRL-3 au niveau du réseau vasculaire tumoral⁵³¹, par co-marquages sur des échantillons de patients atteints de cancer du sein invasif.

Une corrélation positive entre PRL-3 et l'expression des facteurs pro-angiogéniques, VEGF et ET_AR a été décrite dans des échantillons de cancer du sein^{531,588}. Cette association entre PRL-3 et l'expression de VEGF, a également été décrite par analyse d'immunohistochimie dans des échantillons de tumeur de cancer du poumon non à petites cellules⁵⁸⁰. De plus cette dernière étude ainsi que celle de Zhao et al a établi une corrélation positive entre la densité microvasculaire et l'expression de PRL-3 dans le cancer du poumon non à petites cellules⁵⁸⁰, et le carcinome hépatocellulaire⁵⁷³.

En condition non tumorale l'expression de PRL-3 dans des cellules endothéliales humaines est relativement faible. Toutefois, une exposition de ces cellules à un promoteur tumoral, le PMA (phorbol ester phorbol 12-myristate 13-acetate) entraîne une augmentation consécutive de l'expression de PRL-3⁵⁸³.

V.4. Première piste illustrant un rôle potentiel de PRL-3 dans l'angiogenèse physiologique

Une première étude a montré l'implication de PRL-3 exprimée par les cellules endothéliales dans le processus d'angiogenèse. Pour cela, les auteurs ont utilisé trois stratégies différentes⁴⁷⁸.

Dans un premier temps, ils ont effectué une analyse *ex vivo* de l'invasion des cellules endothéliales. Pour ce faire, ils ont inclus des échantillons de muscle squelettique dans une matrice de collagène contenant un milieu de croissance endothélial microvasculaire. Ceci leur a permis d'étudier l'invasion des cellules, majoritairement endothéliales, dans cette matrice. Ils ont observé une diminution de l'invasion en l'absence de PRL-3.

Les auteurs ont également effectué un test de perméabilité vasculaire induite sur les souris délétées pour PRL-3. Cette méthode est basée sur l'injection intraveineuse de bleu Evans dans des souris. Le bleu Evans est un colorant qui se lie à l'albumine, une protéine présente dans le plasma. Dans des conditions physiologiques l'endothélium est imperméable à l'albumine, ainsi, le bleu Evans reste limité aux vaisseaux sanguins. Cependant, il est possible d'étudier la perméabilité induite par le VEGF en l'injectant localement dans les souris. Ceci entraîne dans les souris contrôles une augmentation de la perméabilité vasculaire, et donc de la

quantité de colorant par milligramme de tissu. Les auteurs ont montré qu'en absence de PRL-3 la perméabilité vasculaire induite par le VEGF est plus faible que dans les souris contrôles.

Enfin, les auteurs ont isolé des cellules endothéliales à partir de ces souris délétées pour PRL-3 et ont complété ces analyses par des stimulations au VEGF *in vitro*. Ils ont montré que cette stimulation entraînait une augmentation de la phosphorylation de ERK identique à celle des cellules endothéliales contrôles. Par contre, ils ont observé un niveau de phosphorylation de la protéine SRC, FAK et paxilline qui n'est pas augmenté par stimulation au VEGF contrairement aux cellules contrôles. Pour finir, ils ont analysé le niveau de phosphorylation des différentes tyrosines de VEGFR-2, et ont trouvé un niveau plus faible de phosphorylation des sites Y951 et Y1054 en absence de PRL-3. Ils n'ont pas trouvé d'autres différences pour les autres sites de phosphorylation de VEGFR-2⁴⁷⁸.

Cette étude est la première et la seule à l'heure actuelle qui illustre une potentielle fonction de PRL-3 dans des cellules endothéliales de souris comme régulateur positif de VEGFR-2 par modulation des sites de phosphorylation Y951 et Y1054.

In vitro la modulation de l'expression de PRL-3 dans des cellules endothéliales humaines a des conséquences sur la formation des tubes endothéliaux^{583,589}. En effet, alors que sa surexpression accroît le nombre de tubes endothéliaux, son inhibition les diminue. Toujours dans des cellules endothéliales humaines, une étude a montré que VEGF pouvait promouvoir l'expression de PRL-3 via le facteur de transcription «*myocyte enhancer factor2* » MEF2C⁵⁸⁹. MEF2C est impliqué dans la régulation des gènes nécessaires au processus de bourgeonnement lors de l'angiogenèse⁵⁹⁰.

CHAPITRE I,

PRL-2, un nouveau composant de l'angiogenèse et de la différenciation artérioveineuse

Ce chapitre a fait l'objet d'un article finalisé et actuellement en cours de soumission comme l'atteste la première partie de chapitre

I. Objectifs de l'étude

Comme présenté en introduction, les phosphatases PRLs représentent une famille dont l'implication dans le développement vasculaire est encore très peu connue. Certaines études émergent sur un potentiel rôle de PRL-3 dans ce phénomène, mais rien n'est encore connu pour PRL-2. Mon principal travail de thèse s'est articulé autour de l'étude des mécanismes d'action de PRL-2, ainsi que de son rôle dans l'angiogenèse physiologique. Ainsi, l'objectif de ce chapitre a été de définir et de comprendre l'implication de PRL-2 dans la régulation du développement vasculaire.

II. Article I: «New Insights into PRL-2 function in angiogenesis and arteriovenous differentiation »

New Insights into PRL-2 function in angiogenesis and arteriovenous differentiation

**M.Poulet^{1,2,3}, J.Sirois³, K.Boyé^{1,2}, S.Hardy³, T. Daubon^{1,2}, N. Uetani³, M.L.Tremblay^{3*},
A.Bikfalvi^{1,2*}**

¹INSERM U1029, Pessac, France ; ²Université de Bordeaux, Pessac, France ; ³McGill Goodman cancer center, Quebec, Canada.

Correspondance to*:

A. Bikfalvi / M.L. Tremblay

Angiogenesis and Cancer Microenvironment Laboratory INSER U1029 / Goodman cancer center

INSERM U1029, University Bordeaux / McGill University

Allée Geoffroy St Hilaire, 33615 Pessac, France / 1160 Pine Avenue West
Montreal, Quebec H3A 1A3

Phone: AB (33) 5 40 00 87 03 / MT (1) (514) 398-7290

Fax: (33) 5 40 00 87 05 / MT (1) (514) 398-6769

E-mail: andreas.bikfalvi@u-bordeaux.fr / michel.tremblay@mcgill.ca

Running title: PRL-2 as a new regulator of VEGFR-2

Keywords: PRL-2, VEGFR-2, Angiogenesis, NOTCH

ABSTRACT

The PRLs phosphatases family exhibits unique properties but its role in different organ systems is not fully understood. We focused on the role of PRL-2 in developmental angiogenesis and its mechanism of action. We demonstrated that *PRL-2* knockout mice exhibit strong vascular phenotype. PRL-2 acts specifically on VEGFR-2-Y1175 activation and promote signaling. Furthermore, PRL-2 plays also an important role in regulating the DLL4/Notch pathway by generating cleaved-notch1 and transcriptionally regulating HEY2 and HES1. A defect in this pathway in *PRL-2* knockout mice has also an impact on arteriovenous differentiation. Our study defines PRL-2 as a new regulator of vascular development by controlling endothelial cell migration and invasion and VEGF-A and Notch signaling. PRL-2 may also be implicated in proper arteriovenous differentiation during developmental angiogenesis.

INTRODUCTION

Angiogenesis, the formation of new blood vessels from pre-existing ones, is involved in different physiological and pathological processes such as cancer, stroke, Alzheimer disease or ischemia¹⁻⁷. Pro- or anti-angiogenic factor has been widely studied during the past decades. Among them, the Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF-A) is one of the most powerful pro-angiogenic factors. VEGF-A is the most abundant and biologically active member of the VEGF family. Indeed, the loss of a single allele of the *Vegfa* gene in mice is sufficient to cause an embryonic lethality at E8.5 due to a total absence of vascularization^{8,9}. Deletion of *VEGFR-2* gene, the main receptor of VEGF in endothelial cells, also induces embryonic lethality at the same stage with a similar phenotype^{10,11}. VEGFR-2 is a transmembrane receptor presenting tyrosine kinase activity upon activation and dimerization, which will lead to specific signaling pathways. In human, the main phosphorylation sites are on Y801 residues in the juxta-membrane domain, Y951 and Y996 in the kinase domain, Y1054 and Y1059 in the auto-activation loop, and Y1175 and Y1214 in carboxy-terminal domain^{12,13}. These phosphorylated sites allow the interaction between VEGFR-2 and its partners, and thus leads to various signaling pathways. Among them, we can distinguish the PI3K-AKT-mTOR pathway, involved in cell survival and migration and the PLC γ -ERK1/2 pathway, crucial for vascular and arteries development, both induced by Y1175 phosphorylation¹³.

It is known that tyrosine phosphorylation levels are not only governed by protein tyrosine kinase activation, but by a balanced action with protein tyrosine phosphatases¹⁴ (PTPs). Members of the PTP family have been found to play a role in a plethora of cellular and physiological functions, such as in the regulation of transcription, cell proliferation and

migration, embryogenesis, neural plasticity, immunity and many more¹⁵⁻²⁴. Aberrant positive or negative phosphatase activities have similarly been implicated in the pathogenesis of many diseases ranging from cancer to metabolic diseases and immune deficiencies²⁵⁻³⁴. Therefore, these enzymes may represent promising targets for the treatment of a broad range of disease. Although the role of tyrosine kinases receptor, such as VEGFR-2 in angiogenesis is well studied, little is known about the function the PTPs in these processes. Only few PTP repressing angiogenesis have been identified so far. Among these, some act by direct dephosphorylation of the key receptor VEGFR-2, while others directly modulate its signaling.

The PRL phosphatases (Phosphatase of Regenerative Liver) are composed of three members, PRL-1, PRL-2, and PRL-3, and have been classified as a unique subgroup of VH1-like PTPs with dual-specificity³⁵⁻³⁷. PRL family exhibits unique properties and no substrate has been clearly demonstrated yet. Indeed, at the opposite of all PTP reported to act on VEGFR-2 phosphorylation, PRL-3 downregulation in mice endothelial cells leads to a decrease in VEGFR-2 Y951 and Y1054 phosphorylation³⁸. However, the mechanism generating this phenomenon is not understood up to date. More recently, our group discovered that PRL-2 modulates intracellular magnesium levels by forming a complex with the CNNM magnesium transporter^{39,40}. Among many physiological processes, magnesium plays a critical role in cardiovascular system by modulating endothelial cell function and angiogenesis.

We investigated the biological relevance and *in vivo* function of PRL-2 in vascular development, and herein provide new insights into the mechanism of action. Using *PRL-2* knock-out mice, we clearly demonstrate a defect of vascular development in the retina of newborn mice. Silencing of PRL-2 in endothelial cells *in vitro* leads to an inhibition of VEGFR-2 Y1175 phosphorylation, as

well as an inhibition of VEGFR-2 signaling. More strikingly, *PRL-2* knockdown dramatically affect *in vivo* arteriovenous differentiation by a downregulation of the cleaved-Notch1/Hey2 axis. Thus, PRL-2 seems to have a major role in vascular development by acting through different mechanisms.

RESULTS

Expression of PRL-2 in mice retina model

We investigated *PRL-2* gene expression in the mouse retina model during post-natal development from P5 to P21 (Fig. 1A) by quantitative RT-PCR to distinguish *PRL-1* from *PRL-2*. We showed an increase in mRNA copy number of *PRL-2* during *in vivo* retina development which points to a possible role of this phosphatase in vascular development. Interestingly, despite the strong homology between *PRL-1* and *PRL-2* (more than 80%), *PRL-1* expression remains almost unchanged from P5 to P21, indicating that *PRL-2*, but not *PRL-1*, is likely to be implicated in vascular development. Transcriptomic analysis on a published array⁴¹ of retinal endothelial cells demonstrated that all 3 PRLs are expressed in endothelial cells in new born P5 mice, with a 4-fold higher expression of *PRL-1* and *PRL-2* compared to *PRL-3* (Fig. S1A). Taken together, these results are in favor of a role of PRL-2 in vascular development.

First evidence of a vascular function of PRL-2

We generated previously⁴⁰ a full-body *PRL-2* knock-out mice and we examined retinal vascular development on them. Protein extraction from mice retina lysate and western blot analysis of wild-type, heterozygote and knock-out showed silencing of *PRL-2* in the knockout mice (Fig. 1B). Analysis of retinal vascular development at P6 new-born mice revealed strong defects in angiogenesis. Indeed, we demonstrated a delay in the formation of retinal vascularization, with a decrease in vascular coverage of about 40% (quantify by the angiogenic area divided by total retina area) (Fig 1C). *PRL-2* knockout mice are known to exhibit lower body weight compared to WT mice. Since body weight influences retina vascularization, we performed the same

analysis but only in mice of the same body weight, which confirmed the defect in retinal vascular coverage in *PRL-2* deficient mice (Fig. S1B). We further confirmed the vascular coverage phenotype at P9 *PRL-2* knockout mice (Fig. S1C). Furthermore, higher magnification images of the retinal vascularization clearly showed a significant increase in vessel density, a hallmark of inadequate and uncontrolled angiogenesis (Fig. 1D). We then investigated the effect on vascular density by quantifying the number of branching point, and this showed an increase in *PRL-2* knock-out mice, by more than 20%. This phenomenon occurs especially in areas surrounding veins (Fig. 1E).

Role of PRL-2 in cell migration and sprouting angiogenesis

We examined *PRL-2* expression in several endothelial cell lines isolated from veins (HUVEC), from arteries (HUAEC), from brain vessel (hCMED/D3) as well as microvascular endothelial cells (HMVEC) (Fig. 2A). *PRL-2* is expressed in the different cell lines, confirming its strong and ubiquitous expression in endothelial cells. We further investigated HUVEC cells, a key of an *in vitro* and non-immortalized model to study angiogenesis. Downregulation for *PRL-2* mRNA expression of about 90% was achieved by *PRL-2* siRNA without affecting neither *PRL-1* nor *PRL-3* (Fig. 2B). We then looked at *PRL-2* protein expression and showed an almost complete shutdown of the protein expression (Fig. 2B). Because we observed a delay of vascular coverage in *PRL-2* knockout mice (Fig. 1), we performed *in vitro* wound-healing experiments using the scratch assay on HUVEC cell monolayers which demonstrated a delay of about 40% in wound closure at 16 hours after *PRL-2* knock-down (Fig. 2C). This effect is dependent on the stimulation of VEGFR-2 by VEGF-A (50ng/ml). Furthermore, the effect is maintained with a

higher VEGF-A concentrations (100ng/ml). We next investigated the role of PRL-2 on sprouting angiogenesis (Fig. 2C). Beads were coated with HUVECs, embedded in a 3D fibrinogen gel and stimulated with VEGF-A (100ng/ml). After 96 hours, sprouting was analyzed in *PRL-2* knock-down or control HUVECs (Fig. 2D). Striking differences between PRL knock-down and control cells were observed. *PRL-2* knock-down cells exhibited inadequate and inefficient sprouting angiogenesis. Indeed, as indicated in the quantification in Fig. 2D, the protrusion lengths were reduced by 40% in *PRL-2* knock-down cells. It is worth noting that it is consistent and nicely correlated with the 40% wound-healing closure delay presenting in Fig. 2B. Consistently with the decrease in length, the number of cells per protrusion was also decreased in *PRL-2* knock-down cells (Fig. 2D). In contrast, the total number of protrusions per beads was significantly increased in *PRL-2* siRNA cells. Thus, the decrease in protrusion length and increase in number is compatible with the changes observed in the retina of *PRL-2* knock-out mice (Fig. 1C, D and E).

Downstream signaling pathways affected by PRL-2 downregulation: Implication of VEGFR-2

The *in vitro* phenotypic modifications of *PRL-2* knock-down cells (Fig. 2) were seen after VEGF-A stimulation, which indicates a potential misregulation of the VEGF-A/VEGFRs pathway. Thus, we investigated the status of the different phosphorylation sites of VEGFR-2 (Fig. 3A) after VEGF-A stimulation in HUVECs with control siRNA and with siRNA targeting *PRL-2*. Whereas 5 minutes of VEGF-A stimulation led to a strong induction in VEGFR-2 transient Y1175 phosphorylation in CTRL siRNA treated cells, we saw a strong decrease in *PRL-2* knock-down cells (Fig. 3B). VEGFR-2-Y1175 is known to promote endothelial cell migration and proliferation. This result highlight

the fact that PRL-2 does not act like classical phosphatases but induces a more important and sustained activation of VEGFR-2-Y1175 (Fig. 3B). Consistent with the decrease in VEGFR-2-Y1175 phosphorylation, ERK phosphorylation was reduced of around 50% after 5 minutes VEGF-A stimulation (Fig. 3C). Interestingly, AKT, another downstream signaling pathway activated by VEGFR-2-Y1175, was not affected after PRL-2 downregulation (Fig. 3D). Taken together, our data demonstrate that PRL-2 act by promoting VEGFR-2-Y1175 phosphorylation, specifically acting on the downstream ERK signaling pathway.

PRL-2 is a specific regulator of VEGFR-2-Y1175

PRL-2 action is restricted to VEGFR-2-Y1175 as we saw no defect on other tyrosine phosphorylation such as VEGFR-2-Y1214, which is also implicated in cell migration (Fig. 4A). Furthermore, another VEGFR-2 phosphorylation site, Y951, known to act on vascular permeability was not modified after PRL-2 downregulation (Fig. 4B). Thus, PRL-2 acts specifically on VEGFR-2-Y1175 activation, and promotes signaling involved in cell migration. We next investigated if the action of PRL-2 was specific for VEGFR-2, or more general for tyrosine kinase receptors such as fibroblast growth factor receptors. Fibroblast Growth Factor Receptor-1 (FGFR-1) is another endothelial cell receptor regulating by tyrosine phosphorylation and activated by FGF-2. FGFR-1 activation after 5 minutes of FGF-2 stimulation was assessed by western blot and ERK signaling used as activation readout (Fig. 4C). No difference was found after FGF-2 stimulation after PRL-2 downregulation when compared to control cells (Fig. 4C). We further investigated the functional impact of *PRL-2* knock-down on endothelial cell migration induced by FGF-2, No significant difference in cell migration in PRL-2 siRNA or CTRL

siRNA treated cells was observed (Fig. 4D). Thus, PRL-2 activity seems to be restricted to the regulation of the VEGFR pathway.

PRL-2 controls arteriovenous differentiation through modulation of Notch pathways

We next analyzed tip to stalk cell communications by studying the DLL4/Notch-1 signaling pathway. It is known that VEGFR-2 activation in endothelial tip cells induces DLL4 expression, which in turn activates Notch-1 in stalk cells. This activation is mediated by sequential cleavage which release the active notch intracellular domain inside the cell. Furthermore, mice carrying a single allele mutation (DLL4^{+/-}) exhibit an increase in vascular branch-point and density, which share similarity with *PRL-2* knockout mice^{42,43}. We demonstrated in HUVEC cells a 50% decrease of DLL4 expression when PRL-2 is downregulated, which is in agreement with the decrease of VEGFR-2 activation in PRL-2 siRNA cells (Fig. 5A). We therefore examined the presence of cleaved-notch by assessing the expression of the Notch intracellular domains (NICD) (Fig. 5B). When PRL-2 is downregulated after VEGF-A stimulation, an almost complete shutdown of NICD is observed (Fig. 5B). Once cleaved, Notch-1 will activate transcription factors belonging to the HEY family. Interestingly, we demonstrated that upon DLL4 stimulation, *HEY2* mRNA expression was decreased in PRL-2 siRNA treated cells (Fig. 5C). Thus, in addition to the regulation of VEGFR pathway through VEGFR-2-Y1175, PRL-2 also seems to be directly implicated in the regulation of the DLL4/Notch axis. It is worth noting that *HES1*, another downstream target of cleaved-Notch, was also affected by PRL-2 downregulation (Fig. S2A). Furthermore, we confirmed that PRL-2 is an upstream regulator of Notch activation by showing that Notch siRNA did not have an effect on PRL-2 expression (Fig. S2B). Interestingly, HEY2 and HES1 have been

shown to act on arteriovenous differentiation. Thus, we characterized in *PRL-2* knockout mice the effect of PRL-2 on the number of the retina main arteries and veins (Fig. 5D). We observed that the number of both, arteries and veins was reduced in *PRL-2* knockout mice (Fig. 5D and F). This was confirmed by co-staining with Isolectin-B4 and α -SMA antibodies, since α -SMA is a specific marker of smooth muscle cells, which are mainly present around arterial vessel (Fig. 5E and F). Finally, we assessed arteriovenous differentiation in P21 adult mice after vessel stabilization (Fig. 6A and 6B). We observed that the arteriovenous differentiation defect was maintained in *PRL-2* knockout mice (Fig. 6A and 6B). Taken together, these results implicate PRL-2 in arteriovenous differentiation and maintenance.

DISCUSSION

With 107 members, the PTPs is one of the most diverse family in the human genome, and are associated with numerous cellular and physiological functions, such as transcription regulation, cell proliferation and migration, embryogenesis, neural plasticity, immunity and other. PTP have been shown to play a role in vascular development⁴⁴. One key PTP acting on angiogenesis is VE-PTP, which act at several levels in order to maintain vascular integrity. Indeed, VE-PTP allows the maintenance of VE-cadherin in a dephosphorylated state, resulting in stabilization of the mature vessel and a decrease in vascular permeability, but also acts directly on VEGFR-2 phosphorylation⁴⁵⁻⁴⁷. The decrease in VE-PTP in endothelial cells results in an increase in signaling in response to VEGF⁴⁵, with a persistence of VEGFR-2-Y951 and Y1175 phosphorylation. DEP-1, another well-known PTP, interacts directly with VEGFR-2 and dephosphorylate it specifically on residues Y1054 and Y1059, two last tyrosine essential to VEGFR-2 auto-phosphorylation.

PRLs phosphatases are atypical phosphatases and there is only one study that focuses on the role of PRL-3 in physiologic vascular development³⁸. Even though the authors find that PRL-3 act as positive regulator on VEGFR-2 phosphorylation, they find that phosphorylation on Y951 site is predominantly affected by PRL-3 knockdown. This suggests that PRL2 and -3 could act by different mechanism.

No direct substrate has ever been clearly identified up to date for any of the PRL family members and they exact function and mechanisms remains to be address. We and others have reported that PRLs can associate with CNNM3, a molecule thought to be involved in magnesium transport³⁹.

In the present study, we focused on PRL-2, a less studied member of the PRL family and elucidated its role in vascular development. We showed that PRL-2 was the only one PRL family member associated with an increased expression in mice retina throughout vascular development, indicating the potential implication of this phosphatase in developmental angiogenesis. To gain insights into the functional role of PRL-2, a unique *PRL-2* knockout mouse was developed in our group. We found that PRL-2 was essential to maintain proper vascular development *in vivo* in the mouse retina model, as we clearly demonstrated a decrease of the retina vascular coverage associated with an increase of vascular density. We further investigate the mechanisms affected by PRL-2 knockdown and we showed a decreased of VEGFR-2 signaling leading to an inhibition of endothelial cell migration. This indicates that PRL-2 acts by reinforcing VEGFR-2 signaling in endothelial cells. More specifically, PRL-2 knockdown led to a decrease of VEGFR-2-Y1175 phosphorylation and impairment of VEGF signaling. Based on this result, PRL-2 seems to have a different and opposite mechanisms of action compared to classical phosphatase by reinforcing the signaling of angiogenic growth factor receptors. Indeed, other vascular phosphatases such as VE-PTP or Dep1 dephosphorylate VEGFR-2 and then decrease its signaling, and mutation of these phosphatases is usually embryonic lethal.

The mechanism which leads to enhancement of PRL-2-dependent VEGFR-2 phosphorylation remains to be addressed. One could speculate that PRL-2 form a complex with VEGFR-2, and this protects the phosphorylation site to be dephosphorylated by other phosphatases. Another possibility would be an indirect action of PRL-2 on VEGFR-2 phosphorylation status. Indeed,

PRL-2 could act through a downregulation of other PTPs or more generally interfere with magnesium metabolism which is important for receptor activation.

The PRL family displays several specific features, not shared by other PTP, which could explain the difference in their activity. Indeed, a unique feature that differentiates PRLs from all other PTPs is the presence of a CAAX prenylation domain in its carboxy-terminal domain^{37,48}. Through this motif, PRL protein can be post-translationally modified by addition of a farnesyl-isoprenoid lipids or geranyl-geranyl lipids, via a thioether bonds to the cysteine^{49,50}. This phenomenon is known to increase the hydrophobicity of proteins, thus facilitating their localization to the plasma membrane. Furthermore, PRL family displays a specific catalytic amino acid sequences compared to other PTP. The presence of a catalytic cysteine and aspartic residue is the main signature of all PTPs and is also represented in the PRL family, but the sequence between them is highly different. This sequence is known to trigger substrate recognition^{51,52}, and is highly conserved in PRL-2 family, but not shared with any other conventional PTPs. The functional implications of these properties are not well understood yet but may impact on substrate recognition in the developmental vasculature.

Another important finding of this study is the implication of PRL-2 in arteriovenous differentiation through the downstream effectors of Notch. It has been shown that VEGFR-2 activation in tip cells triggers the stimulation of the Notch pathways in stalk cells through DLL4 upregulation. This has been called 'Tip to Stalk' communication^{43,53-58}. When PRL-2 is silenced in endothelial cells, we showed that, upon VEGF-A stimulation, DLL4 is downregulated as well as a specific and Notch cleavage impaired. Cleavage occurs at the amino acid Valine 1744 and is triggered by the γ -secretase complex. The defect in cleavage and formation of NCID through

PRL-2 downregulation leads to an inhibition of HEY2 and HES1, two transcription factors implicated in arteriovenous differentiation. Interestingly, HEY2 knockout mice displays vascular growth delays and cardiac malformations associated with lethality around the first 10 days⁵⁹⁻⁶². In zebrafish, HEY2 (*grl*) knockout further phenocopies our data since it results in abnormalities in aortic maturation and loss of arterial markers⁶³. Thus, the defect in arteriovenous differentiation and maintenance in *PRL-2* knockout mice is likely to be due to defect in Hey2 transcription factor through downregulation of the pathways DLL4/Notch. PRL-2 may act directly on the cleavage of Notch, by regulating the γ -secretase activity and then the subsequent release of NCID.

Taken together, we provide in this article a number of evidences for a regulatory role of PRL-2 in vascular development. PRL-2 seems to act on VEGR2 phosphorylation and signaling, as well as on the DLL4/Notch pathway. Fig. 7 summarizes our working model and our principal findings. This constitutes the first description of a regulatory role of PRL-2 in angiogenesis, and arteriovenous differentiation. Furthermore, it opens new insight of a new function of PTPs, by maintaining/reinforcing tyrosine kinase receptor activity instead of negatively regulate it. Thus, our finding may not only enrich our knowledge on PRL biology, but also suggest new insights into the regulation PTPs of vascular development.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture and cell stimulation

Human umbilical artery endothelial cells (HUAEC) were cultured in ECGM-2 (Lonza). Blood-Brain Barrier hCMEC/D3 and Human Dermal Microvascular Endothelial Cells (HMVEC-D) were cultured in ECGM-2-MV (Lonza). Human umbilical veins endothelial cells (HUVEC) were obtained from promocell and cultured in endothelial cell growth medium (ECGM, promocell a culture medium that does not contain VEGF). HUVECs on this study were never used for more than 5 passages and maintained in collagen coated plate. To determine the effect of VEGF-A or FGF-2 on protein phosphorylation, we starved HUVECs overnight in ECBM supplemented with 0.1%FBS and stimulated them with VEGF-A (25ng/ml, R&D Systems) or FGF-2 for indicated time. For Dll4 stimulation, we pre-coated plates with 10ug/ml sDll4 (R&D Systems) before plating cells and we harvested the cells after 24h.

Small interfering RNA knockdown experiments

For inhibition of PRL-2 and Notch-1 expression, cells were transiently transfected with annealed siRNA. A pool of four siRNA were used for PRL-2 (SMART Pool, M-009078-01-0005, GE Healthcare Europe GmbH, Dharmacon) and Notch-1 (SMART Pool, L-007771-00-0005, GE Healthcare Europe GmbH, Dharmacon). A pool of four four siRNAs designed to target no known genes in human were used as a negative control (SMART Pool, Non-Targeting siRNA#1, GE Healthcare Europe GmbH, Dharmacon). Transfection was performed using lipofectamine RNAimax kit (Thermofisher scientific 13778075) in accordance with the manufacturer's

instructions, with siRNA at a final concentration of 10 nM in Opti-MEM I (ThermoFisher scientific 31985070). Cells were used for experiment 48h after transfection.

Fibrin gel angiogenesis assays

24h after siRNA transfection, HUVECs were coated onto Cytodex 3 microcarrier beads at a concentration of 400 cells/beads for 4hour. The day after, HUVEC-coated beads were resuspended in 2.5 mg/ml fibrinogen (Sigma) in basal media (promocell) supplemented with 0.15unit/ml aprotinin (Sigma-Aldrich). Gel was formed by adding the fibrinogen/bead solution to each well containing Thrombin (Sigma-Aldrich) at the concentration of 10U/ml. The gel of fibrin was clotted for 20 min at 37 °C. Once gels clotted, complete endothelial cell media supplemented with VEGF (R&D Systems) was added on each well. NIH/3T3 fibroblasts were then plated on top of each well (10 000cells/well). Cultures were incubated at 37 °C, 5% CO₂. After 4 days, cultures were labeled with DAPI and imaged by fluorescence using a standard FITC filter. More than thirty beads per condition were quantified.

Scratch wound healing assay

We seed cells into 6 well plate and transfect them. 24 h after siRNA transfection we starved cells overnight with ECBM supplemented with 0.5%FBS. We scratched the monolayer with a 200- μ l pipette tip across the center of the well. We took pictures of scratch wounds (time 0) and incubated cells at 37 °C in EBM-2 supplemented with 0.5%FBS and VEGF-A or FGF-2. After 18h we took pictures again and calculate the extent of cell migration using ImageJ software. 3 independant experiment with at least 5 replicat per condition were analysed.

RNA isolation, reverse transcription, and quantitative real-time PCR

We isolated total RNA from cells and snap frozen retina using Trizol reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instruction. 1µg of total RNA was retrotranscribed into cDNA using the SuperScript III Reverse Transcriptase Kit (Life Technologies) according to the manufacturer's instructions, and qRT-PCR was performed on a LightCycler 480 with SYBR Green Master Mix according to the manufacturer's instructions. β -Actin, and ribosomal protein L13A (mRPL13A) were used, respectively as controls for experiment using HUVECs or retina mouse lysates. The list of primer used on this study is list on table 1. Each experiment has internal control and we did three independent experiments.

Table 1. List of primers used in RT-PCR studies.

Gene	Sequence (5' - 3')
Human	
HES1	For 5'-TCAACACGACACCGGATAAA-3' Rev 5'-TCAGCTGGCTCAGACTTTCA-3'
HEY2	For 5'-GAACAATTACTCGGGGCAAA-3' Rev 5'-TCAAAAGCAGTTGGCACAAG-3'
DII4	For 5'-GACCACTTCGGCCACTATGT-3' Rev 5'-CAGCCCGAAAGACAGATAGG-3'
PRL-1	For 5'-AGCTCCAGTACTTGTGGCCC-3' Rev 5'-CCACGCCGCTTTTGTCTTATG-3'
PRL-2	For 5'-GGAATCCACGTTCTAGATTGGC-3' Rev 5'-AACACAGCAACCTGGCTCTT-3'
PRL-3	For 5'-AGCACCTTCATTGAGGACCTG-3' Rev 5'-CAGCGGCGTTTTGTCATAGG-3'
Act β	For 5'-CTCTTCCAGCCTTCCTCCT-3' Rev 5'-AGCACTGTGTTGGCGTACAG-3'
Mouse	
PRL-1	For 5'-GCCACAATCTTCAATGAGTAGACATATTCC-3' Rev 5'-CTTGTCTGCATAGAGGTCGTGCTG-3'
PRL-2	For 5'-CCAATGCGACTCTCAACAAGTTCAC-3' Rev 5'-CAACACAACAGCCTGGCTCTTCAC-3'
PRL-3	For 5'-AAGGACGGCATCACTGTTGT-3' Rev 5'-GCTTCCCGGGTCATTGTAGA-3'
RPL13A	For 5'-CCCTCCACCCTATGACAAGA-3' Rev 5'-TTCTCCTCCAGAGTGGCTGT-3'

Western blots.

We dissected retinas and frozen them immediately in liquid nitrogen. Next, retinas were lysed and homogenized with RIPA buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS) supplemented with proteinase inhibitors (Roche Diagnostics, cOmplete). For experiments with HUVECs, we lysed the cells in RIPA buffer (50mM Tris pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.5% deoxycholic acid, 0.1% sodium dodecyl sulfate SDS, 1% Triton X-100, 50 mM sodium fluoride, 2 mM sodium pyrophosphate, 1 mM sodium orthovanadate, and 1× protease inhibitor cocktail (Calbiochem)).

After centrifugation at 16,000 g for 10 minutes at 4°C, cell lysates were resuspended in Laemmli Buffer (62.5 mM Tris pH6.8, 10% glycerol, 2.5% SDS, 2.5% β-mercapto-ethanol) and boiled for 5 minutes. 12µg of protein cell lysate were resolved by SDS–PAGE and transferred. Proteins were electroblotted onto a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (Immobilon-P, Millipore)). Membranes were incubated with 5% dry milk dilute PBS, 0.1% Tween for 1h and probed overnight at 4°C with primary antibodies diluted in blocking buffer (1 µg/ml). The following proteins were detected using antibodies from Cell Signaling Technologies (CST), p44/42 MAPK (p-ERK, cat# 9106), anti-p44/42 MAPK (total ERK, cat# 9102), anti-pAKT(Ser)473 (cat# 4060), anti-AKT (cat# 4691), Cleaved Notch1 (Val1744, cat# 4147), Notch 1 (D6F11,cat#4380), phospho-specific and total VEGFR-2 (total VEGFR-2, cat# #2479 and Tyr1175 cat# #2478, Tyr1214 Tyr951 cat# #2471), Calnexin (cat# 2433). Rabbit polyclonal anti-β-actin antibodies (cat# A2066), and Mouse monoclonal anti-PRL-2 (05-1583) were obtained respectively from Sigma-Aldrich, and EMD Millipore. Intensity of the signal was quantified by ImageJ.

Mice

Prl-2 KO mice used in this study were described previously⁴⁰. They were generated using the *PRL-2* gene-trapped ES cells in which trapping vector was inserted between exon 1 and exon 2 of the *PRL-2* gene (*Ptp4a2*) (strain AQ0673, 129P2/OlaHsd, Sanger Institute Gene Trap Resource). Germline-transmitted *PRL-2* heterozygous mice were backcrossed to C57BL/6N (Harlan Laboratories) for more than 7 generations. Heterozygous breeding pairs were used to ensure that littermate wild-type and heterozygous controls were used. The phenotypes of mutant mice were analyzed postnatal, between P3 and P21. All animal procedures were performed according to the Canadian Council on Animal Care ethical regulations and were approved by the McGill University Research and Ethics Animal committee.

Immunostaining

Retinas were collected at P6, P9, or P21 for whole-mount immunostaining as previously described⁶⁴. Briefly, after dissection, retinas were fixed for 15 min in 4% paraformaldehyde (PFA), and wash 3 times in PBS 1X. Retinas were incubated overnight at 4 °C in primary antibodies diluted in Pblec (1 mM PBS, 1 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 0.1 mM MnCl₂, 1% Triton X-100). Retinas were then incubated 30min at room temperature with Cy3 streptavidin diluted in Pblec. Retinas were washed 3 times, post fix 5 minutes on PFA 4%, and mounted on slide. Retinas were viewed by fluorescence microscopy, and images were captured in digital format using a Zeiss microscope.

Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 5 software. Multiple comparisons were performed with one-way analysis of variance, followed by Bonferonni post-tests. Statistical comparison between two groups was performed by using the two way ANOVA Mann-Whitney test.

Branch point quantification and vasculature analysis.

Branch point numbers and vascular coverage were quantified with ImageJ. Vascular density and vascular progression analysis were quantified with ImageJ. To measure retinal vascular density, we quantified 8 fields by retina in capillary bed. We calculate for each field the surface area of IB4 staining and report it at the area of the field. To determine vascular coverage, we measured the area of the retina and the area of the developing vascular front and calculated the ratio between them.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: PRL-2 downregulation increases endothelial sprouting during retinal angiogenesis.

(A) PRL-1 and PRL-2 mRNA expression in mouse retina lysate at different developmental stage. Values were normalized to a reference gene, Ribosomal Protein L13a (RPL13a) (B) PRL-2 protein expression in mouse retina lysate. Calnexin was used as a loading control. (C) Mouse retina immunostaining of vessel using Isolectin-B4 in PRL-2 wild-type and knockout mice. Quantification of vascular coverage was performed (right panel). (D) Mouse retina vessel density was assess in wild-type and knockout PRL-2 mice, using Isolectin-B4 staining, and quantify in right panel. (E) Number of vascular branchpoint was globally quantified, or specifically in the veins close environment. A minimal number of 10 mice were used for each experiment. Furthermore, all the results from three or more independent experiments and were combined to calculate mean and SEM. Values were normalized to those obtained for the control. *** $P < 0.001$, * $P < 0.005$.

Figure 2: VEGF-induced migration and invasion is impaired without PRL-2 *in vitro*

(A) PRL-2 protein expression was evaluated in several endothelial cell lines (HUVEC, HUAEC, hCMEC/D3, HMVEC). β -actin was used as a loading control. (B) PRL-2 mRNA expressions (Left panel) was performed by real time quantitative PCR in HUVEC primary cell lines in siRNA control and cells with knockdown of PRL-2. Values were normalized to calnexin. PRL-2 protein expression (right panel) was assessed by western-blot in HUVECs with control siRNA and with siRNA targeting *PRL-2* (C) Migration assays in HUVEC stimulated by 0.5%FBS with VEGF-A (50ng/ml) were performed in HUVECs with control siRNA and with siRNA targeting *PRL-2* (D)

Sprouting assay using HUVEC coated on beads on a 3D environment was performed after CTRL siRNA or a siRNA against *PRL-2*. Cells were stimulated by VEGF-A (100ng/ml). Number of protrusion, number of cell per protrusion and length of protrusion were quantified below. ****P<0.001, *** P<0.001, ** P<0.002.

Figure 3: *PRL-2* downregulation leads to VEGFR-2 downstream signaling disruption *in vitro*

(A) Schematic representation of VEGFR-2 and its phosphorylation sites. (B) VEGFR-2 activation assessed by measuring the phosphorylation level of the tyrosine Y1175 after VEGF-A stimulation (25ng/ml) in HUVECs with control siRNA and with siRNA targeting *PRL-2* (C) ERK phosphorylation activation was measured by western-blot after VEGF-A stimulation (25ng/ml) in HUVECs with control siRNA and with siRNA targeting *PRL-2* (D) AKT phosphorylation activation was measured by western-blot after VEGF-A stimulation (25ng/ml) in HUVECs with control siRNA and with siRNA targeting *PRL-2*. All the results represent three independent experiments combined to calculate mean and SEM, and values were normalized to those obtained for the control cells. NS: Non-significant * P<0.005.

Figure 4: Specific action of *PRL-2* on VEGFR-2 Y1175 signaling

Specific VEGFR-2 activation was assessed by measuring other phosphorylation site after VEGF-stimulation (25ng/ml): (A) Y1214, and (B) Y951. (C) Impact of *PRL-2* downregulation of other tyrosine kinase receptor was investigated by looking ERK signaling pathways after FGF2 stimulation (FGFR1 receptor ligand). (D) Migration assays in HUVEC stimulated by 0.5%FBS with FGF2 (50ng/ml) were performed in HUVECs with control siRNA and with siRNA targeting *PRL-2*.

All the results represent three independent experiments combined to calculate mean and SEM, and values were normalized to those obtained for the control cells. NS: Non-significant.

Figure 5: PRL-2 regulates A/V differentiation through the promotion of Dll4/Notch pathway

(A) DLL4 mRNA expressions was performed by real time quantitative PCR in HUVEC primary cell lines after CTRL siRNA or a siRNA against *PRL-2*. (B) Activation of Notch1 was assessed by investigating NCID formation (cleaved-Notch) by western blot in HUVECs with control siRNA and with siRNA targeting *PRL-2*. (C) HEY2 mRNA expressions was performed by real time quantitative PCR in HUVEC primary cell lines after CTRL siRNA, siRNA against *PRL-2* or against *Notch1*. The experiment was performed under control condition or after a DLL4 coating. (D) Number of veins and arteries were visualized through Isolectin-B4 immunostainin on P6 new-born mice. (E) Co-immunostaining of Isolectin-B4 and the arterial marker α -SMA were performed in order to quantify the number of arteries and veins in PRL-2 wild-type or knockout P6 new-born mice. (F) Quantification of the veins or arteries in PRL-2 wild-type or knockout mice. A minimal number of 17 mice were used for each experiment. Furthermore, all the results from three or more independent experiments and were combined to calculate mean and SEM. Values were normalized to those obtained for the control. ** P<0.002, * P<0.005

Figure 6: PRL-2 regulation of A/V differentiation in maintains after vessel maturation and stabilisation

(A) Number of veins and arteries were visualized through Isolectin-B4 immunostainin on P21 adult mice, and quantify on right panel. (B) Co-immunostaining of Isolectin-B4 and the arterial

marker SMA were performed in order to quantify the number of arteries and veins in PRL-2 wild-type or knockout P21 adult mice. A minimal number of 5 mice were used for each experiment. ** P<0.002.

Figure 7: Working model of PRL-2 action on endothelial cells.

Molecular model describing the regulatory role of PRL-2 in VEGFR-2 and NOTCH function in endothelial cells.

Figure S1: PRL-2 expression and impact on endothelial cell at several developmental time point

(A) Transcriptomic analysis of PRL-1 -2 and -3 in retina endothelial cells from Del toro et al. 2010. (B) Retina vascular coverage of all P6 new-born mice (left panel), or mice which exhibits the same weight (right panel). (C) Vascular coverage of wild-type, heterozygote or knockout mice at a later developmental stage: P9. A minimal number of 7 mice were used for each experiment. Furthermore, all the results from three or more independent experiments and were combined to calculate mean and SEM. **** P<0.001, ** P<0.002, * P<0.005

Figure S2: PRL-2 regulates specifically HEY2 expression and is an upstream effector of Notch

(A) HES1 mRNA expressions was performed by real time quantitative PCR in HUVEC primary cell lines after CTRL Si-RNA, Si-RNA against PRL-2 or against Notch1. The experiment was performed under control condition or after a DLL4 coating. (B) Relative PRL-2 mRNA expression performed by real time quantitative PCR in HUVEC primary cell lines after CTRL Si-RNA or Si-RNA against

Notch1. all the results from three or more independent experiments and were combined to calculate mean and SEM. NS: Non-significant, *** $P < 0.001$, * $P < 0.005$

REFERENCES

- 1 Carmeliet, P. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* **438**, 932-936, doi:10.1038/nature04478 (2005).
- 2 Greenberg, D. A. Angiogenesis and stroke. *Drug News Perspect* **11**, 265-270 (1998).
- 3 Greenberg, D. A. & Jin, K. From angiogenesis to neuropathology. *Nature* **438**, 954-959, doi:10.1038/nature04481 (2005).
- 4 Ferrara, N. & Kerbel, R. S. Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature* **438**, 967-974, doi:10.1038/nature04483 (2005).
- 5 Folkman, J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* **285**, 1182-1186, doi:10.1056/NEJM197111182852108 (1971).
- 6 Del Bo, R. *et al.* Vascular endothelial growth factor gene variability is associated with increased risk for AD. *Ann Neurol* **57**, 373-380, doi:10.1002/ana.20390 (2005).
- 7 Krupinski, J., Kaluza, J., Kumar, P., Kumar, S. & Wang, J. M. Role of angiogenesis in patients with cerebral ischemic stroke. *Stroke* **25**, 1794-1798 (1994).
- 8 Carmeliet, P. P. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* **380**, 435-439 (1996).
- 9 Ferrara, N. N. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* **380**, 439-442 (1996).
- 10 Shalaby, F. F. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature* **376**, 62-66 (1995).
- 11 Ebos John, M. L. J. A naturally occurring soluble form of vascular endothelial growth factor receptor 2 detected in mouse and human plasma. *Molecular Cancer Research* **2**, 315-326.
- 12 Koch, S., Tugues, S., Li, X., Gualandi, L. & Claesson-Welsh, L. Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. *The Biochemical journal* **437**, 169-183, doi:10.1042/bj20110301 (2011).
- 13 Koch, S. & Claesson-Welsh, L. Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. *Cold Spring Harb Perspect Med* **2**, a006502, doi:10.1101/cshperspect.a006502 (2012).
- 14 Corti, F. & Simons, M. Modulation of VEGF receptor 2 signaling by protein phosphatases. *Pharmacol Res* **115**, 107-123, doi:10.1016/j.phrs.2016.11.022 (2017).
- 15 Angers-Loustau, A., Cote, J. F. & Tremblay, M. L. Roles of protein tyrosine phosphatases in cell migration and adhesion. *Biochem Cell Biol* **77**, 493-505 (1999).
- 16 Elchebly, M., Cheng, A. & Tremblay, M. L. Modulation of insulin signaling by protein tyrosine phosphatases. *J Mol Med (Berl)* **78**, 473-482 (2000).
- 17 Dube, N. & Tremblay, M. L. Involvement of the small protein tyrosine phosphatases TC-PTP and PTP1B in signal transduction and diseases: from diabetes, obesity to cell cycle, and cancer. *Biochim Biophys Acta* **1754**, 108-117, doi:10.1016/j.bbapap.2005.07.030 (2005).
- 18 Bourdeau, A., Dube, N. & Tremblay, M. L. Cytoplasmic protein tyrosine phosphatases, regulation and function: the roles of PTP1B and TC-PTP. *Curr Opin Cell Biol* **17**, 203-209, doi:10.1016/j.ceb.2005.02.001 (2005).

- 19 Uetani, N., Chagnon, M. J., Kennedy, T. E., Iwakura, Y. & Tremblay, M. L. Mammalian motoneuron axon targeting requires receptor protein tyrosine phosphatases sigma and delta. *J Neurosci* **26**, 5872-5880, doi:10.1523/JNEUROSCI.0386-06.2006 (2006).
- 20 Halle, M., Tremblay, M. L. & Meng, T. C. Protein tyrosine phosphatases: emerging regulators of apoptosis. *Cell Cycle* **6**, 2773-2781, doi:10.4161/cc.6.22.4926 (2007).
- 21 Trop, S., Tremblay, M. L. & Bourdeau, A. Modulation of bone marrow-derived endothelial progenitor cell activity by protein tyrosine phosphatases. *Trends Cardiovasc Med* **18**, 180-186, doi:10.1016/j.tcm.2008.07.001 (2008).
- 22 Heinonen, K. M., Bourdeau, A., Doody, K. M. & Tremblay, M. L. Protein tyrosine phosphatases PTP-1B and TC-PTP play nonredundant roles in macrophage development and IFN-gamma signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 9368-9372, doi:10.1073/pnas.0812109106 (2009).
- 23 St-Pierre, J. & Tremblay, M. L. Modulation of leptin resistance by protein tyrosine phosphatases. *Cell Metab* **15**, 292-297, doi:10.1016/j.cmet.2012.02.004 (2012).
- 24 Pike, K. A. & Tremblay, M. L. Regulating naive and memory CD8 T cell homeostasis--a role for protein tyrosine phosphatases. *FEBS J* **280**, 432-444, doi:10.1111/j.1742-4658.2012.08587.x (2013).
- 25 Hardy, S., Wong, N. N., Muller, W. J., Park, M. & Tremblay, M. L. Overexpression of the protein tyrosine phosphatase PRL-2 correlates with breast tumor formation and progression. *Cancer Res* **70**, 8959-8967, doi:10.1158/0008-5472.can-10-2041 (2010).
- 26 Julien, S. G., Dube, N., Hardy, S. & Tremblay, M. L. Inside the human cancer tyrosine phosphatome. *Nature reviews. Cancer* **11**, 35-49, doi:10.1038/nrc2980 (2011).
- 27 Saha, S. *et al.* A phosphatase associated with metastasis of colorectal cancer. *Science* **294**, 1343-1346, doi:10.1126/science.1065817 (2001).
- 28 Ostman, A., Hellberg, C. & Bohmer, F. D. Protein-tyrosine phosphatases and cancer. *Nat Rev Cancer* **6**, 307-320, doi:10.1038/nrc1837 (2006).
- 29 Easty, D., Gallagher, W. & Bennett, D. C. Protein tyrosine phosphatases, new targets for cancer therapy. *Curr Cancer Drug Targets* **6**, 519-532 (2006).
- 30 Crunkhorn, S. Metabolic Disease: Protein tyrosine phosphatase inhibitor reverses diabetes. *Nat Rev Drug Discov* **16**, 312-313, doi:10.1038/nrd.2017.73 (2017).
- 31 Bakke, J. & Haj, F. G. Protein-tyrosine phosphatase 1B substrates and metabolic regulation. *Semin Cell Dev Biol* **37**, 58-65, doi:10.1016/j.semcdb.2014.09.020 (2015).
- 32 Delibegovic, M. *et al.* Liver-specific deletion of protein-tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) improves metabolic syndrome and attenuates diet-induced endoplasmic reticulum stress. *Diabetes* **58**, 590-599, doi:10.2337/db08-0913 (2009).
- 33 You-Ten, K. E. *et al.* Impaired bone marrow microenvironment and immune function in T cell protein tyrosine phosphatase-deficient mice. *J Exp Med* **186**, 683-693 (1997).
- 34 Doody, K. M., Bourdeau, A. & Tremblay, M. L. T-cell protein tyrosine phosphatase is a key regulator in immune cell signaling: lessons from the knockout mouse model and implications in human disease. *Immunol Rev* **228**, 325-341, doi:10.1111/j.1600-065X.2008.00743.x (2009).
- 35 Alonso, A. *et al.* Protein tyrosine phosphatases in the human genome. *Cell* **117**, 699-711, doi:10.1016/j.cell.2004.05.018 (2004).

- 36 Diamond, R. H. *et al.* Expression of PRL-1 nuclear PTPase is associated with proliferation in liver but with differentiation in intestine. *Am J Physiol* **271**, G121-129 (1996).
- 37 Zeng, Q., Hong, W. & Tan, Y. H. Mouse PRL-2 and PRL-3, two potentially prenylated protein tyrosine phosphatases homologous to PRL-1. *Biochem Biophys Res Commun* **244**, 421-427, doi:10.1006/bbrc.1998.8291 (1998).
- 38 Zimmerman, M. W. *et al.* Protein-tyrosine phosphatase 4A3 (PTP4A3) promotes vascular endothelial growth factor signaling and enables endothelial cell motility. *J Biol Chem* **289**, 5904-5913, doi:10.1074/jbc.M113.480038 (2014).
- 39 Hardy, S. *et al.* The protein tyrosine phosphatase PRL-2 interacts with the magnesium transporter CNNM3 to promote oncogenesis. *Oncogene* **34**, 986-995, doi:10.1038/onc.2014.33 (2015).
- 40 Uetani, N. *et al.* PRL2 links magnesium flux and sex-dependent circadian metabolic rhythms. *JCI Insight* **2**, doi:10.1172/jci.insight.91722 (2017).
- 41 del Toro, R. *et al.* Identification and functional analysis of endothelial tip cell-enriched genes. *Blood* **116**, 4025-4033, doi:10.1182/blood-2010-02-270819 (2010).
- 42 Benedito, R. *et al.* Notch-dependent VEGFR3 upregulation allows angiogenesis without VEGF-VEGFR2 signalling. *Nature* **484**, 110-114, doi:10.1038/nature10908 (2012).
- 43 Suchting, S. *et al.* The Notch ligand Delta-like 4 negatively regulates endothelial tip cell formation and vessel branching. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 3225-3230, doi:10.1073/pnas.0611177104 (2007).
- 44 Dubrac, A. *et al.* Targeting NCK-Mediated Endothelial Cell Front-Rear Polarity Inhibits Neovascularization. *Circulation* **133**, 409-421, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.115.017537 (2016).
- 45 Mellberg, S. *et al.* Transcriptional profiling reveals a critical role for tyrosine phosphatase VE-PTP in regulation of VEGFR2 activity and endothelial cell morphogenesis. *Faseb j* **23**, 1490-1502, doi:10.1096/fj.08-123810 (2009).
- 46 Nawroth, R. *et al.* VE-PTP and VE-cadherin ectodomains interact to facilitate regulation of phosphorylation and cell contacts. *The EMBO journal* **21**, 4885-4895 (2002).
- 47 Fachinger, G., Deutsch, U. & Risau, W. Functional interaction of vascular endothelial-protein-tyrosine phosphatase with the angiopoietin receptor Tie-2. *Oncogene* **18**, 5948-5953, doi:10.1038/sj.onc.1202992 (1999).
- 48 Pechlivanis, M. & Kuhlmann, J. Hydrophobic modifications of Ras proteins by isoprenoid groups and fatty acids--More than just membrane anchoring. *Biochim Biophys Acta* **1764**, 1914-1931, doi:10.1016/j.bbapap.2006.09.017 (2006).
- 49 Wang, J., Kirby, C. E. & Herbst, R. The tyrosine phosphatase PRL-1 localizes to the endoplasmic reticulum and the mitotic spindle and is required for normal mitosis. *J Biol Chem* **277**, 46659-46668, doi:10.1074/jbc.M206407200 (2002).
- 50 Zeng, Q. *et al.* Prenylation-dependent association of protein-tyrosine phosphatases PRL-1, -2, and -3 with the plasma membrane and the early endosome. *J Biol Chem* **275**, 21444-21452, doi:10.1074/jbc.M000453200 (2000).
- 51 Fauman, E. B. *et al.* Crystal structure of the catalytic domain of the human cell cycle control phosphatase, Cdc25A. *Cell* **93**, 617-625 (1998).

- 52 Lee, J. O. *et al.* Crystal structure of the PTEN tumor suppressor: implications for its phosphoinositide phosphatase activity and membrane association. *Cell* **99**, 323-334 (1999).
- 53 Hellstrom, M. *et al.* Dll4 signalling through Notch1 regulates formation of tip cells during angiogenesis. *Nature* **445**, 776-780, doi:10.1038/nature05571 (2007).
- 54 Jakobsson, L. *et al.* Endothelial cells dynamically compete for the tip cell position during angiogenic sprouting. *Nat Cell Biol* **12**, 943-953, doi:10.1038/ncb2103 (2010).
- 55 van Tetering, G. & Vooijs, M. Proteolytic cleavage of Notch: "HIT and RUN". *Curr Mol Med* **11**, 255-269 (2011).
- 56 Benedito, R. & Duarte, A. Expression of Dll4 during mouse embryogenesis suggests multiple developmental roles. *Gene expression patterns : GEP* **5**, 750-755, doi:10.1016/j.modgep.2005.04.004 (2005).
- 57 Outtz, H. H., Tattersall, I. W., Kofler, N. M., Steinbach, N. & Kitajewski, J. Notch1 controls macrophage recruitment and Notch signaling is activated at sites of endothelial cell anastomosis during retinal angiogenesis in mice. *Blood* **118**, 3436-3439, doi:10.1182/blood-2010-12-327015 (2011).
- 58 Stalmans, I. *et al.* Arteriolar and venular patterning in retinas of mice selectively expressing VEGF isoforms. *The Journal of clinical investigation* **109**, 327-336, doi:10.1172/jci14362 (2002).
- 59 Gessler, M. *et al.* Mouse gridlock: no aortic coarctation or deficiency, but fatal cardiac defects in *Hey2* *-/-* mice. *Current biology : CB* **12**, 1601-1604 (2002).
- 60 Sakata, Y. *et al.* Ventricular septal defect and cardiomyopathy in mice lacking the transcription factor *CHF1/Hey2*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 16197-16202, doi:10.1073/pnas.252648999 (2002).
- 61 Donovan, J., Kordylewska, A., Jan, Y. N. & Utset, M. F. Tetralogy of fallot and other congenital heart defects in *Hey2* mutant mice. *Current biology : CB* **12**, 1605-1610 (2002).
- 62 Kokubo, H. *et al.* Targeted disruption of *hesr2* results in atrioventricular valve anomalies that lead to heart dysfunction. *Circ Res* **95**, 540-547, doi:10.1161/01.RES.0000141136.85194.f0 (2004).
- 63 Zhong, T. P., Childs, S., Leu, J. P. & Fishman, M. C. Gridlock signalling pathway fashions the first embryonic artery. *Nature* **414**, 216-220, doi:10.1038/35102599 (2001).
- 64 Pitulescu, M. E. *et al.* Dll4 and Notch signalling couples sprouting angiogenesis and artery formation. *Nat Cell Biol* **19**, 915-927, doi:10.1038/ncb3555 (2017).

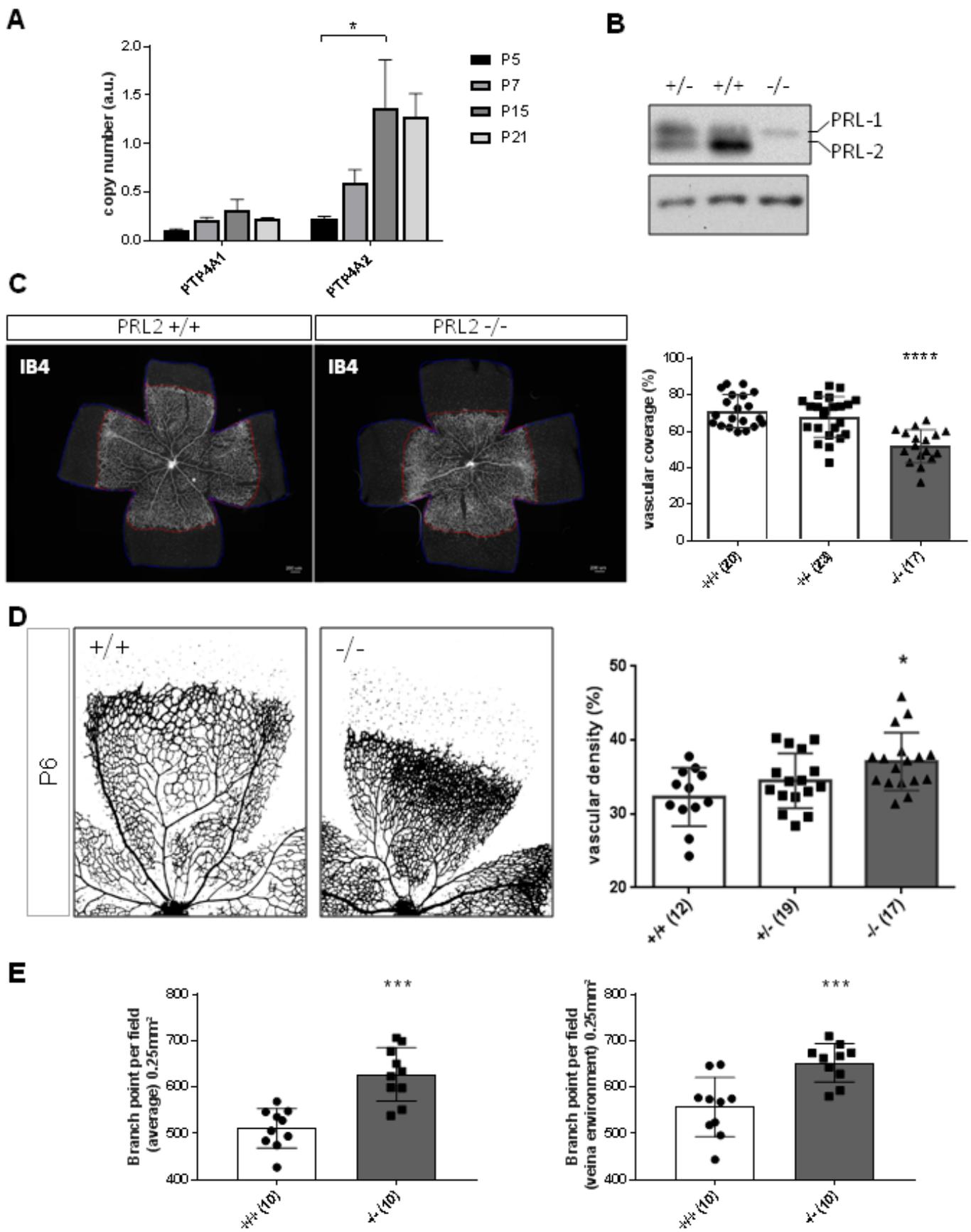


Fig.1: PRL2 downregulation increases endothelial sprouting during retinal angiogenesis

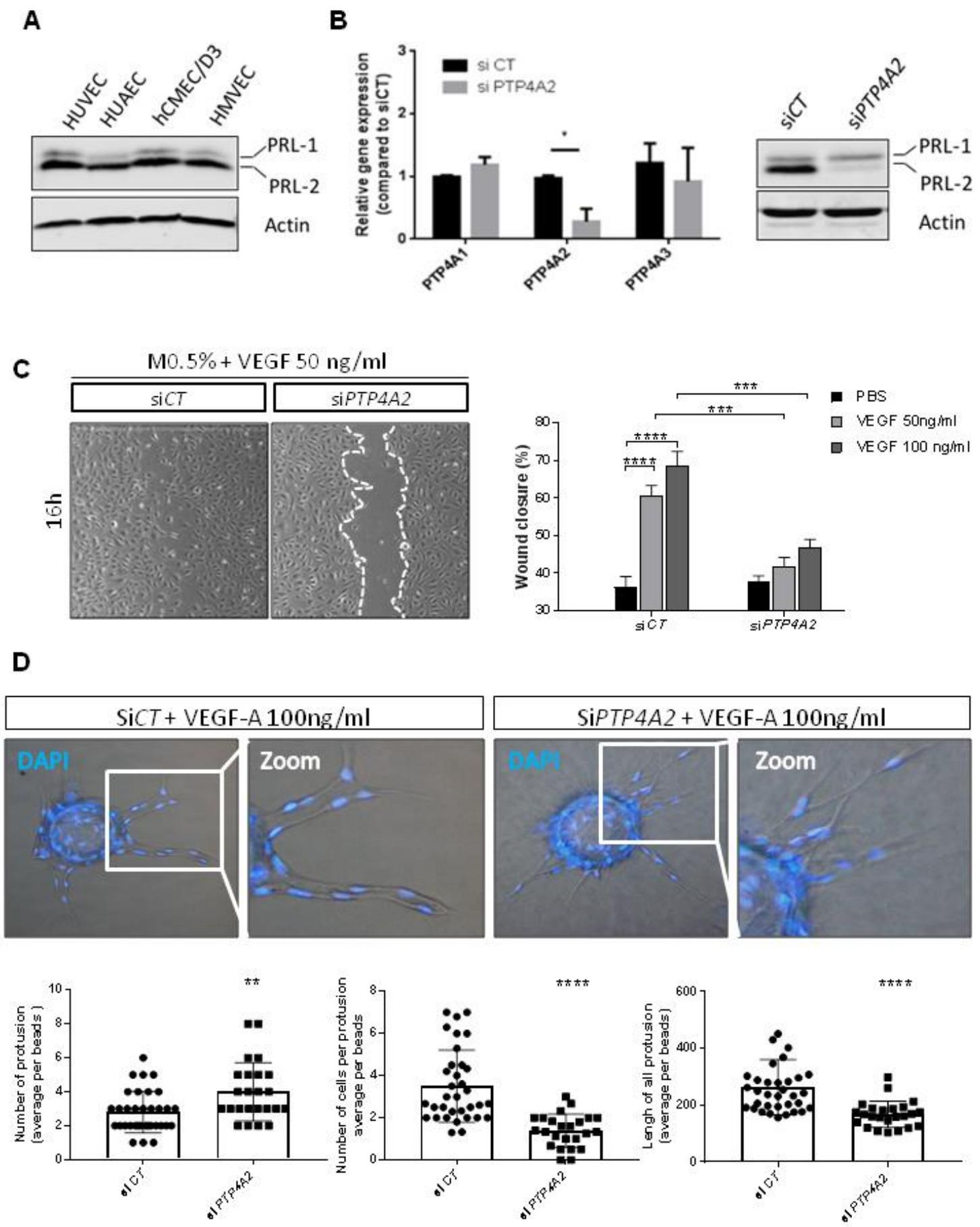


Fig.2: VEGF-induced migration and invasion is impaired without PRL2 *in vitro*

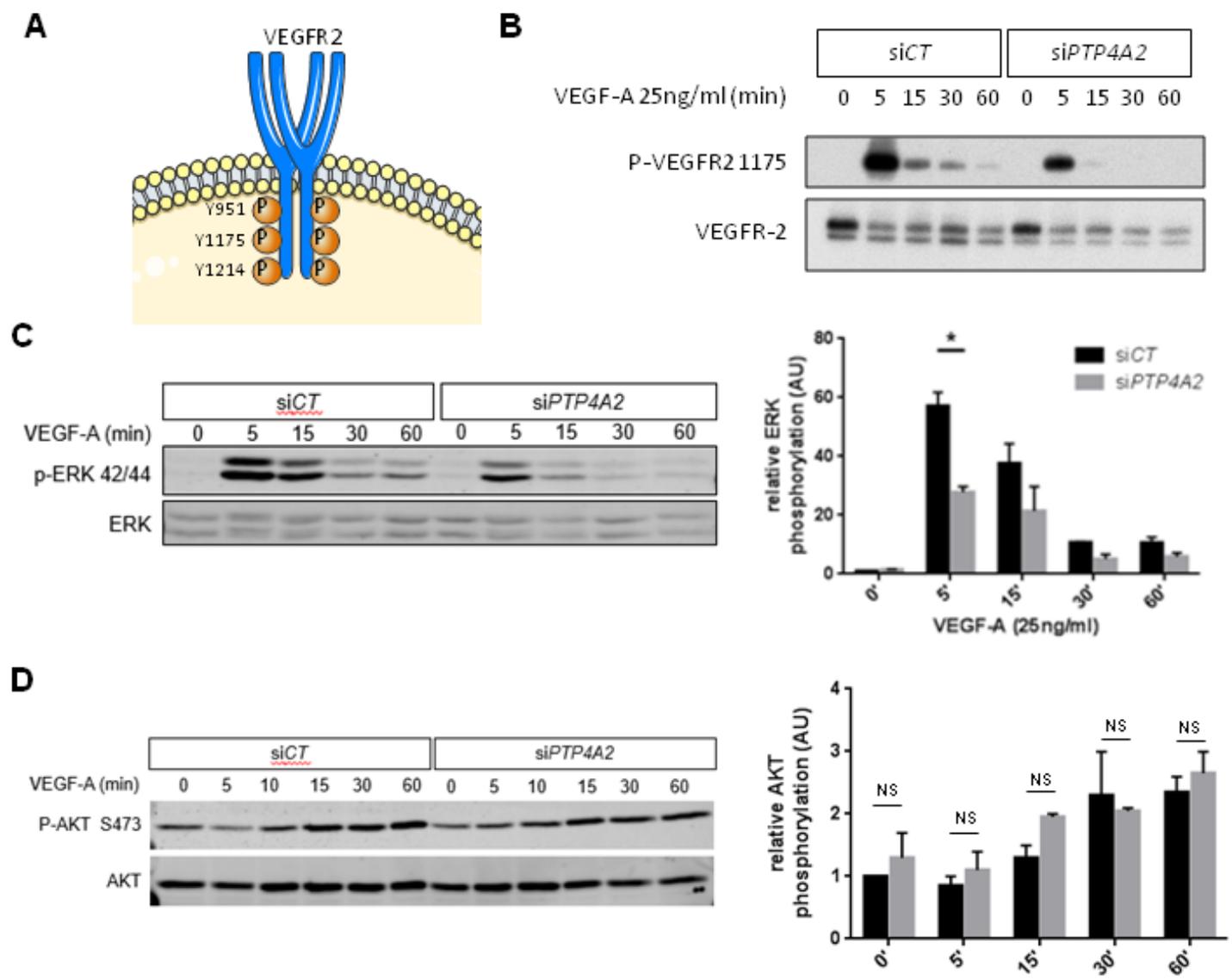


Fig.3: PRL2 downregulation leads to VEGFR-2 downstream signaling disruption *in vitro*

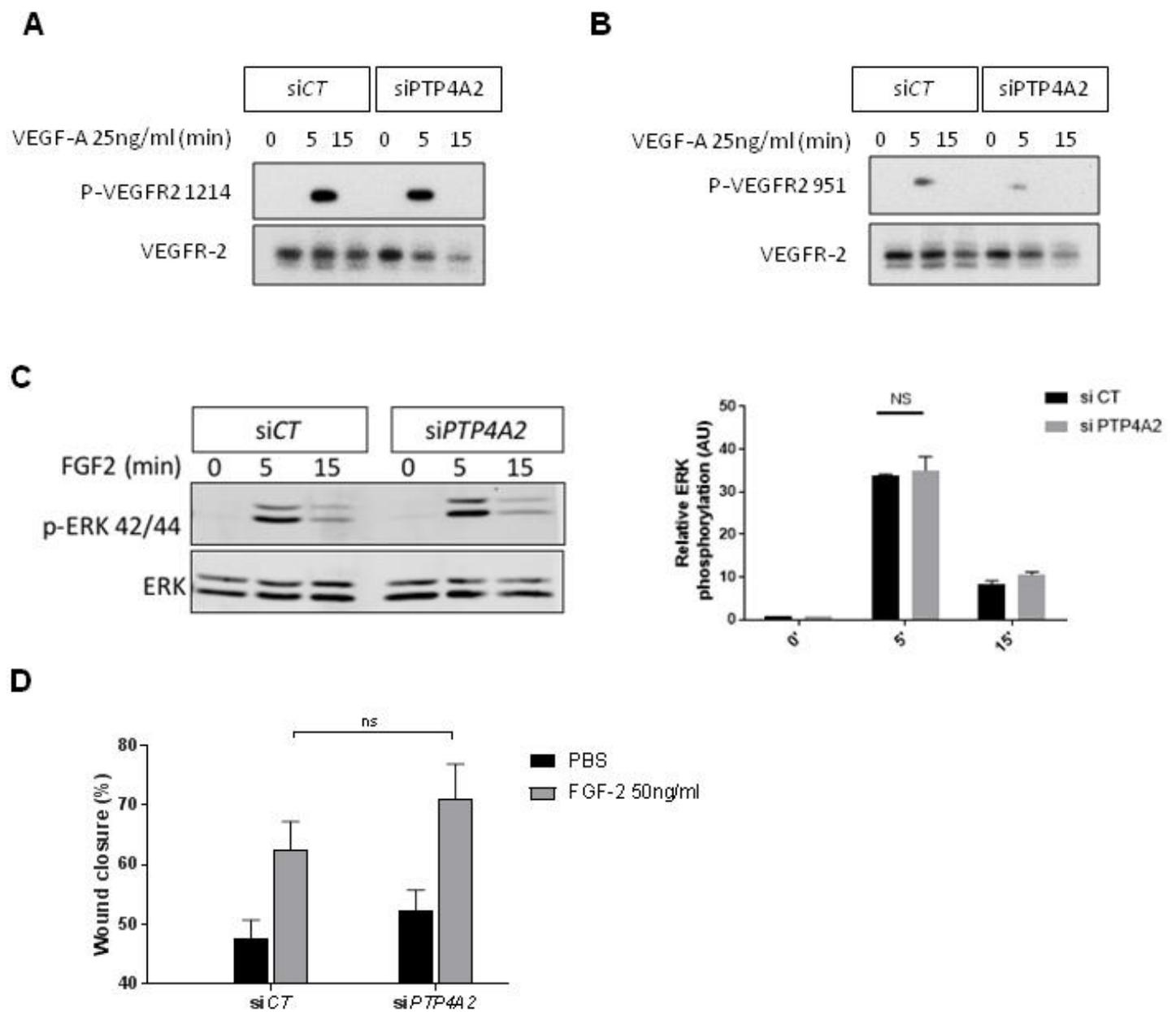


Fig.4: Specific action of PRL2 on VEGFR-2 Y1175 signaling

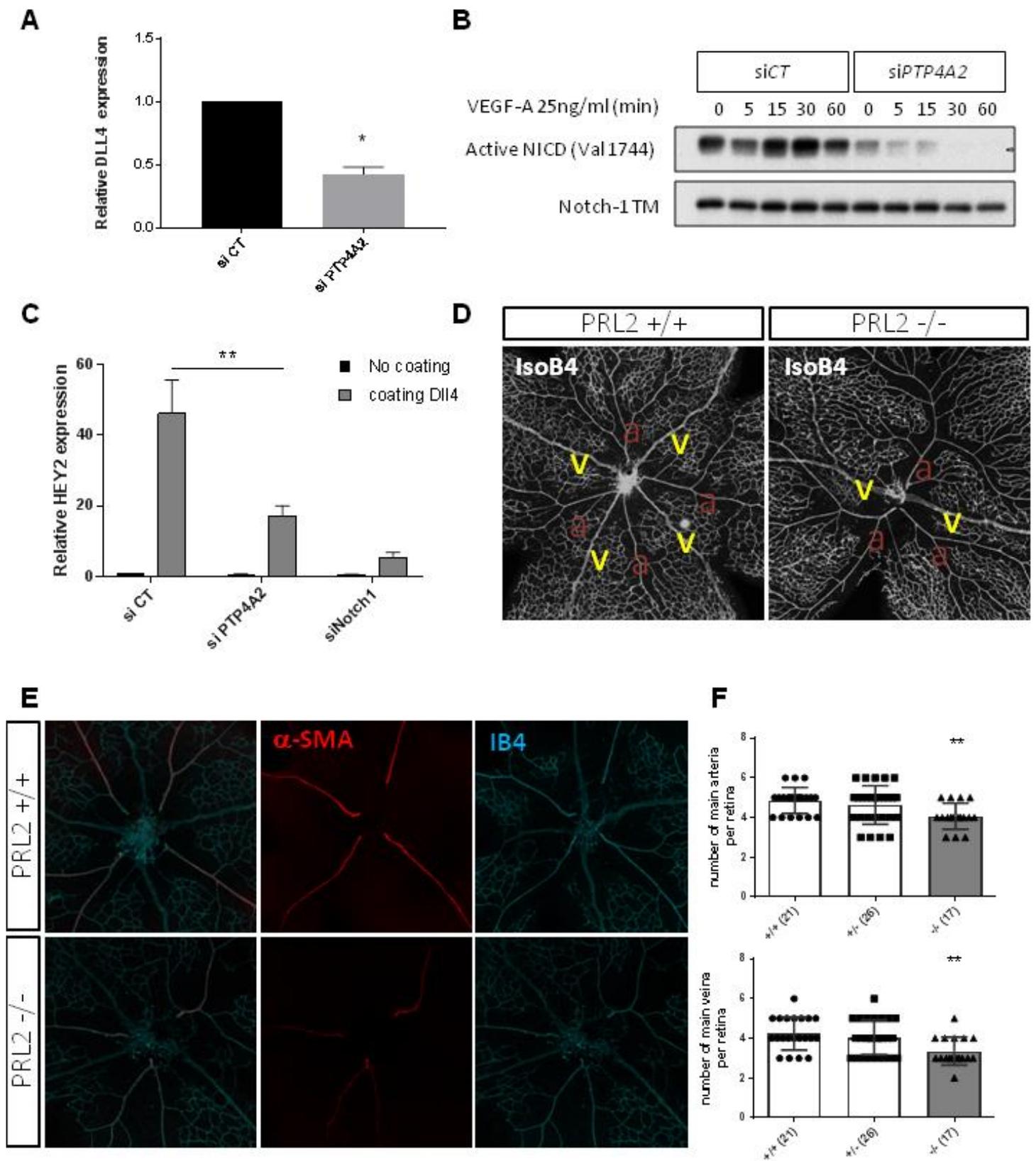


Fig.5: PRL-2 regulates A/V differentiation through the promotion of Dll4/Notch pathway

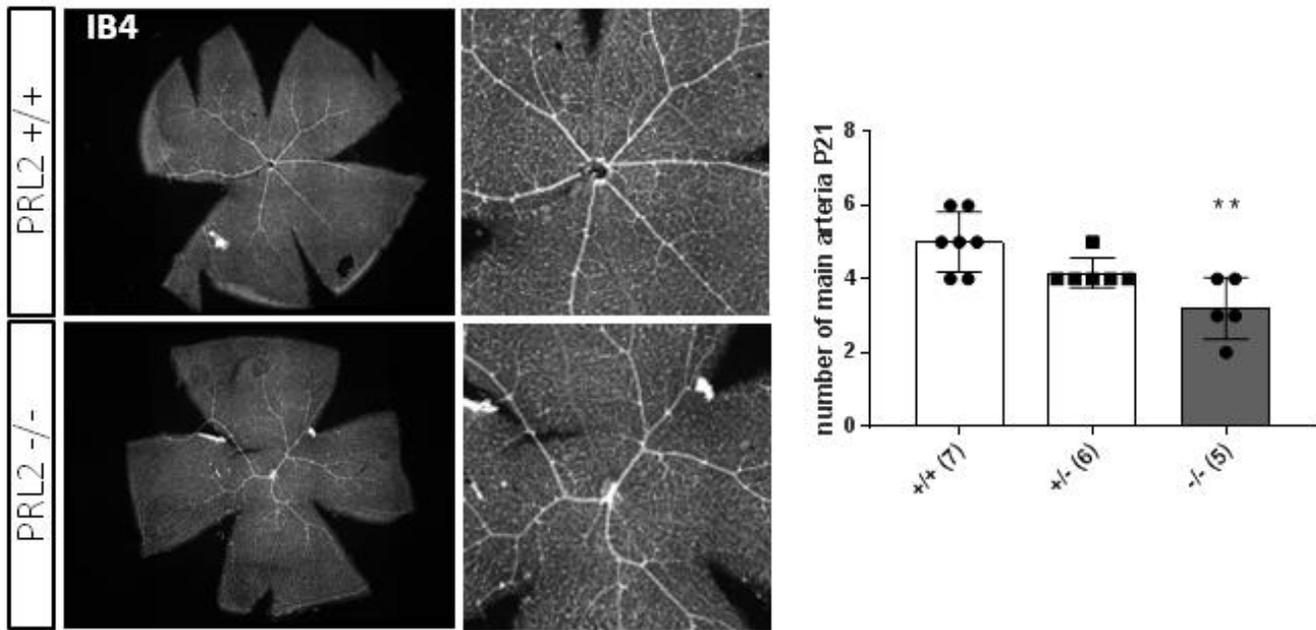
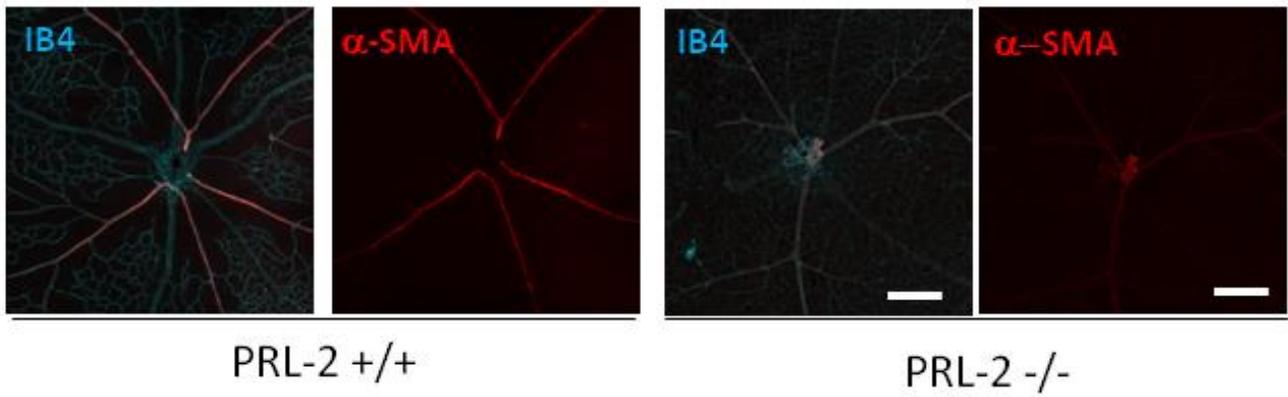
A**B**

Fig.6: PRL-2 regulation of A/V differentiation in maintains after vessel maturation and stabilisation

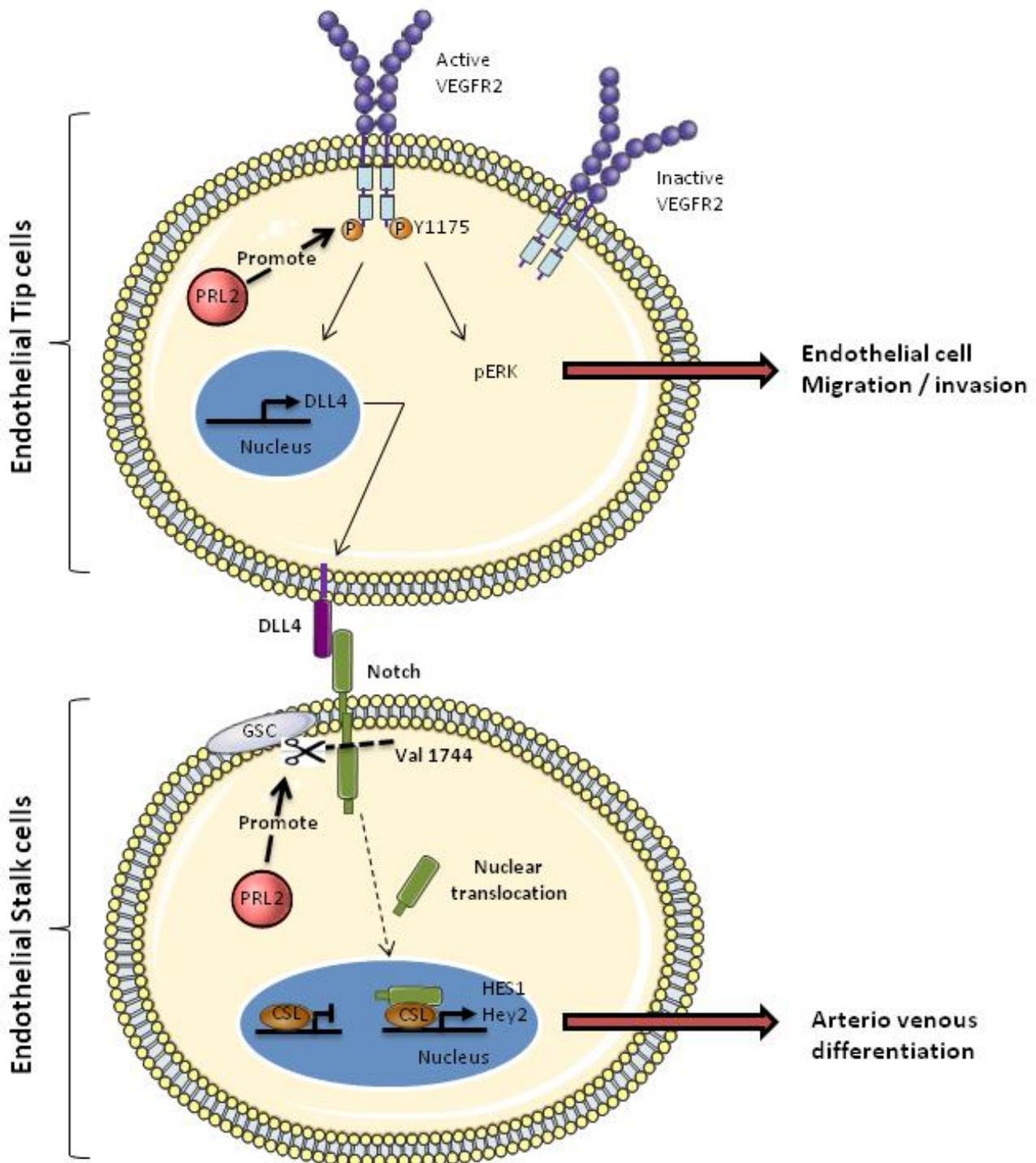


Fig.7: Working model of PRL2 action on endothelial cells

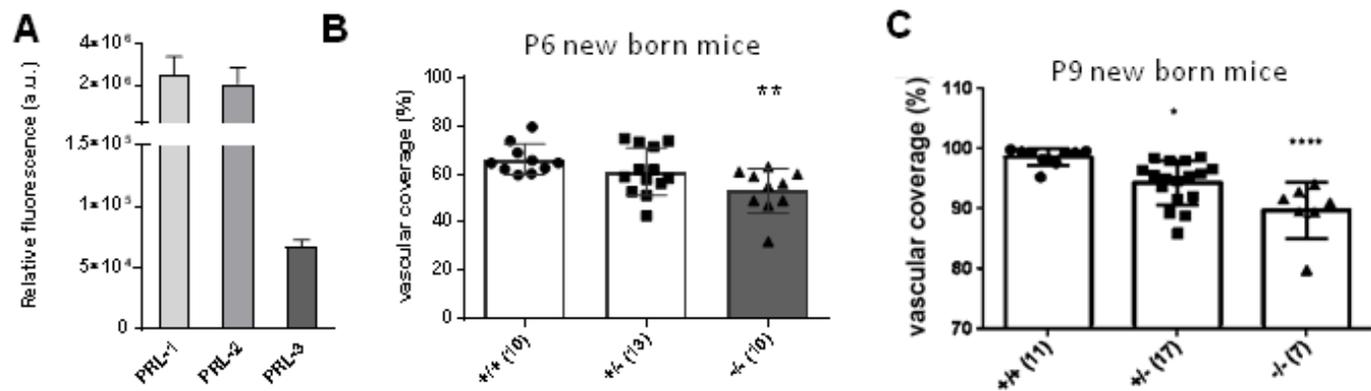


Fig. S1: PRL2 expression and impact on endothelial cell at several developmental time point

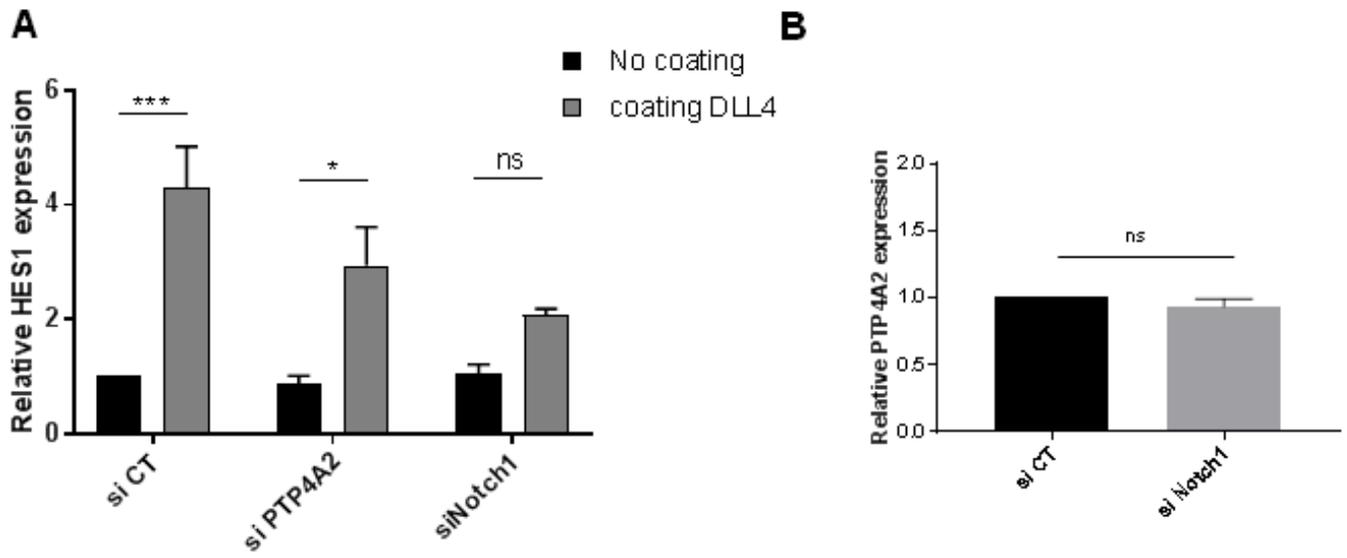


Fig. S2: PRL2 specifically regulates HEY2 expression and is an upstream effectors of Notch

III. Résultats complémentaires

III.1. Matériel et méthode complémentaires

III.1.1 Optimisation et validation de la méthode de transfection des HUVECs

Préliminairement à l'étude présentée dans l'article, nous avons optimisé le protocole de transfection transitoire des cellules HUVECs dans notre laboratoire. Sur la figure 36 ci-dessous on peut en effet voir l'effet de différentes concentrations, différents milieux, et de la présence ou non d'un coating de collagène type I. Le milieu est laissé toute la nuit sur les cellules avant d'être remplacé par du milieu complet (ECGM), les cellules ont été lysées 48h après transfection. Nous avons gardé les conditions de transfection numéro 3, qui permettent l'obtention d'une très forte diminution de PRL-2 sans augmentation de PRL-1. En effet, ce phénomène de compensation pourrait atténuer nos résultats. Il est toutefois intéressant de noter que l'Opti-MEM entraîne une forte augmentation du niveau de PRL-1. Il serait ainsi intéressant de creuser ce résultat. Cela pourrait en effet apporter des informations sur la régulation de la compensation entre les protéines PRLs.

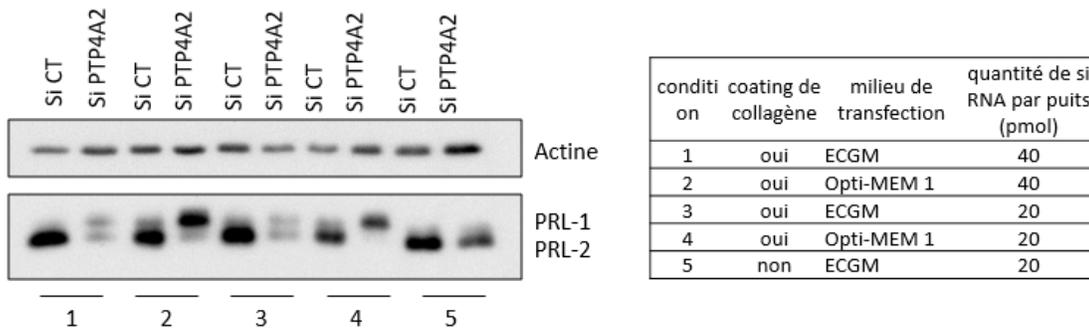


FIGURE 36. Optimisation de la transfection transitoire des cellules HUVECs

La transfection à l'aide de siARN est transitoire. Nous avons utilisé cette stratégie car les cellules HUVECs sont des cellules primaires que nous ne cultivons que pour quelques passages (<5). Toutefois afin d'être dans les conditions d'extinction les plus fortes, nous avons étudié cette extinction dans le temps. Sur la figure 37 ci-dessous, nous pouvons observer que c'est 48h après transfection que l'extinction est la plus forte. C'est donc en sachant cela que nous avons articulé nos expériences par la suite. Par exemple, les études de stimulation pendant des temps court au VEGF ou FGF-2 ont été effectuées 48h après transfection.

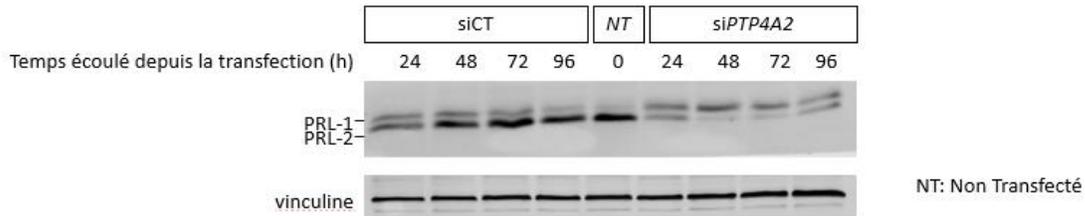


FIGURE 37. Analyse de l'extinction transitoire de PRL-2 par des si-ARN en fonction du temps

III.1.2 Zymographie sur gel de gélatine

Après extraction protéique des tumeurs, l'étude des MMPs a été réalisée par zymographie sur gel. Pour visualiser les MMPs gélatinases (MMP2 et 9), nous avons réalisé une électrophorèse sur gel d'acrylamide classique supplémenté de 1% de gélatine. 100µl de chaque échantillon ont été repris au 1/4 dans une solution tampon (250mM Tris-HCl pH6.8, 40% glycérol, 8% SDS, 0.01% bleu de bromophénol), puis déposés dans les gels de zymographie. Après électrophorèse, les gels ont été récupérés et incubés 30 min à température ambiante dans 100ml de solution de renaturation (2.5% Triton X-100). Après 3 lavages à l'eau, les gels ont été incubés 30min à température ambiante, puis 16 heures à 37°C, dans 100ml de solution d'activation des MMPs renaturées (500mM Tris-HCl pH7,8, 2M NaCl, 50mM CaCl₂, 0,2% Brij35). Le lendemain, une coloration des gels a été réalisée pendant 1h à température ambiante au bleu de coomassie (0.5w/v bleu de coomassie R-250, 10% acide acétique, 5% méthanol). Enfin, les gels ont été décolorés avec de l'eau, le temps que les bandes de dégradation de la gélatine apparaissent.

III.1.3 Détermination du niveau de Magnesium cellulaire

Nous avons utilisé une technique d'analyse multi-élémentaire : la spectroscopie d'émission atomique avec plasma couplé par induction (ICP-AES). Cette méthode permet de mesurer les radiations émises par les atomes excités ou ionisés. Le rayonnement émis est spécifique d'un élément donné et son intensité est proportionnelle à sa concentration. Brièvement, le principe repose sur une lyse atomique des échantillons avec d'une part de l'acide Nitrique qui permet de charger les éléments puis du peroxyde d'Hydrogène. Afin de faciliter la solubilisation, les échantillons sont portés à 100 degrés Celsius. Les éléments vont ensuite être excités du stade liquide au stade plasma, et la machine va mesurer la longueur d'onde de photons émis quand les éléments retournent à leur stade d'origine. Les résultats sont exprimés en partie par millions de particules (ppm), et sont reportés à la quantité protéique en µg. Cette quantité protéique est déterminée par dosage BCA pour chaque échantillon en interne.

III.1.4 Design d'un plasmide lentiviral résistant au siRNA: système de clonage Gateway®

La technologie Gateway® utilise le système de recombinaison lambda pour faciliter le transfert de séquences d'ADN hétérologues (flanquées par des sites att modifiés) entre vecteurs⁵⁹¹. Nous avons utilisé la séquence murine de PRL-2 dans laquelle nous avons inséré des mutations silencieuses aux endroits ciblés par les siRNA. Ce fragment d'ADN flanqué avec les sites attb a été commandé en tant que gblocks (IDT). Nous avons choisi d'insérer la séquence GFP et d'ajouter le peptide T2A entre les deux séquences. Ceci va permettre la séparation de la GFP et de PRL-2 par clivage. Par cette stratégie, nous allons pouvoir visualiser l'efficacité de l'infection par microscopie, sans que GFP reste associé à la protéine PTL-2. Afin d'avoir le contrôle adéquat, nous avons généré par PCR la séquence GFP seul contenant les sites attb. Nous avons utilisé comme modèle pour la PCR un vecteur GFP validé du laboratoire. La figure 39 ci-dessous présente les séquences ciblées par le pool de siARN, et les séquences résistantes correspondantes dans les constructions.

siRNA targeting sequences	siRNA-resistant constructs
Human PTP4A2 SMARTpool siRNAs:	Mouse PTP4A2FL
5'-CGATTACGCTTCAGAGATA-3'	5'-AGGCTGAGATTCCGCGATA-3'
5'-GAAGTACCGACCTAAGATG-3'	5'-GAAGTATAGGCCGAAGATG-3'
5'-GCATTGCTGTGTTCAAGTAG-3'	5'-GCACTGCTGCGTACAATAG-3'
5'-CGACCTAAGATGCGATTAC-3'	N.A.

FIGURE 38. Séquences ciblées par le pool de si-ARN utilisé dans cette étude et séquences correspondantes dans les constructions si-ARN

Nous avons ensuite transféré par réaction de recombinaison BP les fragments, AttB1-GFP-T2A-mPRL2mut-AttB2, et AttB1-GFP-AttB2 dans les plasmides donneurs pDONR™ (pLenti6, Invitrogen) contenant les sites attP. C'est sur le plasmide d'intérêt résultant dit : « d'entrée » que nous avons induit les mutations C101S et D69A dans la séquence PRL-2 par mutagenèse dirigée. Après transformation, et purification nous avons vérifié les constructions par séquençage.

Ces plasmides d'entrée contenant les sites attL ont ensuite été transférés dans un vecteur lentiviral avec des sites attR par réaction de recombinaison effectuée par la clonase LR.

III.1.5 Mutagenèse dirigée

Afin d'introduire les mutations spécifiquement au niveau de la cystéine catalytique de PRL-2, nous avons conçu une amorce couvrant le site de la mutation. Nous avons pris soin d'avoir une homologie d'environ 18-20 pb de chaque côté de la mutation. La séquence de l'amorce désignée pour chacune des mutations est présentée sur la figure 39 ci-dessous.

Mutation introduite	Séquence de l'amorce
mPRL2mut_D69A	tagattggccgtttgatgctggagctccaccccctaa
mPRL2mut_C101S	gttgtgttcagtgcatctggttcaggattaggaag

FIGURE 39. Séquence des amorces utilisées pour introduire des mutations par mutagenèse dirigée

III.1. Influence d'une stimulation VEGF ou Dll4 sur l'expression de PRL-2

Comme nous avons vu lors de l'introduction, une étude a montré que l'expression de PRL-3 est modulée par le VEGF dans des cellules endothéliales⁵⁸⁹. Nous avons voulu vérifier si cela était également vrai pour PRL-2. Pour cela nous avons stimulé les cellules HUVECs pendant une durée de 20h et analysé le niveau de protéines (figure 40. A) ainsi que le niveau d'expression de PRL-2 (figure 40.B). Comme nous pouvons observer sur la figure 40, la stimulation des cellules endothéliales par VEGF n'influence pas l'expression de PRL-2.

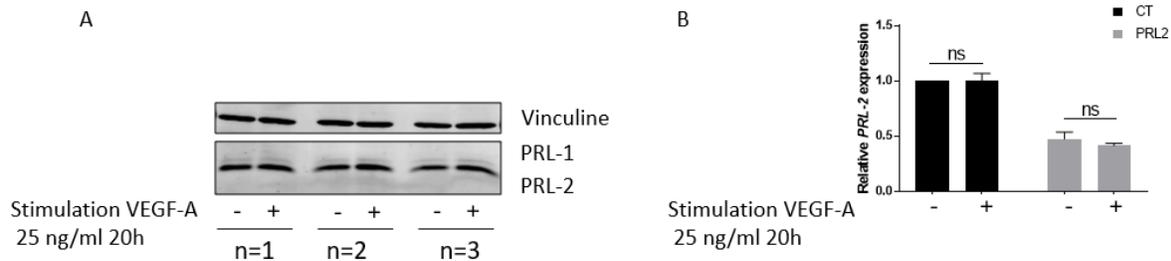


FIGURE 40. Influence de la stimulation VEGF sur l'expression de PRL-2

D'autre part, nous avons montré dans le papier I (fig5.A), que la diminution de PRL-2 entraîne une diminution de l'expression de Dll4. Ainsi, nous avons voulu voir si une stimulation au Dll4 pouvait influencer l'expression de PRL-2 par un possible phénomène de boucle retro-négative. Pour ce faire, nous avonsensemencé les cellules HUVECs préalablement transfectées sur un coating Dll4 pendant 24h, avant d'extraire les ARNs des différentes conditions. Comme nous pouvons le voir sur la figure 41.A, l'expression de PRL-2 n'est pas influencée par la stimulation de Dll4, que ce soit dans la condition contrôle, siPRL-2 ou siNotch-1.

Afin de s'assurer que la diminution de PRL-2 n'entraîne pas des anomalies au niveau de PRL-3 pouvant expliquer notre phénotype, nous avons complété notre étude en étudiant l'influence d'une stimulation au DLL4 sur l'expression de PRL-3. Pour ce faire nous avons ensemencé les cellules endothéliales dans des 6 puits avec ou sans coating DLL4 à 10 µg/ml. Nous observons une augmentation de l'expression de PRL-3 après stimulation par du DLL4 (figure 41.B). Toutefois, cette augmentation est similaire entre les conditions siCT et si-PRL-2.

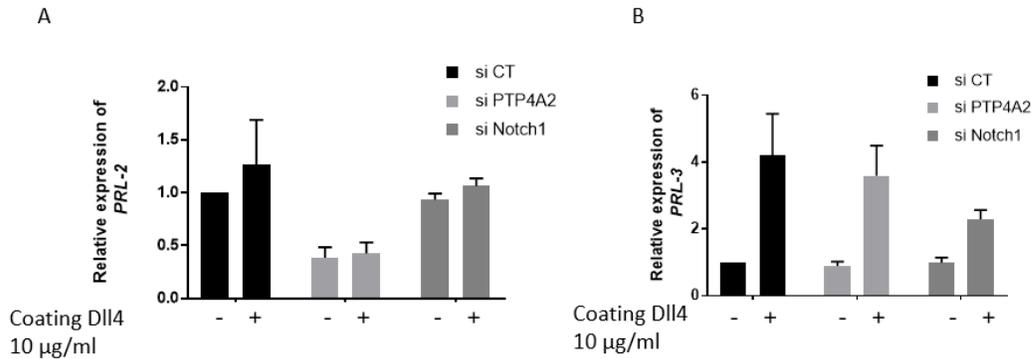


FIGURE 41. Analyse de l'expression de PRL-2 et PRL-3 après transfection avec les si-ARN correspondant et en condition plus ou moins stimulée par DLL4

Ces analyses nous apportent les informations suivantes : l'expression de PRL-2 n'est pas modulée par une stimulation au VEGF (figure 40), une stimulation au DLL4 (figure 41), ni par une diminution de Notch-1 (figure S2 papier I.). D'autre part, la diminution de PRL-2 ne bloque pas la signalisation à l'origine de l'augmentation de l'expression de PRL-3.

III.2. Conséquences de la modulation de PRL-2 sur l'expression de gènes impliqués dans l'angiogénèse

Nous avons également déterminé les conséquences de la diminution de l'expression de PRL-2 sur l'expression de certains gènes impliqués dans le processus angiogénique.

Nous avons montré que l'expression de DLL4 est diminuée lors d'une diminution de PRL-2 (fig 5. A papier I). Grâce à cette étude complémentaire nous montrons que VEGFR-2 n'est pas affectée par une diminution de PRL-2. Son corécepteur Nrp-1 non plus, ni *esm1*, une molécule spécifiquement exprimée au niveau des cellules endothéliales est impliquée dans le processus de bourgeonnement (figure 42). Ceci montre que la diminution de DLL4 observée en condition faible en PRL-2 semble être régulée et spécifique, et n'est pas due à un phénomène de diminution globale de l'expression génique comme on aurait pu trouver dans le cas d'une diminution de magnésium par exemple⁵⁹².

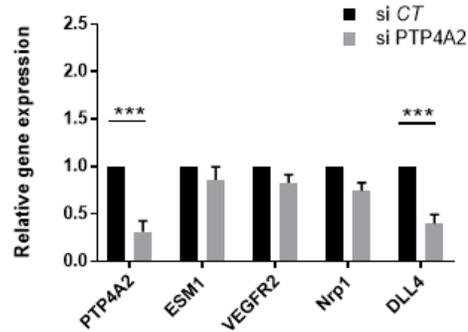


FIGURE 42. Influence de la diminution de PRL-2 sur le niveau d'expression de VEGFR-2, NRP1, ESM1, et DLL4

III.3. Implication du niveau de magnésium intracellulaire

Une étude de notre laboratoire (McGill Goodman Cancer Center) en 2014 a mis en évidence l'implication de PRL-2 dans la régulation du magnésium intracellulaire par formation d'un complexe fonctionnel entre PRL-2 et le transporteur CNNM3⁴⁷⁰. Bien qu'aucun substrat n'ait pu, pour le moment, être clairement établi pour PRL-2, cette étude apporte d'importants résultats sur la biologie de PRL-2. En effet, comme expliqué en introduction, la formation de ce complexe est impliquée dans la promotion tumorale, et n'est pas seulement limitée à PRL-2 car CNNM3 peut aussi interagir avec les autres membres de la famille PRL, PRL-1 et PRL-3^{513,514,546}.

Nous avons alors voulu déterminer le niveau de magnésium spécifiquement dans les cellules endothéliales en fonction de l'expression de PRL-2. Nous avons premièrement effectué un dosage de la teneur en magnésium dans les cellules déficientes ou non pour PRL-2. Nous avons pour cela utilisé la technique de l'ICP-AES (« *Inductively Coupled Plasma* »), une technique permettant le dosage de métaux dans des échantillons biologiques. L'ICP-AES est une des techniques quantitatives les plus sensibles pour le dosage d'éléments tels que le magnésium cellulaire.

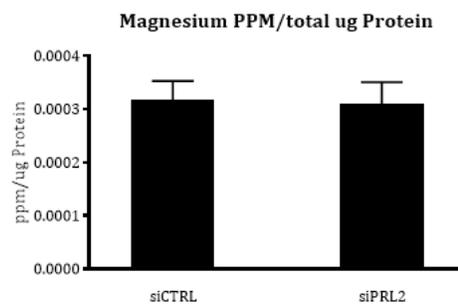


FIGURE 43. influence de PRL-2 sur le taux de magnésium cellulaire détecté par ICP-AES

Bien que l'implication de PRL-2 dans la régulation du flux de magnésium des cellules cancéreuses a clairement été démontré, nos résultats préliminaires suggèrent que la modulation de l'expression de PRL-2 n'influence pas le taux de magnésium dans les cellules endothéliales spécifiquement (figure 43). D'autre part, il est connu que PRL-2 module le flux de magnésium par l'interaction avec les récepteurs de la famille CNNMs, nous avons également voulu regarder l'expression génique de ces transporteurs du magnésium après modulation de l'expression de PRL-2. Nous avons pu montrer que la diminution de l'expression de PRL-2 dans les cellules endothéliales n'affecte pas l'expression de CNNM2, CNNM3 ni CNNM4 (figure 44).

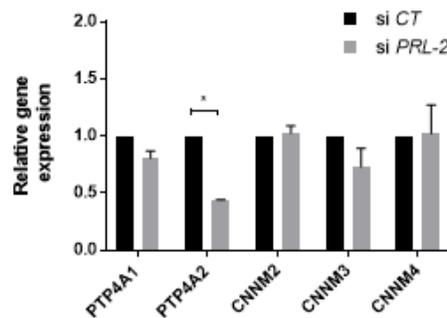


FIGURE 44. Influence de la diminution de PRL-2 sur le niveau d'expression des transporteurs au magnésium de la famille CNNMs

III.4. Implication de PRL-2 dans la dégradation de la matrice extracellulaire et la prolifération cellulaire

Comme brièvement expliqué précédemment, le VEGF permet la sécrétion d'enzymes qui vont dégrader localement la membrane basale et la matrice extracellulaire facilitant entre autre la migration et l'invasion des cellules endothéliales hors de la paroi vasculaire^{29,77}. Cette dégradation est effectuée par différents facteurs, notamment par les métalloprotéases matricielles (MMP)⁷⁷, ainsi que par le système Urokinase/Plasminogène (uPA)^{78,79}. Il existe 8 grandes familles de MMP, dont 1 famille de MMPs transmembranaires (MT-MMP pour «*Membrane Type-Matrix Metalloproteinases*»). Leurs substrats sont variés, on note par exemple des MMPs à activité gélatinase, collagénase, élastase ou encore des stromelysines, et permettent ainsi une dégradation de la plupart des composants de la matrice extracellulaire. Une dérégulation de l'activité de ces protéases est associée à de nombreuses pathologies telles que le cancer. En effet, bien que la protéolyse et la migration à travers différents tissus soient des fonctions cellulaires physiologiques, il est clairement établi qu'une caractéristique commune aux cellules cancéreuses est leur capacité à sécréter des MMPs lors de l'invasion et de l'angiogenèse tumorale^{593,594}.

Il a été montré que PRL-3 pouvait moduler positivement l'activité des MMPs dans plusieurs types de cancer tel que le cancer du sein⁵⁷⁰, du colon^{552,554,571}, du foie⁵⁷², et les gliomes⁵³⁴. De la même manière, certaines études montrent que PRL-1 est un inducteur de la migration et l'invasion cellulaire via une augmentation de l'expression et de l'activité de MMP2 et MMP9⁵⁴⁴. De manière intéressante, ces études ont aussi démontré l'implication de la voie ERK1/2 dans l'augmentation de l'expression des MMPs via PRL-1⁵⁴⁴.

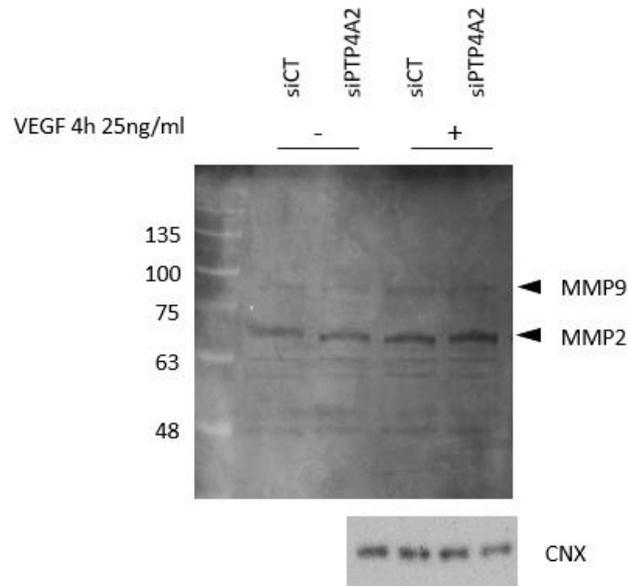


FIGURE 45. Analyse par zymographie de l'activité des MMPs sécrétées par des cellules endothéliales contrôle ou délétées pour PRL-2

De ce fait, nous avons étudié les capacités protéolytiques des cellules endothéliales avant et après diminution de l'expression de PRL-2 par gel de zymographie. Comme nous le montrons sur la figure 45, contrairement à PRL-1 et PRL-3, PRL-2 ne semble pas affecter l'activité des MMPs de type gélatinases (MMP2 et MMP9). Ainsi, les changements phénotypiques détaillés dans l'article I concernant la migration et l'invasion des cellules endothéliales via une dérégulation de la voie du VEGFR-2 ne sont pas liés à un changement d'activité des MMPs et de dégradation de la matrice extracellulaire.

Par la suite, nous avons voulu caractériser d'autres potentielles fonctions biologiques de PRL-2 dans les cellules endothéliales, autre que la migration et l'invasion cellulaire. Nous avons regardé son rôle dans la prolifération et le cycle cellulaire. En effet, nous avons montré que la signalisation ERK était diminuée lors d'une diminution de PRL-2, ceci pourrait impacter la prolifération cellulaire. D'autre part, l'expression de PRL-3 est connue pour être régulée par p53, un important point de contrôle dans le cycle cellulaire⁵⁷⁴. Plusieurs études décrivent PRL-3 comme régulateur du cycle cellulaire⁵⁷⁴. En effet, la surexpression ainsi que la diminution de l'expression de PRL-3 induit un arrêt du cycle cellulaire en phase G1, et donc de la prolifération cellulaire, soulignant l'importante régulation de son expression dans la maintenance du cycle

cellulaire physiologique. Comme pour les capacités protéolytiques présentées ci-dessus, la diminution de l'expression de PRL-2 ne semble pas induire de changement de prolifération cellulaire, suggérant un cycle cellulaire non altéré.

Ainsi, la diminution de l'expression de PRL-2 affecte spécifiquement la migration cellulaire, sans modifier la prolifération ni les capacités protéolytiques des cellules endothéliales.

Pour définir plus en détail ces différences de migrations expliquées dans l'article I, nous avons effectué des expériences de vidéo-microscopie sur des HUVEC transfectées par des Si-ARN contrôles ou Si-ARN dirigés contre PRL-2. Nous avons de cette manière pu montrer que les cellules déficientes pour PRL-2 avaient un défaut de migration à la fois collective (cf papier I), mais également individuelle (figure 46). En effet, nous avons pu mettre en évidence une diminution de la vitesse de migration de cellules, ainsi qu'une diminution de la distance totale parcourue par les cellules délétées pour PRL-2.

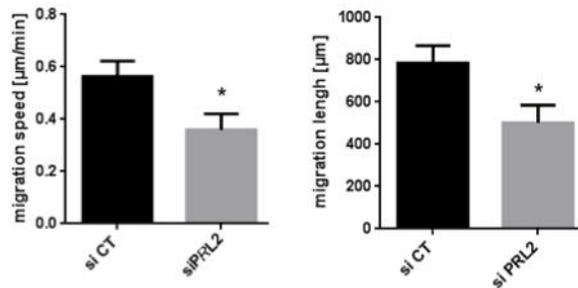


FIGURE 46. Analyse de l'implication de prl-2 dans la migration individuelle des cellules endothéliales.

III.5. Rôle du domaine catalytique de PRL-2 dans l'activation du VEGFR-2

Contrairement aux phosphatases classiques, nous avons montré dans l'article I un rôle de PRL-2 différent. En effet, malgré son statut de phosphatase, sa présence permet de maintenir la phosphorylation du VEGFR-2. De ce fait, PRL-2 pourrait, soit avoir une activité catalytique opposée à celles des autres phosphatases, ou alors exercer son action de manière indépendante de son domaine catalytique.

Comme décrit en introduction, les phosphatases PTP présentent certaines caractéristiques communes, notamment la présence de cystéines essentielles dans leurs domaines catalytiques. En effet, tous les membres de la famille PTP sont caractérisés par la présence du motif signature, HC-(X5)-R (motif M9) sur une boucle nommée boucle P au creux de la poche catalytique. Cette séquence contient notamment la cystéine catalytique qui stabilise les différentes étapes intermédiaires de la réaction de déphosphorylation. Afin de tester l'activité catalytique de PRL-2 sur le VEGFR-2, j'ai pu élaborer au cours de ma dernière année de thèse différentes constructions lentivirales de PRL-2 mutées ou non pour cette cystéine. Pour cela, nous avons utilisé le gène PTP4A2 de souris, présentant une séquence

différente du gène humain, le rendant donc résistant aux Si-ARN dirigées contre le PRL-2 humain. La cystéine catalytique a, par la suite, été substituée ou non par une sérine abolissant l'activité catalytique de PRL-2.

Ainsi, nous avons pu générer des constructions lentivirales permettant d'infecter les cellules endothéliales avec PTP4A2 murin, résistant aux Si-ARN contre le PRL-2 humain, et capable d'exercer ou non son activité catalytique. Nous n'avons pas eu le temps de tester ces plasmides sur des cellules HUVECs, mais les constructions sont prêtes pour le projet qui va prendre la suite de cette thèse dans le laboratoire.

CHAPITRE II

Implication des phosphatases dans la pathologie

I. Objectif de l'étude

Bien que le rôle des phosphatases dans le développement vasculaire soit primordial, ces dernières jouent également un rôle décisif dans la mise en place de processus pathologiques comme dans le cancer. Au cours de ma thèse, nous nous sommes intéressés à l'implication de certaines PTPs dans un type de cancer bien précis : les glioblastomes. L'angiogenèse tumorale est décisive dans ces types de tumeurs, qui sont parmi des tumeurs les plus vascularisées. Aucun traitement curatif n'existe à ce jour, et la recherche de nouvelles cibles thérapeutiques est essentielle afin d'améliorer la survie, ainsi que la qualité de vie des patients. Au cours de ce chapitre, je me suis intéressée aux rôles de PRL-2, mais aussi de PTPRS, dans la progression tumorale des glioblastomes et la survie des patients.

II. L'angiogenèse pathologique dans les tumeurs : cas des glioblastomes

Les gliomes sont des tumeurs du système nerveux central qui représentent environ 70% des tumeurs primitives du cerveau. Ils dérivent de cellules dites gliales comme les astrocytes ou les oligodendrocytes. Les cellules gliales sont l'un des constituants majeur du cerveau, et peuvent représenter jusqu'à 90% des cellules du système nerveux central. La première classification officielle de l'OMS fut publiée en 1979 et se base principalement sur le type histologique des tumeurs. En 2007 l'OMS propose une classification des tumeurs du système nerveux central, qui deviendra l'une des références internationales⁵⁹⁵. Cette classification introduit une stadification des différents types de gliomes en 4 grades, les bas grades étant les moins agressifs. De plus, les tumeurs gliales sont également différenciées par leur type cellulaire d'origine. On parle alors de tumeurs avec un phénotype astrocytaire, ou encore oligodendrocytaire.

Bien que les glioblastomes (grade 4) soient les gliomes les plus agressifs, ils correspondent également aux tumeurs cérébrales les plus fréquentes (53% des gliomes). L'évolution d'un glioblastome est en général très rapide (2 à 3 mois) et la survie globale est de 15 mois. Le taux de survie à 5 ans d'un adulte présentant un glioblastome est inférieur à 5%⁵⁹⁶. L'âge moyen de découverte d'un glioblastome est de 65 ans. Sa prévalence atteint un maximum entre 70 et 80 ans avec environ, pour 100 000 habitants, 30 nouveaux cas par an. En 2015, environ 50 % des nouveaux cas de glioblastomes ont été diagnostiqués chez des patients de plus de 65 ans.

Depuis 2005, le traitement des glioblastomes est relativement standardisé, et suit ce qu'on appelle le Protocole de Stupp. Brièvement, il s'agit d'effectuer une résection chirurgicale la plus optimale possible, et de procéder à une radiothérapie du lit chirurgical. Cette radiothérapie est également associée à une chimiothérapie adjuvante systémique par un agent alkylant de l'ADN, le témozolomide (Temodal®)^{597,598}. L'activation de cette molécule induit la méthylation de l'ADN sur des guanines en position O⁶ et N⁷ et des adénines en position O³, entraînant un mauvais appariement du double brin de l'ADN^{599,600}. Ceci va entraîner l'activation du système de réparation de l'ADN MMR (« *mismatch repair* ») qui aboutira à des cassures de l'ADN et au déclenchement de la mort cellulaire. Les glioblastomes sont des tumeurs hautement infiltrantes. De ce fait, l'invasion des cellules tumorales de glioblastome dans le parenchyme cérébral, induit une récurrence des patients de manière presque inévitable. En fonction de l'état général du patient, une chirurgie de seconde ligne n'est pas toujours envisageable et différentes options sont alors généralement possibles comme des chimiothérapies de seconde ligne, des traitements par thérapies ciblées ou l'inclusion dans certaines études cliniques.

Le processus physiologique d'angiogenèse peut être détourné par les tumeurs pour devenir pathologique, on parle d'angiogenèse tumorale. Inhiber cette formation de vaisseaux sanguins tumoraux est, depuis longtemps, un grand axe de recherche dans la progression

tumorale⁷². Ce phénomène est un processus permettant aux tumeurs de se développer via la formation de vaisseaux sanguins irriguant la masse cancéreuse et apportant les éléments nécessaires à son développement. Les glioblastomes font partie des tumeurs les plus vascularisées⁶⁰¹, ce qui en fait des cibles de choix pour les traitements anti-angiogéniques. Le Bevacuzimab (Avastin®) est un anticorps monoclonal humanisé ciblant et fixant le VEGF-A. Cette fixation bloque l'activité du VEGF-A en empêchant sa fixation sur le VEGFR-2. Ceci entraîne un ralentissement de l'angiogenèse et ainsi de la croissance tumorale. Depuis Mai 2009, le Bevacizumab est utilisé lors de la récurrence tumorale, mais ne possède pas d'autorisation dans cette indication en Europe. On note qu'il est autorisé par la FDA (« *Food and Drug Administration* ») aux États-Unis lors de la récurrence des glioblastomes, ce qui rentre alors dans le cadre du protocole Stupp^{602,603}. Bien que les essais cliniques en phase II soient très prometteurs, le manque d'étude clinique de phase III du Bevacuzimab, ainsi que sa réponse modeste en comparaison à une radiothérapie classique, en fait un traitement très controversé dans le monde^{604,605}.

L'angiogenèse tumorale est un critère très important pour la progression des glioblastomes, mais les traitements anti-angiogéniques, restent à ce jour très controversés. La nécessité de trouver de nouveaux biomarqueurs dans les glioblastomes reste cruciale.

III. Étude bio-informatique

En parallèle de notre étude sur PRL-2 dans le développement vasculaire présenté dans les parties précédentes, nous avons regardé l'implication de cette phosphatase en pathologie. Puisque nous avons pu montrer que PRL-2 agissait via le VEGFR-2, nous nous sommes intéressés à l'implication de PRL-2 dans les glioblastomes, des tumeurs très hautement vascularisées.

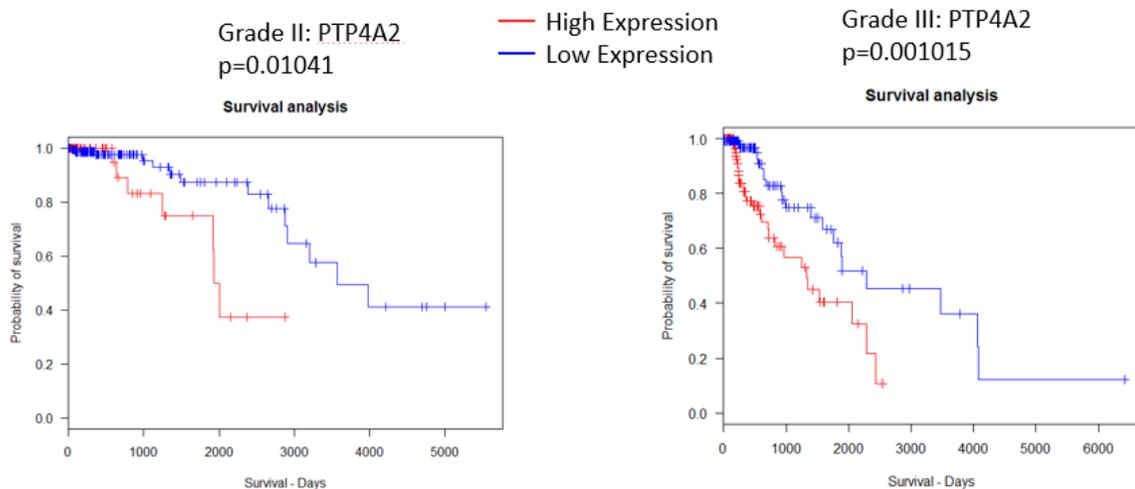


FIGURE 47. Analyse de la survie globale des patients en fonction de l'expression de PTP4A2 dans des gliomes de bas grade.

Nous avons pour cela réalisé des analyses de survie en utilisant la base de données TCGA (« *Cancer Genome Atlas* ») dans les différents groupes de gliomes, en fonction de l'expression de PRL-2. Nous avons pu voir que la survie des patients est hautement corrélée avec l'expression de PRL-2 dans les gliomes de bas grade. En effet, dans les gliomes de grade II ou III, la survie des patients est largement augmentée lorsque l'expression de PRL-2 est la plus faible (figure 47 et 48). La diminution de PRL-2 dans le développement vasculaire entraîne une diminution du recouvrement vasculaire rétinien (article I). Il semble de plus désormais que cette diminution pourrait également inhiber l'angiogenèse tumorale, induisant une nette augmentation de la survie des patients. Nous avons également regardé la survie des patients atteints de glioblastomes, mais la différence, bien que significative, reste minime comparée aux différences obtenues dans les gliomes de bas grades.

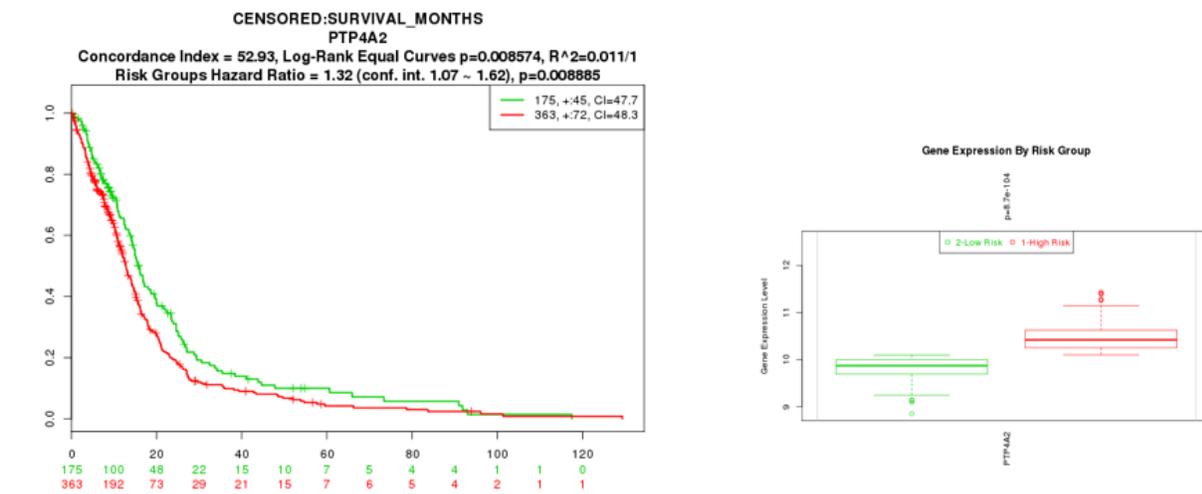


FIGURE 48. Analyse de survie globale des patients en fonction de l'expression de PTP4A2 dans des glioblastomes.

IV. Implication d'autres phosphatases dans la progression des GBM : PTPRS

IV.1. PTPRS

PTPRS, ou RPTP σ , est une autre phosphatase de type I dont l'action s'effectue selon une cystéine catalytique. Il s'agit d'un récepteur transmembranaire à activité tyrosine phosphatase de la sous famille LAR. PTPRS est connue comme étant une phosphatase essentielle, et fortement exprimée, lors de l'embryogenèse dans de nombreux organes notamment dans le cerveau. En effet, PTPRS a été décrit comme jouant un rôle essentiel dans le développement du système neuroendocrinien⁶⁰⁶. Elle permet notamment de moduler les interactions intercellulaires ainsi que la bonne migration et guidage axonal⁴⁴⁴. De nombreuses autres fonctions de PTPRS dans la biogenèse et l'homéostasie cérébrale ont été découvertes, comme dans la neurogenèse ou la synaptogenèse⁶⁰⁷. La plupart de ses fonctions dans le développement neural sont liées à la capacité des phosphatases PTPRS à lier différents

protéoglycans comme les chondroitines sulfates ou les héparines sulfates. Ces interactions permettent de favoriser les interactions cellulaires ainsi que la formation des synapses⁶⁰⁸.

En plus de ce rôle essentiel dans le développement du système nerveux central, PTPRS est impliquée dans le cadre de nombreux cancers. En effet, l'expression de cette phosphatase est souvent altérée dans le cadre de cancers cérébraux⁶⁰⁹. De manière intéressante, il a été montré que l'expression de PTPRS pouvait contrôler l'invasion des cellules tumorales via le contrôle de la transition épithéliaux-mésenchymateuse (EMT), un processus essentiel pour la migration et l'invasion tumorale. Cette fonction de PTPRS se ferait via le contrôle de l'activité d'un récepteur tyrosine kinase: L'EGFR⁶¹⁰. En effet, PTPRS est une phosphatase de l'EGFR, et permet donc de contrôler son activité. Comme introduit précédemment, l'expression de PTPRS est souvent altérée dans les cancers cérébraux et de ce fait, l'activité de l'EGFR n'est plus régulée, et devient oncogénique^{609,611}. L'augmentation de l'activité de l'EGFR est un phénomène décrit depuis 1988 dans les gliomes⁶¹². Cette amplification se produit dans 15 à 30% des gliomes de grade III, et dans plus de 50% des glioblastomes^{613,614}. Cette augmentation de l'activité s'accompagne de l'amplification d'un variant de l'EGFR, l'EGFR VIII qui induit une activation constitutive de la voie oncogénique PI3K^{615,616}, renforçant ses mécanismes pro-tumoraux.

Comme pour PRL-2, nous nous sommes intéressés au cours de ma thèse à l'implication de cette phosphatase particulière dans le cadre de la progression tumorale des glioblastomes. L'analyse bio-informatique de la base de données du TCGA révèle que l'expression de PTPRS est un facteur favorable au niveau du pronostic vital des patients atteints de glioblastome. En effet, si nous divisons les patients en deux cohortes en fonction de l'expression de PTPRS (Forte expression et faible expression), nous voyons que la survie des patients est significativement augmentée lorsque PTPRS est fortement exprimée (figure 49). Ceci corrèle avec l'hypothèse que PTPRS agirait contre le développement tumoral, probablement via son action sur l'EGFR.

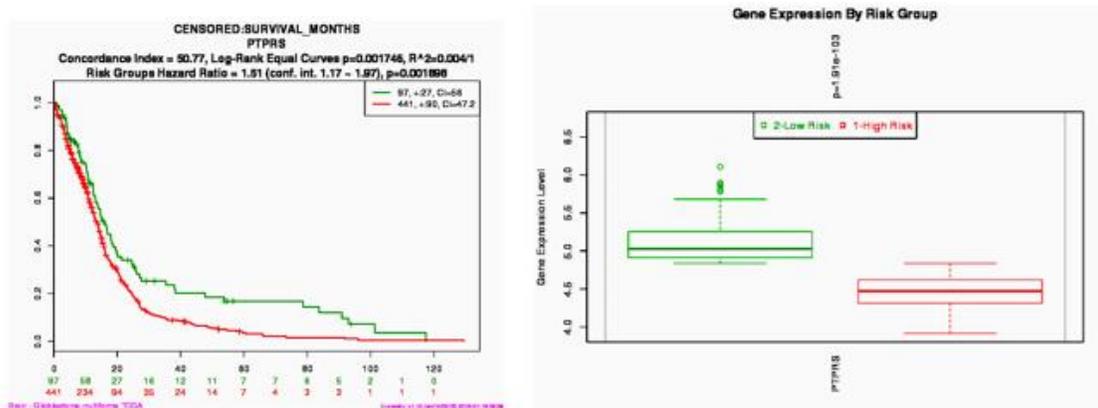


FIGURE 49. Analyse de la survie globale des patients (courbe Kaplan-Meier) en fonction de l'expression de PTPRS dans des glioblastomes

IV.2. Choix du modèle cellulaire

Nous avons analysé l'expression de PTPRS à l'aide de l'anticorps Monoclonal PTPRS Abnova (clone 1H6) dans différentes lignées de glioblastome. Comme nous pouvons voir sur la figure 50 ci-dessous, la lignée U87, n'exprime pas PTPRS, tandis que U373-MG U373vIII, et U251 l'exprime à un niveau similaire. Il faut savoir que des analyses génétiques, effectuées par le fournisseur cellulaire, ATCC, *the American Type Culture Collection* ont permis de montrer une très forte similarité entre les lignées U251 et U373 à tel point qu'ils n'en commercialisent dorénavant qu'une seule. La lignée de neuroblaston SH-SY5Y exprime fortement PTPRS, tandis qu'une lignée de glioblastome murine GL261 l'exprime faiblement.

Nous avons continué nos études sur la lignée U373. La forme tronquée de l'EGFR est une mutation fréquemment retrouvée dans les glioblastomes, mais elle est perdue en culture. Le professeur Janusz Rak, avec qui nous étions en collaboration sur un projet exosomes, nous a gentiment donné la lignée U373vIII qui exprime constitutivement la forme tronquée de l'EGFR. L'injection intra-cérébrale de ces cellules chez la souris génère des tumeurs beaucoup plus agressives en comparaison de celles issues de U373 seule^{617,618}.

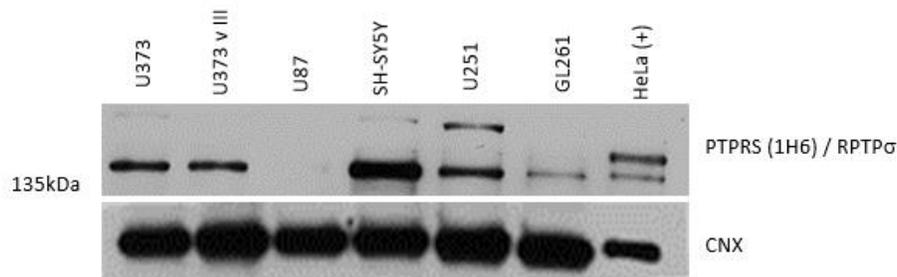


FIGURE 50. Expression de PTPRS dans différentes lignées de glioblastomes humaines et murines.

IV.3. Étude de l'impact de la diminution de PTPRS sur l'invasion *in vitro*

Nous avons utilisé des cellules U251 transfectées avec des Sh-ARN contrôles, ou avec des Sh-ARN dirigés contre PTPRS (Sh3383 et Sh3725). Toutes ces constructions ont été couplées à la GFP. Dans un premier temps, nous avons vérifié par western blot la diminution de PTPRS dans ces cellules (figure 51).

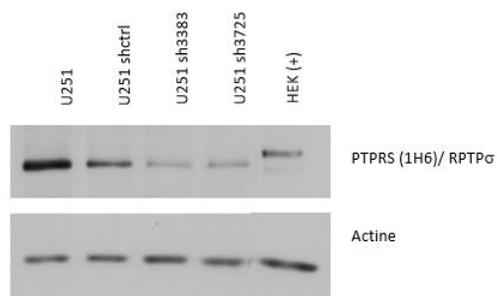


FIGURE 51. Vérification de la diminution de ptprs dans les cellules de glioblastome U251 transfectées avec deux sh différents ciblant PTPRS

Afin d'étudier l'implication de PTPRS dans l'invasion tumorale des glioblastomes, nous avons mis en place au laboratoire un modèle de culture en sphéroïde des cellules tumorales. Les sphéroïdes sont composés de cellules tumorales organisées en sphère. Ce modèle d'étude a l'avantage d'analyser l'invasion tumorale en 3 dimensions dans une matrice. Cela se rapproche plus de la réalité qu'une culture en 2 dimensions des cellules tumorales. En effet, les sphéroïdes miment l'architecture d'une masse tumorale *in vitro* et ceci est renforcé par le fait que la pénétration des drogues est très limitée.

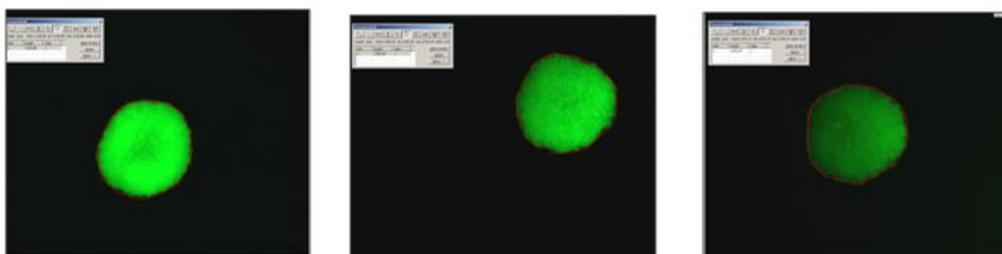


FIGURE 52. Exemple de sphéroïdes à J1. À ce stade, les sphéroïdes de taille aberrantes sont exclues de l'analyse

Nous avons pu générer, plusieurs sphéroïdes à partir de la lignée de glioblastome U251. Les sphéroïdes sont générés à l'aide de plaques 96 puits particulières. Ces plaques ont des puits en forme de U recouverts d'une couche d'hydrogel qui inhibe l'attachement cellulaire (plaques U-bottom «*Ultra Low Attachment*»). Nous avons choisi de faire cette étape de formation de sphéroïdes dans de la méthylcellulose. En effet, il a été montré que son utilisation renforce la circularité et la compaction des sphéroïdes⁶¹⁹. Le lendemain, nous avons sélectionné les sphéroïdes de taille similaire, et analysé leur capacité d'invasions (figure 52). De manière surprenante, nous avons pu établir que les sphéroïdes Sh-PTPRS présentent une forte diminution de l'invasion des cellules tumorales dans la matrice (figure 53). Ce résultat est

d'autant plus surprenant que PTPRS agit comme un gène suppresseur de tumeur et donc son expression est positive pour la survie des patients atteints de glioblastome.

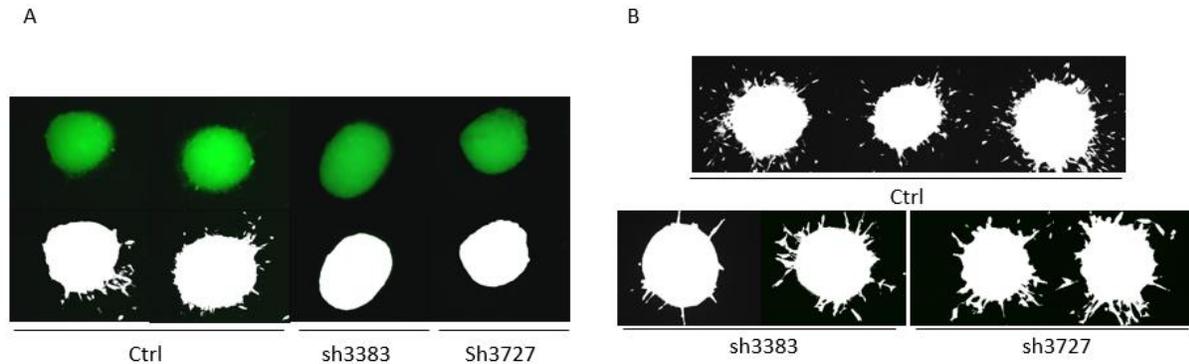


FIGURE 53. Sphéroïdes composés de cellules U251 transfectées avec un sh contrôles ou les sh ciblant PTPRS à J5 (A) ou J7 (B).

Comme présenté en introduction, les glioblastomes sont des cancers extrêmement agressifs. La tumeur n'a en général pas le temps de former de métastases intra ou extra-cérébrales avant la mort du patient. En effet, de manière quasi systématique, les patients atteints de glioblastomes meurent du fait de la masse tumorale qui fait pression sur des zones essentielles du cerveau. Cependant, l'invasion des cellules dans le parenchyme cérébral est ce qui induit la formation de récurrences après chirurgie, et qui entraîne la mort des patients après chirurgie et traitement au Temozolomide. Dans les sphéroïdes déficients ou non pour PTPRS, nous pouvons voir une inhibition de l'invasion tumorale. Les sphéroïdes ont un phénotype dense et compact, en analogie avec les masses tumorales primaires causant le décès des patients. De ce fait, la diminution de l'invasion tumorale lors de la diminution de l'expression de PTPRS semble s'accompagner d'une augmentation de la densité et de la masse tumorale, ce qui est facteur de mauvais pronostic chez les patients, en terme de survie sans traitement. L'étude des fonctions biologiques de PTPRS dans les cellules de glioblastomes est toujours en cours, et notamment l'examen de la prolifération cellulaire au sein du sphéroïde devrait être un fort indicateur de l'agressivité de cette masse tumorale.

IV.4. Stratégie d'extinction de l'expression de PTPRS par la technologie CRISPR/Cas9

Au vu des résultats prometteurs, de l'expérience préliminaire présentée ci-dessus, nous avons voulu trouver une stratégie pour obtenir une extinction plus forte de l'expression de PTPRS dans une population globale. Nous avons voulu également pouvoir isoler des clones entièrement délétés pour PTPRS. Nous nous sommes tournés vers la stratégie CRISPR/Cas9⁶²⁰.

Cette stratégie repose sur l'utilisation d'une endonucléase à ADN, la « *CRISPR-associated protein-9 nuclease* » (Cas9) provenant de la bactérie streptocoque du groupe A. Cette endonucléase est guidée sur l'ADN génomique par une séquence d'ARN guide de 20 nucléotides, le sgRNA. Celui-ci se fixe sur l'ADN en amont d'un motif PAM, 5'NGG. La Cas9 va alors cliver l'ADN cible sur les deux brins de l'hélice. Cette coupure a lieu environ 3 paires de base en amont du PAM (figure 54).

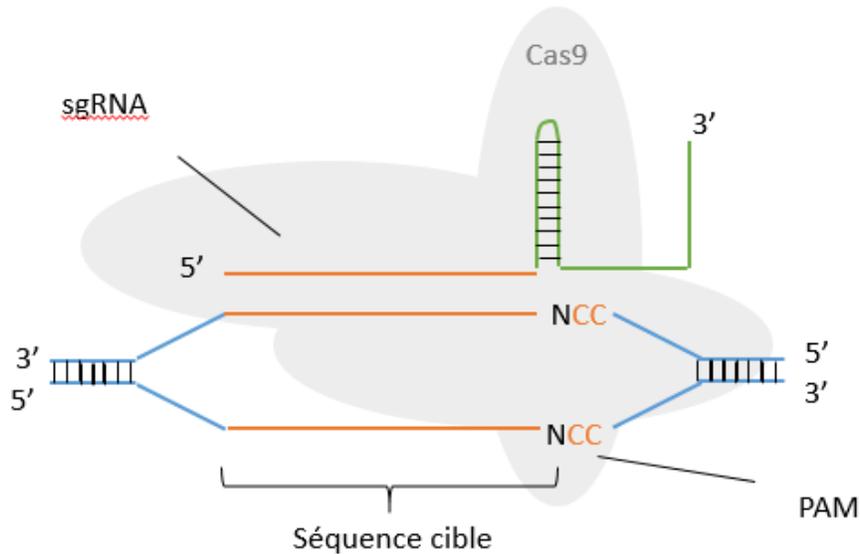


FIGURE 54. Schéma illustrant le mécanisme de crisper/cas9
Figure modifiée de Mali et al, 2013 ⁶²¹

Ainsi, en désignant les séquences guides, il est possible de cibler précisément le lieu de coupure, et donc de stopper l'expression du gène d'intérêt. J'ai obtenu quatre sgRNA, 2 ciblant l'exon 1 et 2 de la séquence génomique de PTPRS humain et les deux autres ciblant PTPRS murin. J'ai utilisé comme contrôle un sgRNA ciblant la séquence lacZ(cf figure 55). J'ai ensuite cloné ces séquences guides dans deux types de vecteurs. Le premier est un vecteur lentiviral lentiCRISPRv2, le second plasmide va nous permettre de faire des transfections et d'isoler des clones dont l'expression de PTPRS est complètement déléetée. En effet, ce plasmide, pSpCas9(BB)-2A-GFP contient la GFP, permettant de faire du tri par Facs (cf figure 55).

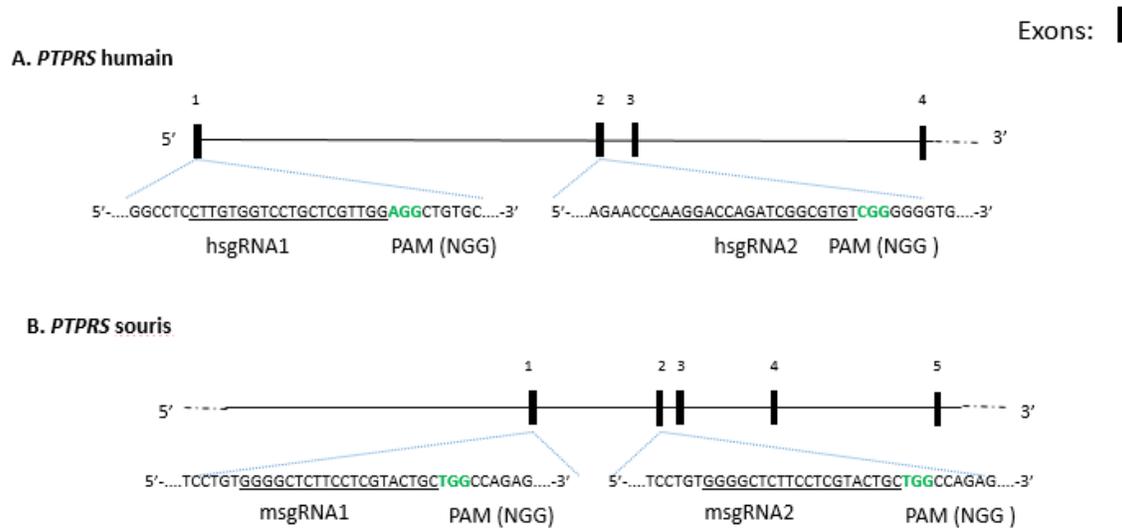


FIGURE 55. Séquences guides de 20 nucléotides ciblant les premiers exons de PTPRS chez l'homme et la souris

Nous avons vérifié par séquençage nos différentes constructions, puis nous les avons testées par infection sur différents types de cellules de glioblastomes. Comme nous pouvons le voir sur la figure 56, le niveau d'expression global de PTPRS des différentes populations tumorales est dramatiquement diminué.

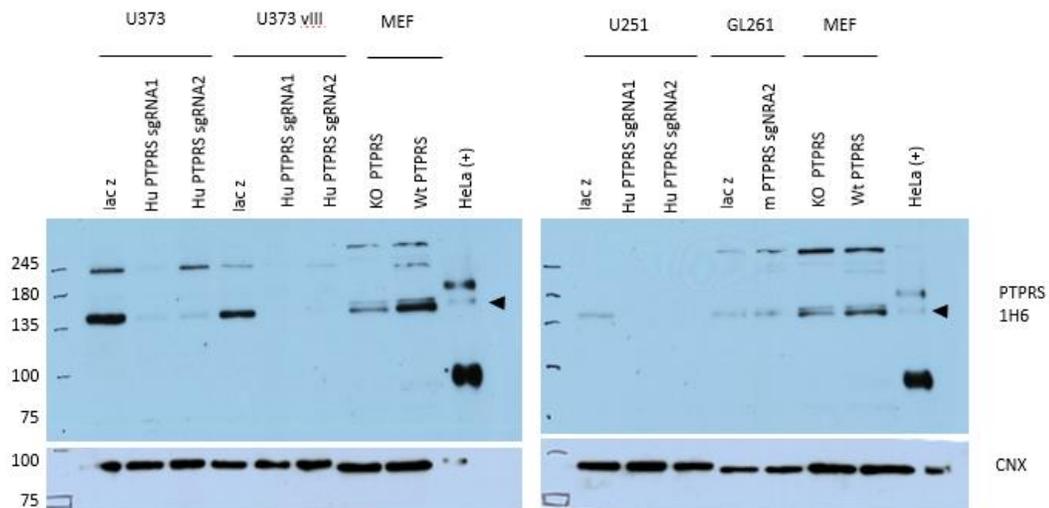


FIGURE 56. Vérification de la diminution de l'expression de PTPRS dans une population globale de différentes lignées cellulaires de glioblastome (stratégie CRISPR/CAS9).

CHAPITRE III

Autres modèle d'études pour l'angiogenèse : La membrane chorioallantoïdienne de l'embryon de poulet (CAM)

Ce chapitre a fait l'objet d'un article finalisé et actuellement en cours de soumission.

I. Objectif de l'étude

Tout au long de cette thèse, nous avons présenté différents modèles *in vitro* ou *in vivo* d'études de l'angiogenèse comme le modèle des rétines ou encore de sprouting sur billes. Durant cette thèse, j'ai eu l'occasion d'étudier l'angiogenèse (physiologique ou tumorale) sur un autre modèle *in vivo* dans notre laboratoire: le modèle de la membrane chorioallantoïdienne de l'embryon de poulet. J'ai également contribué à la mise en place d'un protocole audiovisuel de ce modèle, actuellement en soumission dans le journal JoVE. Je vais présenter dans ce chapitre la description, les avantages ainsi que les limites de ce modèle.

II. Matériel et méthode: la CAM

Les œufs de poulet ont été livrés à 4°C (Couvercle de Cerveloup, Vourey, France) et ont été placés 24h à température ambiante. Nous les avons par la suite lavés avec des cotons humidifiés et placés dans un incubateur à 37°C et 65 % d'humidité sur un système rotatif de 25° toutes les 4h pendant 72h. Les œufs ont été ouverts 3 jours après incubation (=J3). Afin de protéger les embryons et de les décoller de la paroi supérieure de l'œuf, une incision sur sa partie latérale a été effectuée, et 5 à 6ml de vitellus ont été retirés. Une seconde incision a par la suite été effectuée sur la partie supérieure de l'œuf afin de pouvoir créer une zone de travail, et pour visualiser le cœur de l'embryon.

L'implantation des cellules tumorales a été réalisée 10 jours après incubation (=J10). Pour ce faire, un anneau délimitant la zone d'implantation a préalablement été posé sur la surface de la membrane chorioallantoïdienne (CAM) de l'embryon de poulet. A l'aide d'un scalpel, nous effectuons alors une légère abrasion de la CAM afin de faciliter l'implantation des cellules tumorales. Un volume maximum de 30 ul contenant 3 millions de cellules a été déposé dans l'anneau et le développement tumoral a été suivi pendant 7jours (J17).

III. Description du modèle

Du fait de l'accessibilité aisée de l'embryon de poulet, le modèle de la CAM est très utilisé pour les études concernant le développement embryonnaire. Elle permet la facile visualisation du développement. Néanmoins, il s'agit aussi d'un très bon modèle pour l'étude de l'angiogenèse tumorale, les processus de migration et d'invasion tumorales⁶²². Le développement de l'embryon dure 21 jours avant éclosion. Le système immunitaire n'étant pas mature pendant le développement embryonnaire du poulet, les implantations de tumeurs se font généralement sans rejet. La CAM se forme dès les premiers jours du développement (jours 4 à 5) et possède un réseau vasculaire très riche permettant l'irrigation de l'embryon. Les cellules sont implantées au 7ème jour du développement, une fois que la CAM s'est totalement formée. Le réseau vasculaire de cette dernière entraînera la formation de vaisseaux tumoraux autour du 4ème jour après implantation.

IV. Article II: "Investigate tumor development through the chick embryo assay and co-culture experiment"

Cet article est actuellement en cours de soumission dans le journal JoVE « *Journal of Visualized experiment* »

Investigate tumor development through the chick embryo assay and co-culture experiment

K. Boyé^{1,2#}, M. Poulet^{1,2,3#}, C. Billottet^{1,2}, A. Bikfalvi^{1,2}

¹INSERM U1029, Pessac, France; ²Université de Bordeaux, Pessac, France; ³McGill Goodman Cancer Center, Montreal, Canada.

#Author contribute equally to the work

Correspondance to:

A. Bikfalvi

Angiogenesis and Cancer Microenvironment Laboratory

INSERM U1029/University Bordeaux

Allée Geoffroy St Hilaire

33615 Pessac/France

Phone: (33) 5 40 00 87 03

Fax: (33) 5 40 00 87 05

E-mail: andreas.bikfalvi@u-bordeaux.fr

INTRODUCTION

Glioblastoma, or type 4 glioma, corresponds to the most common brain primary tumors (53% of gliomas). Its evolution is rapid and 5-year survival rate is less than 5%¹. Since 2005, the treatment of glioblastomas has been relatively standardized and consists of extensive surgical resection followed by focal radiotherapy associated with chemotherapy (Temozolomide (Temodal®))^{2,3}. To date, no curative treatment has been established despite the introduction of fluorescence-guided surgery⁴. Tumor infiltration is the basis of glioblastoma recurrence in almost all patients, and this in about 9 months. Thus, the major problem occurring after surgical resection is tumor cell invasion within the local microenvironment. Since the discovery of critical mutation and oncogenic drivers leading to glioblastoma progression and invasion, numerous targeted therapies have been established. These therapies target the tumor microenvironment and receptors and signaling pathways involved in tumor progression⁵⁻⁷. The understanding of biological processes controlling the microenvironment and tumor cell invasion is essential in order to develop new targeted therapeutic strategy. This is evidently true for cancers associating infiltration and aggressiveness, in which the tumor microenvironment is an essential component.

We recently demonstrated the implication of the chemokine receptor, CXCR3, in glioblastoma cell invasion⁸. We used several models to study tumor infiltration in the microenvironment such as the chicken chorioallantoic membrane model which has been characterized as a key model to study tumor progression and invasion⁹⁻¹². This experimental procedure also allows the study of another aggressive cancer with poor survival, pancreatic adenocarcinoma¹³.

The use of the CAM model was highly relevant for both tumor types. Indeed, CXCR3-A has been shown to promote glioblastoma invasion in this model and an interaction with the endocytic receptor LRP1 is involved. Furthermore, we have shown in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma (PDAC) that the CXCL4L1 chemokine, a CXCR3 ligand, has a dual function and is induced in this model by the microenvironment.

We confirm these results by using another model which consists in the co-culture of tumor cells with myofibroblasts.

In this article, we will describe these two main experimental models. These are two integrated and complementary models which are extremely useful to study the role of critical players in tumor invasion.

The methods described here are easy to reproduce in any laboratory with a proper equipment.

PROTOCOL

1. The chicken chorioallantoic membrane model

1.1. Fertilized chicken eggs (*Gallus Gallus*) are shipped at 4°C and need to be placed at room temperature for 48 hours to prevent early embryonic lethality.

1.2. First, eggshells are washed with water moistened cotton and fertilized eggs are incubated for 72 hours at 37°C and 65% of humidity on a system of wheels allowing rotations of 25 degrees every 6 hours

Note: Never use ethanol or any other alcohol to clean the eggshells as it will lead to embryonic death.

1.3. On day 3 post-incubation, insert the needle of a 15ml syringe on the eggshell part corresponding to the air chamber of the egg and remove 7ml of albumin to detach the embryo from the upper part of the egg.

1.4. Place an adhesive film (Durapore tape) on the upper part of the eggs before proceeding to the opening of the eggs. Perform an incision on the upper part of the egg and create a window using spring scissor. Make sure to visualize the beating heart and the vascular network of each embryo. 1.5. Close the working area with adhesive film (Durapore tape) and let the embryos develop for 7 days at 37°C and 70% of humidified atmosphere.

1.6. On day 10 post-incubation, place a plastic ring on the surface of the chorioallantoic membrane. This will delimit your implantation zone.

1.7. In the case of glioblastoma perform a gentle laceration of the CAM surface using scalpel blades in order to facilitate and promote tumor engraftment. This has not to be done for PDAC where cells are deposited directly onto the CAM.

Note: Be careful using the scalpel as you do not have to damage the embryo or the preexisting vessel. Absolutely no bleeding has to occur.

1.8. Inject 4 million of cells within the plastic ring in 40 µl of cell in serum-free culture medium.

1.9. Monitor daily tumor development for 7 days and remove all dying embryos each morning to significantly prevent contamination of the living embryos.

1.10. On Day 17 post-implantation, remove the ring containing CAM and tumor. On a petri dish containing sterile cold PBS, carefully remove the plastic ring. The remaining CAM containing the tumor can be either included in O.C.T. and placed at -80°C for immunohistochemistry labelling, or directly snap-frozen in liquid nitrogen for mRNA or protein extraction.

2. Histological staining and tumor visualization

2.1. Tumors included in O.C.T. were cut using a cryostat at -22°C.

2.2. Perform 10um sections on gelatinized slides and placed them at -80°C for long-term storage. Before histological staining, allow the slide to dry at room temperature for 10minutes.

2.3. Fix the section using 4% paraformaldehyde (PFA) for 10 minutes. Wash twice with PBS and permeabilize the tissue section with a solution of PBS 0.1% Triton X-100 for 10minutes.

2.4. Subsequently, saturate for 1 hour with PBS 0.1% Triton X-100 and 5% BSA, and primary antibody in PBS 0.1% Triton X-100 and 0.1% BSA and leave overnight on tissue sections at 4°C.

2.5. Wash with PBS and add the secondary antibodies for 1 hour at room temperature on the sections. Finally, after 3 washes with PBS, mount the sections with mounting solution containing DAPI.

3. Co-culture experiment: Implication of the tumor microenvironment

3.1. Cultivate the cell lines in separate Petri dish until confluence.

3.2. Infect the cell lines of interest with GFP-tagged adenoviruses, or with specific plasmid allowing fluorescence expression of the cell lines of interest

3.2. Wash the cells in PBS and place them in suspension using Trypsin or another dissociation reagent. Count cells and mix them at a ratio of 50/50.

NOTE: Depending on your experiment, you can try different ratio of cell mix.

3.3. Seed the cell mix in different 6-well plates and let them adhere at 37°C for 6hours.

NOTE: A 50/50% ratio is chosen but can be modulated. Add controls in which you cultivate your cells of interest with a control cell lines. The control cell line can be the same cell line that the one of interest, but without GFP.

3.4. Place cells in an incubator equipped with an Essen Bioscience IncuCyte™ Live Imaging System, or other device allowing live fluorescent and phase contrast imaging of your cells.

3.5. With the live imaging system, you will see cells with phase contrast or by GFP fluorescence.

3.6. Determine the proliferation rate of the cells of interest by calculating the change in GFP-fluorescence intensity for several days.

3.7. Normalize your intensity of fluorescence in comparison to the control co-culture experiment.

REPRESENTATIVE RESULTS

These protocols allow an *in vivo* and *ex vivo* evaluation of tumors progression and invasion and helps to determine the role of microenvironment factors or tumor cell drivers. We have used these experimental approaches to assess the involvement of several factors in tumor progression such as the role of CXCR3-A in tumor cell invasion and the role of stroma components in the induction of CXCL4L1 in tumor cells¹³.

The advantage of the CAM model is the rapid direct access for visualization of tumor development. Figure 1 shows the development of a typical glioblastoma implanted onto the CAM following the procedure described above.

The co-culture experiment allows to study *in vitro* the impact of specific microenvironmental components (stroma, fibroblasts, myofibroblasts, or cancer-associated fibroblasts) in tumor progression. In Figure 2 a typical example is represented where PDAC cells were transfected with a GFP-encoding vector were co-cultured with patient-derived myofibroblasts.

DISCUSSION

In the present article, we described two experimental protocols to investigate tumor cell invasion as well as the implication of microenvironmental components in tumor growth.

The CAM model allows us to compare the development and invasion of different tumor cell types. Tumor cells may be transfected to overexpress a specific gene or shRNA and the effect of these modifications can then be explored. We used this approach recently to demonstrate the pro-invasive properties of CXCR3-A when expressed on the surface of GBM cells. Furthermore, the CAM model can be used to apply molecules /drugs on the top of the tumor since it has “open-window” where molecules can be applied directly onto the tumor¹⁴.

Furthermore, to obtain new insights into the role of the microenvironment in tumor progression the use of co-culture model¹³ is of great interest. We have shown for instance that BXPC3 cells do not express CXCL4L1 in culture alone, but are able to do this when they are co-cultured with myofibroblasts¹³.

The models described herein follow the 3R rule (Russell and Burch)¹⁵ and helps to reduce the amount of animal experimentation in sentient animals.

It is of clinically relevance to perform cancer research study with an integrated and translational methodology. The use of the approaches described above, in addition to classical *in vitro* experiments such as tumors cell proliferation and migration, allows a better understanding of the complex interactions taking place in tumor cells and their micro-environment.

REFERENCES

- 1 Dolecek, T. A., Propp, J. M., Stroup, N. E. & Kruchko, C. CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2005-2009. *Neuro Oncol* **14 Suppl 5**, v1-49, doi:10.1093/neuonc/nos218 (2012).
- 2 Stupp, R. *et al.* Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* **352**, 987-996, doi:10.1056/NEJMoa043330 (2005).
- 3 Stupp, R. *et al.* Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol* **10**, 459-466, doi:10.1016/S1470-2045(09)70025-7 (2009).
- 4 Stummer, W. *et al.* Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial. *Lancet Oncol* **7**, 392-401, doi:10.1016/S1470-2045(06)70665-9 (2006).
- 5 Raizer, J. J. HER1/EGFR tyrosine kinase inhibitors for the treatment of glioblastoma multiforme. *J Neurooncol* **74**, 77-86, doi:10.1007/s11060-005-0603-7 (2005).
- 6 Reardon, D. A. *et al.* Multicentre phase II studies evaluating imatinib plus hydroxyurea in patients with progressive glioblastoma. *Br J Cancer* **101**, 1995-2004, doi:10.1038/sj.bjc.6605411 (2009).
- 7 Dresemann, G. Imatinib and hydroxyurea in pretreated progressive glioblastoma multiforme: a patient series. *Ann Oncol* **16**, 1702-1708, doi:10.1093/annonc/mdi317 (2005).
- 8 Boye, K., Billottet, C., Pujol, N., Alves, I. D. & Bikfalvi, A. Ligand activation induces different conformational changes in CXCR3 receptor isoforms as evidenced by plasmon waveguide resonance (PWR). *Sci Rep* **7**, 10703, doi:10.1038/s41598-017-11151-x (2017).

- 9 Auf, G. *et al.* Inositol-requiring enzyme 1alpha is a key regulator of angiogenesis and invasion in malignant glioma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 15553-15558, doi:10.1073/pnas.0914072107 (2010).
- 10 Cimpean, A. M., Ribatti, D. & Raica, M. The chick embryo chorioallantoic membrane as a model to study tumor metastasis. *Angiogenesis* **11**, 311-319, doi:10.1007/s10456-008-9117-1 (2008).
- 11 Ribatti, D. The chick embryo chorioallantoic membrane in the study of tumor angiogenesis. *Rom J Morphol Embryol* **49**, 131-135 (2008).
- 12 Ribatti, D. The chick embryo chorioallantoic membrane as a model for tumor biology. *Exp Cell Res* **328**, 314-324, doi:10.1016/j.yexcr.2014.06.010 (2014).
- 13 Quemener, C. *et al.* Dual Roles for CXCL4 Chemokines and CXCR3 in Angiogenesis and Invasion of Pancreatic Cancer. *Cancer Res* **76**, 6507-6519, doi:10.1158/0008-5472.CAN-15-2864 (2016).
- 14 Hagedorn, M. *et al.* Accessing key steps of human tumor progression in vivo by using an avian embryo model. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 1643-1648, doi:10.1073/pnas.0408622102 (2005).
- 15 Russell, M. W. & Burch, R. The principles of humane experimental technique. Wheathampstead (UK): Universities Federation for Animal Welfare. (1959).



Figure 1 : Glioblastoma progression in the chick chorioallantoic membrane model. 3 millions of U87 glioblastoma cells were injected at the surface of the CAM and tumor development was assessed and controlled every day for 7 days .

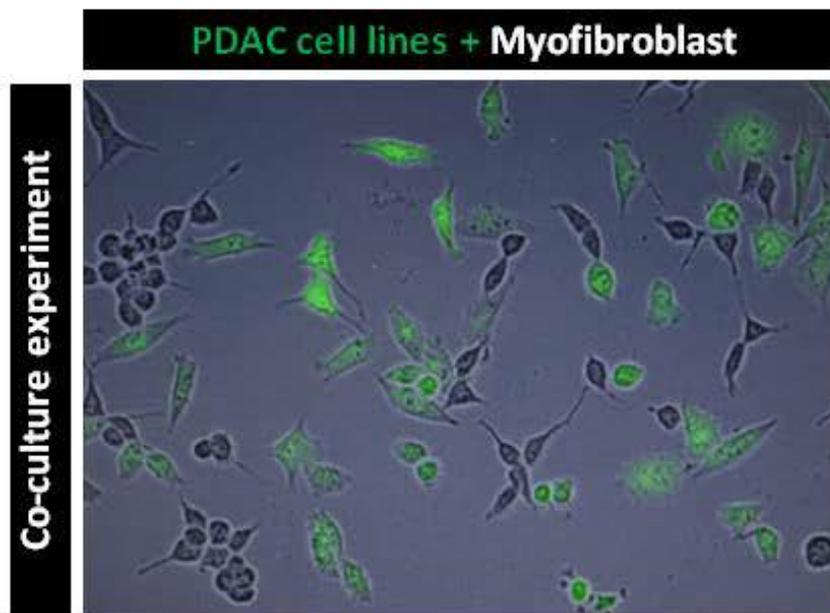


Figure 2 : Co-culture experiment of pancreatic tumor cell lines (MiaPaCa2) with myofibroblast. Cells were mixed on a ratio of 50/50% and tumor cell proliferation were assess through evaluation of GFP intensity of fluorescence

DISCUSSION GENERALE

Discussion

Comprendre la régulation de l'angiogenèse physiologique est une étape importante dans l'optique de trouver des traitements régulant positivement ou négativement l'angiogenèse chez les patients atteints de pathologies associées à un dérèglement de ce processus, tel que le cancer. Cette thèse avait pour objectif principal d'étudier l'implication de PRL-2 à des niveaux physiologiques dans le contexte de l'angiogenèse développementale à l'aide des souris *PRL-2* KO.

Les travaux effectués durant cette thèse ont permis de déterminer, pour la première fois, que PRL-2 est un médiateur essentiel de l'angiogenèse *in vivo et in vitro*. De plus, PRL-2 agit à différentes étapes du processus d'angiogenèse. Nous avons démontré son implication lors de la formation des bourgeons endothéliaux, de l'organisation du réseau vasculaire, ainsi que de la différenciation artério-veineuse.

I. PRL-2, un régulateur du bourgeonnement endothélial et de la voie de signalisation Notch lors du développement

Les travaux présentés dans le chapitre I associent, pour la première fois PRL-2 au phénomène de formation de nouveaux vaisseaux sanguins par bourgeonnement via la modulation de l'expression du ligand de Notch, Dll4. En effet, les souris *PRL-2* KO arborent un réseau vasculaire très dense au niveau de la rétine. Ce phénotype rappelle celui observé lors d'une altération de l'interaction entre Dll4 et son récepteur Notch-1, que ce soit par modification génétique (délétion de *Dll4* ou *Notch1*) ou pharmacologique par injection d'un inhibiteur de la γ -secretase (inhibant l'activation par clivage de Notch-1), ou d'un anticorps bloquant Dll4 ou Notch1. Afin de confirmer *in vivo* l'implication de Dll4 dans le phénotype arboré par les souris *PRL-2* KO, plusieurs expériences pourraient être effectuées. Par exemple, une injection intravitréenne d'un peptide de Dll4 afin d'observer une éventuelle restauration du phénotype.

Toutefois, les études réalisées *in vitro* ont montré que la diminution de l'expression de PRL-2 a, d'une part, des répercussions sur l'expression de Dll4, mais altère également le clivage, et donc l'activation de Notch après stimulation au Dll4. Ceci suggère une dualité découplée de l'action de PRL-2 qui agit à la fois sur l'expression du ligand *Dll4*, et également en aval, sur le processus d'activation de Notch1 (cf figure 7 papier I). Ainsi, la restauration *in vivo* d'un niveau physiologique de Dll4 ne devrait pas suffire à la récupération du phénotype sauvage. Il serait plus judicieux d'augmenter la forme active de Notch-1 dans les souris *PRL-2* KO. Pour cela, une stratégie pourrait être de croiser la souris *PRL-2* KO avec par exemple une souris qui sur-exprime la forme active de Notch dans l'endothélium *NICD^{IOEC/OEC}148*.

Au vu des résultats obtenus sur les cellules endothéliales *in vitro*, il semble clair que le phénotype observé chez les souris est, au moins en partie, la conséquence de la perte de PRL-2

dans les cellules endothéliales. Il est toutefois nécessaire de s'assurer de cela *in vivo*. En effet, les souris transgéniques de l'étude que nous avons présentée ici sont des souris délétées globalement pour PRL-2. Ainsi l'environnement autour des vaisseaux est également déficient pour PRL-2. Afin de déterminer l'implication des cellules endothéliales dans ce phénotype, nous sommes en train de générer la souris spécifiquement délétée au niveau de l'endothélium pour PRL-2. Pour cela, nous avons choisis de croiser la souris PRL-2^{flox/flox} avec la souris VE-Cadherine-CreERT2. Cette souris transgénique exprime une construction inducible composée du gène codant pour la recombinaison Cre sous contrôle des séquences régulatrices du gène codant pour la VE-cadhérine. Cette dernière est spécifiquement exprimée au niveau des cellules endothéliales après la naissance. Il existe d'autres modèles de souris transgéniques, mais notre choix s'est porté pour celle-ci qui est inducible. En effet, il a été montré que la VE-Cadhérine est exprimée par 50/60% des cellules hématopoïétiques durant le développement, mais cette expression est perdue après la naissance⁶²³. Le fait d'induire la construction par injection de tamoxifène après la naissance porte à 0.4% cette valeur.

Nous avons commencé les croisements de ces souris, cependant nous n'avons pas pu étudier leur réseau vasculaire rétinien suite à un délai de réception des souris. Toutefois, une nouvelle thésarde aura la chance d'étudier le réseau vasculaire de ces souris délétées spécifiquement pour PRL-2 pour compléter notre étude.

Mes travaux ont montré *in vitro* que la prolifération ne semble pas être affectée par la modulation de PRL-2. Il serait toutefois intéressant de vérifier cela *in vivo*. Une méthode pourrait être d'injecter du BrdU dans les souris. Le BrdU est un analogue de la thymidine qui est incorporé à l'ADN des cellules en réplication. Après marquage avec un anticorps BrdU, il serait ainsi possible de quantifier les cellules en prolifération.

II. PRL-2, un modulateur positif de la formation d'un réseau capillaire

Les travaux présentés ici ont démontré que, lors de la mise en place du réseau vasculaire rétinien, les souris *PRL-2* KO arborent une densité des capillaires augmentée, ainsi qu'un nombre de points de branchement plus élevé. Ceci suggère une altération des voies de signalisation orchestrant ce processus. Dans les cellules endothéliales, l'expression de PRL-2 promeut l'expression de Dll4 (papier I). De ce fait, PRL-2 agirait comme inhibiteur de la formation de bourgeons endothéliales et de branchements et modulerait ce processus pour empêcher une formation anarchique de vaisseaux sanguins.

Il est important de noter qu'une augmentation de la densité des capillaires ne corrèle pas forcément avec une augmentation de la fonctionnalité des vaisseaux rétiens. Bien souvent un réseau vasculaire dont la densité est augmentée par perte de communication efficace entre les cellules tip et stalk est composé de vaisseaux peu perfusés.

Cette analyse *in vivo* a été complétée par des études *in vitro* et notamment par la méthode d'invasion de cellules endothéliales avec le modèle des billes. Cette étude nous a permis de montrer une augmentation du nombre de structure vasculaire mais une diminution

de leurs longueurs. Ceci rappelle le phénotype retrouvé chez les souris, à savoir une augmentation de la densité mais une diminution du recouvrement vasculaire. Comme si cette formation excessive de vaisseaux n'atteignait pas son objectif, la perfusion de la rétine.

III. PRL-2 et formation de la lumière

Les structures vasculaires formées lors du modèle des billes *in vitro*, (papier I) nous apportent également une information complémentaire. En effet, la formation de la lumière de ces tubes vasculaires semble altérée. Comme nous avons vu dans l'introduction, cette étape s'effectue en arrière des tubes endothéliaux au fur et à mesure que ceux-ci s'allongent. Il a été montré que la phosphorylation des protéines d'un complexes nommé ERM (Ezrin, Radixin et Moesin) est nécessaire à la contraction vasculaire et la formation de la lumière^{156,160,161}. L'ERM forme des plateformes adaptatrices entre des protéines de la membrane plasmique et le cytosquelette intracellulaire.

Il est intéressant de noter que l'Ezrin a été proposée comme substrat direct de PRL-3⁵⁰⁵. En effet, l'équipe du docteur Tomei a montré que PRL-3 pouvait déphosphoryler le site Thr567 de l'Ezrin *in vitro*⁵⁰⁵. D'autre part, les auteurs ont démontré ce phénomène dans des cellules HUVECs. Il serait ainsi intéressant de poursuivre dans cette voie et d'étudier l'implication de PRL-2 dans le processus de formation de la lumière.

IV. Nouveaux concepts de la différenciation artério-veineuse via les phosphatases PRL2

Au cours de cette thèse, nous avons pu établir un phénotype très fort au niveau de la différenciation artérioveineuse. En effet, comme présenté dans l'article I, les souris déficientes pour PRL-2 présentent un nombre de veines et d'artères plus faible que les souris contrôles issues de la même portée. Dans l'angiogenèse développementale, une des voies essentielles pour cette différenciation est la voie DLL4/Notch1 et nous avons pu montrer un défaut dans l'activation de Notch1 lorsque PRL-2 est inhibée.

Plusieurs équipes, dont celle de Christer Betsholtz, ont pu montrer que l'activation de VEGFR2 dans les cellules tip entraînait l'activation de DLL4 et de Notch dans les cellules stalk^{101,108,109,111,113,186,190}. Nous avons alors pensé que le défaut du clivage de Notch dans les souris déficientes pour PRL-2 était une conséquence du défaut d'activation du VEGFR2-Y1175. Cependant, nous avons pu montrer que ce défaut persistait, même lors d'une activation constitutive de DLL4 qui se trouve en aval de l'action de PRL-2 sur le VEGFR2. Ainsi, nous pouvons conclure que le rôle de PRL-2 dans le développement vasculaire est double. En plus de son action dans l'activation de VEGFR2, il permet la bonne régulation du clivage de Notch1 par un mécanisme encore inconnu. Ce clivage, permet la libération du NICD qui après translocation dans le noyau favorise l'expression du facteur de transcription HEY2, régulant la différenciation artério-veineuse. De manière intéressante, HEY1 n'est pas modifié selon l'expression de PRL-2. De nombreuses études présentent des mécanismes de régulation de HEY1 ou de HEY2 de manière distinctes²³⁷. Dans notre cas, nous proposons un mécanisme spécifique de régulation

de HEY2, entraînant des anomalies de différenciation artério-veineuses. Ceci est en accord notamment avec l'équipe du docteur Manfred Gessler dont les études sur Notch montrent que la famille Hey joue un rôle primordial dans le développement vasculaire et la différenciation artérielle¹³¹.

Des études suggèrent que HEY1 serait un senseur bien plus sensible à l'activation DLL4/Notch que HEY2. Ceci pourrait expliquer les différences d'activation d'HEY1 et HEY2⁶²⁴.

Nous avons voulu élucider les mécanismes sous-jacents expliquant ce défaut de l'activation de Notch. Nous avons pu montrer que la forme de NCID issue du clivage de Notch était fortement diminuée lors d'une diminution de l'expression de PRL-2. Le NCID se forme après clivage de l'acide aminé Valine en position 1744, qui s'effectue par une enzyme particulière: la γ -secretase. Une étude du docteur Geneviève Evin démontre que le calcium, ainsi que le magnésium, cofacteur essentiel de nombreuses enzymes, pourraient également stabiliser la γ -secretase et augmenter son activité⁶²⁵. De plus, comme expliqué dans l'introduction, une équipe de mon laboratoire à Montréal a pu récemment montrer que PRL-2 formait un hétérodimère fonctionnel avec le transporteur de magnésium CNNM3⁴⁷⁰. Une déplétion de magnésium *in vitro* entraîne une augmentation de la formation de ce complexe. PRL-2, en plus de son rôle sur VEGFR2-Y1175, pourrait ainsi réguler le processus d'activation de Notch-1 via un changement d'activité du récepteur CNNM3 et une modulation du magnésium intracellulaire. Cependant, nos premières expériences *in vitro* semblent montrer que le magnésium intracellulaire n'est pas modulé pas la diminution de PRL-2 dans les cellules endothéliales.

Enfin, nos résultats *in vitro* ont montré que 1) le niveau d'expression de Dll4, 2) l'activation de Notch en réponse au VEGF, 3) l'induction de la signalisation de ERK via le résidu Y1175 de VEGFR-2 sont modulés par PRL-2. Il est connu que la voie Notch est impliquée dans la spécification artérielle via l'inhibition de devenir veineux. De la même manière, l'activation de ERK par VEGF est critique dans le processus de formation d'artères²³³.

Ainsi, lors de l'inhibition de Notch et de la signalisation ERK, on s'attend à une diminution du nombre d'artères, mais une augmentation du nombre de veines. Ici, le nombre des veines est également diminué lors d'une inhibition de PRL-2, ce qui sous-entend un mécanisme plus complexe que le modèle connu sur Notch, pouvant impliquer d'autres acteurs de la différenciation artério-veineuse.

V. Mécanismes sous-jacents pouvant être impliqués dans le phénotype observé lors d'une diminution de PRL-2.

L'étude de PRL-2 a permis de mettre en évidence son rôle dans plusieurs processus du développement vasculaire, mais l'étude de certains de ces mécanismes sous-jacents reste toutefois encore à approfondir.

Une caractéristique unique qui différencie les PRLs de toutes les autres PTPs est la présence d'un motif de prénylation dans son domaine C-terminal^{462,481}. Ce motif peut être modifié post traditionnellement, ce qui augmente l'hydrophobicité de ces protéines et facilite leur localisation vers la membrane plasmique. Ainsi, les PRLs pourraient avoir un adressage et

un trafic vésiculaire bien spécifique pouvant expliquer leurs activités. La localisation membranaire de PRL-2 pourrait avoir un lien avec son effet sur l'activation de VEGFR-2. En effet, ce dernier pourrait former un complexe avec PRL-2, ce qui modulerait son activité. De telles interactions entre VEGFR-2 et des phosphatases ont été mises en évidence et sont primordiales pour certaines phosphatases telles que VE-PTP. Pour vérifier cela, j'ai effectué des immunoprécipitations contre VEGFR-2 en condition stimulée ou non par le VEGF, et j'ai analysé la présence de PRL-2 dans le complexe de VEGFR-2. Aucune interaction physique n'a pu être mise en évidence entre les deux protéines, excluant l'hypothèse selon laquelle PRL-2 pourrait « protéger » le site Y1175 du VEGFR-2 de sa déphosphorylation (figure 57).

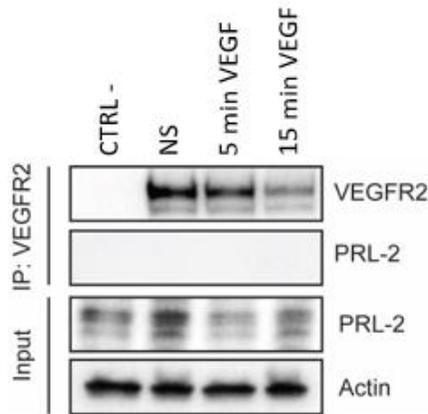


FIGURE 57. Immunoprécipitation (ip) de VEGFR-2 de cellules HUVECs stimulés ou non par VEGF suivi par un Western Blot pour analyser la présence ou non de PRL-2 dans le complexe.

PRL-2 pourrait cependant influencer le trafic vésiculaire de VEGFR-2. En effet, il a été montré que l'internalisation de ce récepteur était essentiel pour l'activation de la signalisation de ERK via la phosphorylation de Y1175³⁶⁶. Ainsi, en modulant le trafic de VEGFR-2, l'activation de la voie de signalisation ERK se trouve être abrogée, et PRL-2 pourrait être un nouveau composant de la machinerie d'internalisation du VEGFR-2.

VI. Les PTPs dans la régulation de l'angiogenèse et la progression tumorale

Mon principal travail de thèse a été centré sur le rôle de PRL-2 dans le développement vasculaire physiologique. Cependant, j'ai également pu débiter l'étude de certaines PTPs dans l'angiogenèse pathologique. Je me suis concentrée sur l'étude des PTPs dans un type de cancer primitif du cerveau: le glioblastome. Le concept d'angiogenèse tumorale et d'inhibition thérapeutique de cette dernière remonte aux travaux de Judah Folkmann⁷². Nous avons choisi d'étudier spécifiquement les glioblastomes car ils font partie des tumeurs les plus vascularisées⁶⁰¹. Ce modèle est de ce fait fréquemment utilisé pour la recherche de nouveaux biomarqueurs permettant de moduler l'angiogenèse.

Nous avons pu montrer que l'expression de PRL-2 était un facteur pronostic significatif pour la survie des patients atteints de gliomes, principalement de grade II ou III. Ceci est en accord avec de nombreuses équipes montrant les propriétés oncogéniques des PRL dans de nombreux cancers. En effet, La surexpression des PRLs est fréquemment retrouvée dans de nombreuses lignées cellulaires tumorales, et présente une prolifération, une migration et une invasion cellulaire augmentée^{459,461,518-520}. Ainsi, en plus du rôle de PRL-2 dans le développement vasculaire, il pourrait aussi agir en tant que protéine oncogénique dans de nombreux cancers, et ceci via son rôle dans l'angiogenèse, et potentiellement sur l'activation du VEGFR2.

J'ai également pu travailler sur une autre PTPs, PTPRS dans le cadre du glioblastome. L'équipe du docteur Angenendt a pu montrer que l'expression de PTPRS était fortement diminuée dans les glioblastomes⁶¹¹. De manière intéressante, il a été montré que l'expression de PTPRS pouvait contrôler l'activité d'un récepteur tyrosine kinase oncogénique: L'EGFR⁶¹⁰. J'ai pu montrer, par analyse de la base de données TCGA, que l'expression de PTPRS était un facteur pronostic favorable et significatif sur la survie des patients atteints de glioblastomes. Cependant, nos expériences *in vitro* sur la formation et l'invasion de sphéroïdes composés de cellules tumorales ont montré que la diminution de PTPRS par différent Sh-ARN, entraînait une inhibition de l'invasion des cellules tumorales. Ce résultat qui semble au premier abord contradictoire avec les résultats bioinformatiques pourrait s'expliquer par le fait que l'invasion des cellules est un mécanisme critique sur l'apparition des récidives, mais que la cause primaire de mortalité est la formation d'une masse tumorale compacte faisant pression sur des zones essentielles du cerveau. En effet, cette masse primaire cause de nombreux troubles, tels que des troubles cognitifs, des crises d'épilepsies, une apparition d'aphasie, une paralysie motrice, des maux de tête ou encore des hémorragies cérébrales. Les symptômes les plus fréquents sont les troubles cognitifs et épileptiques⁶²⁶, et sont présents chez plus de 50% des patients atteints d'un gliome. Les glioblastomes sont des cancers très agressifs justement car les patients meurent en premier de la masse primaire dense, sans que presque aucune métastase n'ait pu encore se développer. Cependant, on rappelle que l'invasion des cellules dans le parenchyme cérébral induit, quant à lui, une récidive des patients après chirurgie et traitement.

Ainsi, la diminution de l'expression de PTPRS, en plus d'induire une hyper-activation de l'EGFR oncogénique, semble aussi impliquée dans la prolifération et la progression de la tumeur primaire, concourant à une espérance de vie diminuée des patients sans traitement, comme nous avons pu le montrer sur les résultats bioinformatiques issus du TCGA.

Conclusion générale sur les phosphatases PTP et angiogenèse physiopathologique

Au début de cette thèse, j'ai majoritairement étudié le rôle d'une PTP très particulière, PRL-2, dans la morphogenèse vasculaire. En utilisant à la fois plusieurs modèles *in vitro* et un modèle de souris dans laquelle PRL2 est diminué, j'ai pu démontrer le rôle essentiel et intrigant de PRL-2 sur l'activation de VEGFR2 ainsi que sur la différenciation artério-veineuse. Notre étude décrit pour la première fois, le rôle d'une PTP dans le maintien direct du site de phosphorylation Y1175 du VEGFR2.

Dans un contexte pathologique tumoral, nous avons pu montrer que PRL-2 était un facteur pronostic dans la survie des patients atteints d'un glioblastome. De plus, nous avons pu étudier l'implication fonctionnelle d'une autre PTP, PTPsigma.

J'ai pu, tout au long de cette thèse, mener de front de nombreuses expériences sur de nombreux modèles *in vitro* comme *in vivo*, nous permettant de mieux comprendre la biologie et l'implication pathologique de ces PTP.

Ce projet s'inscrit dans une dynamique globale réalisée par la collaboration internationale de deux laboratoires, situés à Bordeaux et Montréal. De nombreux projets ont pu émerger suite aux travaux présentés précédemment, et dans lesquels je participe pleinement. Une bourse de thèse a pu être obtenue, en co-tutelle entre ces deux laboratoires, afin de poursuivre ce projet sur l'implication dans la progression tumorale du glioblastome que j'ai pu initier. Continuer et approfondir l'étude de des mécanismes d'actions de PRL-2 et de ses partenaires nous permettraient de mieux appréhender la régulation de son activité et de ses fonctions biologiques ainsi que pathologiques.

Bibliographie

- 1 Eichmann, A.Pardanaud, L. in *Molecular Mechanisms of Angiogenesis: From Ontogenesis to Oncogenesis* (eds Jean-Jacques Feige, Gilles Pagès, & Fabrice Soncin) 3-23 (Springer Paris, 2014).
- 2 Semenza, G. L. Vasculogenesis, angiogenesis, and arteriogenesis: mechanisms of blood vessel formation and remodeling. *J Cell Biochem* **102**, 840-847, (2007).
- 3 Swift, M. R.Weinstein, B. M. Arterial-venous specification during development. *Circ Res* **104**, 576-588, (2009).
- 4 Dejana, E., Hirschi, K. K.Simons, M. The molecular basis of endothelial cell plasticity. *Nat Commun* **8**, 14361, (2017).
- 5 Potente, M.Makinen, T. Vascular heterogeneity and specialization in development and disease. *Nature reviews. Molecular cell biology* **18**, 477-494, (2017).
- 6 Davis, E. C. Endothelial cell connecting filaments anchor endothelial cells to the subjacent elastic lamina in the developing aortic intima of the mouse. *Cell Tissue Res* **272**, 211-219, (1993).
- 7 Bikfalvi, A. History and conceptual developments in vascular biology and angiogenesis research: a personal view. *Angiogenesis* **20**, 463-478, (2017).
- 8 Vracko, R. Basal lamina scaffold-anatomy and significance for maintenance of orderly tissue structure. *Am J Pathol* **77**, 314-346, (1974).
- 9 Kalluri, R. Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. *Nature reviews. Cancer* **3**, 422-433, (2003).
- 10 Aird, W. C. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms. *Circ Res* **100**, 158-173, (2007).
- 11 Wisse, E. An electron microscopic study of the fenestrated endothelial lining of rat liver sinusoids. *J Ultrastruct Res* **31**, 125-150, (1970).
- 12 Fischer, C., Schneider, M.Carmeliet, P. Principles and therapeutic implications of angiogenesis, vasculogenesis and arteriogenesis. *Handb Exp Pharmacol*, 157-212, (2006).
- 13 Armulik, A., Genove, G.Betsholtz, C. Pericytes: developmental, physiological, and pathological perspectives, problems, and promises. *Dev Cell* **21**, 193-215, (2011).
- 14 Gerhardt, H.Betsholtz, C. Endothelial-pericyte interactions in angiogenesis. *Cell Tissue Res* **314**, 15-23, (2003).
- 15 Mathiisen, T. M., Lehre, K. P., Danbolt, N. C.Ottersen, O. P. The perivascular astroglial sheath provides a complete covering of the brain microvessels: an electron microscopic 3D reconstruction. *Glia* **58**, 1094-1103, (2010).
- 16 Shen, E. M.McCloskey, K. E. Development of Mural Cells: From In Vivo Understanding to In Vitro Recapitulation. *Stem Cells Dev* **26**, 1020-1041, (2017).
- 17 Etchevers, H. C., Vincent, C., Le Douarin, N. M.Couly, G. F. The cephalic neural crest provides pericytes and smooth muscle cells to all blood vessels of the face and forebrain. *Development* **128**, 1059-1068, (2001).
- 18 Korn, J., Christ, B.Kurz, H. Neuroectodermal origin of brain pericytes and vascular smooth muscle cells. *The Journal of comparative neurology* **442**, 78-88, (2002).
- 19 Wilm, B., Ipenberg, A., Hastie, N. D., Burch, J. B.Bader, D. M. The serosal mesothelium is a major source of smooth muscle cells of the gut vasculature. *Development* **132**, 5317-5328, (2005).

- 20 Que, J., Wilm, B., Hasegawa, H., Wang, F., Bader, D., Hogan, B. L. Mesothelium contributes to vascular smooth muscle and mesenchyme during lung development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 16626-16630, (2008).
- 21 Adams, R. H., Alitalo, K. Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nature reviews. Molecular cell biology* **8**, 464-478, (2007).
- 22 Jain, R. K. Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med* **9**, 685-693, (2003).
- 23 Schwartz, S. M., Benditt, E. P. Studies on aortic intima. I. Structure and permeability of rat thoracic aortic intima. *Am J Pathol* **66**, 241-264, (1972).
- 24 Di Wang, H., Ratsep, M. T., Chapman, A., Boyd, R. Adventitial fibroblasts in vascular structure and function: the role of oxidative stress and beyond. *Can J Physiol Pharmacol* **88**, 177-186, (2010).
- 25 Stefanovic, B., Hutchinson, E., Yakovleva, V., Schram, V., Russell, J. T., Belluscio, L., . . . Silva, A. C. Functional reactivity of cerebral capillaries. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* **28**, 961-972, (2008).
- 26 R.F. Schmidt, G., Thews, eds. *Human Physiology*. (Springer Berlin Heidelberg, 1989).
- 27 Teichert, M., Milde, L., Holm, A., Stanicek, L., Gengenbacher, N., Savant, S., . . . Augustin, H. G. Pericyte-expressed Tie2 controls angiogenesis and vessel maturation. *Nat Commun* **8**, 16106, (2017).
- 28 Yancopoulos, G. D., Davis, S., Gale, N. W., Rudge, J. S., Wiegand, S. J., Holash, J. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* **407**, 242, (2000).
- 29 Carmeliet, P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* **6**, 389-395, (2000).
- 30 Lenzi, P., Bocci, G., Natale, G. John Hunter and the origin of the term "angiogenesis". *Angiogenesis* **19**, 255-256, (2016).
- 31 Forrester, J. V., Dick, A. D., McMenamin, P. G., Roberts, F., Pearlman, E. in *The Eye (Fourth Edition)* 1-102.e102 (W.B. Saunders, 2016).
- 32 Land, M. F. *The Eye: A Very Short Introduction*. (OUP Oxford, 2014).
- 33 Remington, L. A. in *Clinical Anatomy and Physiology of the Visual System (Third Edition)* 61-92 (Butterworth-Heinemann, 2012).
- 34 Gregg, R. G., McCall, M. A., Massey, S. C. in *Retina (Fifth Edition)* (eds Srinivas R. Sadda et al.) 360-400 (W.B. Saunders, 2013).
- 35 R., A.D., J. *Rapid Diagnosis in Ophthalmology Series: Retina 1st Edition*. (Mosby, 2008).
- 36 Whiteley, H. E., Peiffer, R. L. in *Handbook of Toxicologic Pathology (Second Edition)* (eds Colin G. Rousseaux & Matthew A. Wallig) 539-584 (Academic Press, 2002).
- 37 Wassle, H., Riemann, H. J. The Mosaic of Nerve Cells in the Mammalian Retina. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences* **200**, 441-461, (1978).
- 38 Purves D, A. G. J. F. D. e. et al. *Neuroscience. 2nd edition*. (Sunderland (MA): Sinauer Associates, 2001).
- 39 Ye, X., Wang, Y., Nathans, J. The Norrin/Frizzled4 signaling pathway in retinal vascular development and disease. *Trends Mol Med* **16**, 417-425, (2010).
- 40 Forrester, J. V., Dick, A. D., McMenamin, P. G., Roberts, F., Pearlman, E. in *The Eye (Fourth Edition)* 103-129.e108 (W.B. Saunders, 2016).
- 41 Mauch, T. J., Schoenwolf, G. C. *Developmental Biology. Sixth Edition*. By Scott F. Gilbert. *American Journal of Medical Genetics* **99**, 170-171, (2001).
- 42 Lamb, T. D., Collin, S. P., Pugh, E. N., Jr. Evolution of the vertebrate eye: opsins, photoreceptors, retina and eye cup. *Nature reviews. Neuroscience* **8**, 960-976, (2007).
- 43 Moore, K. L., Persaud, T. V. N. *Before We Are Born: Basic Embryology and Birth Defects*. (Saunders, 1993).

- 44 Park, B. Y. Saint-Jeannet, J. P. in *Induction and Segregation of the Vertebrate Cranial Placodes* (Morgan & Claypool Life Sciences Copyright (c) 2010 by Morgan & Claypool Life Sciences., 2010).
- 45 Heavner, W. Pevny, L. Eye development and retinogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **4**, (2012).
- 46 Gariano, R. F. Special features of human retinal angiogenesis. *Eye* **24**, 401, (2010).
- 47 Yoshikawa, Y., Yamada, T., Tai-Nagara, I., Okabe, K., Kitagawa, Y., Ema, M. Kubota, Y. Developmental regression of hyaloid vasculature is triggered by neurons. *The Journal of Experimental Medicine* **213**, 1175-1183, (2016).
- 48 Stahl, A., Connor, K. M., Sapieha, P., Chen, J., Dennison, R. J., Krah, N. M., . . . Smith, L. E. The mouse retina as an angiogenesis model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **51**, 2813-2826, (2010).
- 49 Luttj, G. A., Hasegawa, T., Baba, T., Grebe, R., Bhutto, I. McLeod, D. S. Development of the human choriocapillaris. *Eye* **24**, 408, (2010).
- 50 Milde, F., Lauw, S., Koumoutsakos, P. Iruela-Arispe, M. L. The mouse retina in 3D: quantification of vascular growth and remodeling. *Integr Biol (Camb)* **5**, 1426-1438, (2013).
- 51 Fruttiger, M. Development of the mouse retinal vasculature: angiogenesis versus vasculogenesis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **43**, 522-527, (2002).
- 52 Rao, S., Chun, C., Fan, J., Kofron, J. M., Yang, M. B., Hegde, R. S., . . . Lang, R. A. A direct and melanopsin-dependent fetal light response regulates mouse eye development. *Nature* **494**, 243, (2013).
- 53 Fruttiger, M. Development of the retinal vasculature. *Angiogenesis* **10**, 77-88, (2007).
- 54 Gerhardt, H., Golding, M., Fruttiger, M., Ruhrberg, C., Lundkvist, A., Abramsson, A., . . . Betsholtz, C. VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *The Journal of cell biology* **161**, 1163-1177, (2003).
- 55 Gariano, R. F. Gardner, T. W. Retinal angiogenesis in development and disease. *Nature* **438**, 960-966, (2005).
- 56 Caduff, J. H., Fischer, L. C. Burri, P. H. Scanning electron microscope study of the developing microvasculature in the postnatal rat lung. *The Anatomical Record* **216**, 154-164, (1986).
- 57 Burri, P. H., Hlushchuk, R. Djonov, V. Intussusceptive angiogenesis: its emergence, its characteristics, and its significance. *Dev Dyn* **231**, 474-488, (2004).
- 58 Hlushchuk, R., Riesterer, O., Baum, O., Wood, J., Gruber, G., Pruschy, M. Djonov, V. Tumor recovery by angiogenic switch from sprouting to intussusceptive angiogenesis after treatment with PTK787/ZK222584 or ionizing radiation. *Am J Pathol* **173**, 1173-1185, (2008).
- 59 Patan, S., Munn, L. L. Jain, R. K. Intussusceptive microvascular growth in a human colon adenocarcinoma xenograft: a novel mechanism of tumor angiogenesis. *Microvasc Res* **51**, 260-272, (1996).
- 60 De Spiegelaere, W., Casteleyn, C., Van den Broeck, W., Plendl, J., Bahramsoltani, M., Simoens, P., . . . Cornillie, P. Intussusceptive angiogenesis: a biologically relevant form of angiogenesis. *J Vasc Res* **49**, 390-404, (2012).
- 61 Geudens, I. Gerhardt, H. Coordinating cell behaviour during blood vessel formation. *Development* **138**, 4569-4583, (2011).
- 62 Eming, S. A., Brachvogel, B., Odorisio, T. Koch, M. Regulation of angiogenesis: wound healing as a model. *Prog Histochem Cytochem* **42**, 115-170, (2007).
- 63 Modlich, U., Kaup, F. J. Augustin, H. G. Cyclic angiogenesis and blood vessel regression in the ovary: blood vessel regression during luteolysis involves endothelial cell detachment and vessel occlusion. *Lab Invest* **74**, 771-780, (1996).
- 64 Clapp, C., Thebault, S., Jeziorski, M. C. Martinez De La Escalera, G. Peptide hormone regulation of angiogenesis. *Physiol Rev* **89**, 1177-1215, (2009).

- 65 Olfert, I. M. Birot, O. Importance of anti-angiogenic factors in the regulation of skeletal muscle angiogenesis. *Microcirculation* **18**, 316-330, (2011).
- 66 Denekamp, J. Vascular endothelium as the vulnerable element in tumours. *Acta Radiol Oncol* **23**, 217-225, (1984).
- 67 Augustin, H. G., Kozian, D. H. Johnson, R. C. Differentiation of endothelial cells: analysis of the constitutive and activated endothelial cell phenotypes. *Bioessays* **16**, 901-906, (1994).
- 68 Murakami, M. Signaling required for blood vessel maintenance: molecular basis and pathological manifestations. *Int J Vasc Med* **2012**, 293641, (2012).
- 69 Hanahan, D. Folkman, J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* **86**, 353-364, (1996).
- 70 Folkman, J. Hanahan, D. Switch to the angiogenic phenotype during tumorigenesis. *Princess Takamatsu Symp* **22**, 339-347, (1991).
- 71 Gimbrone, M. A., Jr., Leapman, S. B., Cotran, R. S. Folkman, J. Tumor dormancy in vivo by prevention of neovascularization. *J Exp Med* **136**, 261-276, (1972).
- 72 Folkman, J., Merler, E., Abernathy, C. Williams, G. Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis. *J Exp Med* **133**, 275-288, (1971).
- 73 Franco, C. A. Gerhardt, H. Blood flow boosts BMP signaling to keep vessels in shape. *The Journal of cell biology* **214**, 793-795, (2016).
- 74 Baeyens, N. Schwartz, M. A. Biomechanics of vascular mechanosensation and remodeling. *Mol Biol Cell* **27**, 7-11, (2016).
- 75 Dejana, E. Endothelial cell-cell junctions: happy together. *Nature reviews. Molecular cell biology* **5**, 261-270, (2004).
- 76 Maisonpierre, P. C., Suri, C., Jones, P. F., Bartunkova, S., Wiegand, S. J., Radziejewski, C., . . . Yancopoulos, G. D. Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science* **277**, 55-60, (1997).
- 77 Arroyo, A. G. Iruela-Arispe, M. L. Extracellular matrix, inflammation, and the angiogenic response. *Cardiovasc Res* **86**, 226-235, (2010).
- 78 Breuss, J. M. Uhrin, P. VEGF-initiated angiogenesis and the uPA/uPAR system. *Cell Adh Migr* **6**, 535-615, (2012).
- 79 Salame, M. Y., Samani, N. J., Masood, I. deBono, D. P. Expression of the plasminogen activator system in the human vascular wall. *Atherosclerosis* **152**, 19-28, (2000).
- 80 del Toro, R., Prahst, C., Mathivet, T., Siegfried, G., Kaminker, J. S., Larrivee, B., . . . Eichmann, A. Identification and functional analysis of endothelial tip cell-enriched genes. *Blood* **116**, 4025-4033, (2010).
- 81 Svitkina, T. M., Bulanova, E. A., Chaga, O. Y., Vignjevic, D. M., Kojima, S., Vasiliev, J. M. Borisov, G. G. Mechanism of filopodia initiation by reorganization of a dendritic network. *The Journal of cell biology* **160**, 409-421, (2003).
- 82 Carmeliet, P., De Smet, F., Loges, S. Mazzone, M. Branching morphogenesis and antiangiogenesis candidates: tip cells lead the way. *Nat Rev Clin Oncol* **6**, 315-326, (2009).
- 83 Carmeliet, P., Ferreira, V., Breier, G., Pollefeyt, S., Kieckens, L., Gertsenshtein, M., . . . Nagy, A. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* **380**, 435-439, (1996).
- 84 Ferrara, N., Carver-Moore, K., Chen, H., Dowd, M., Lu, L., O'Shea, K. S., . . . Moore, M. W. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* **380**, 439-442, (1996).
- 85 Shalaby, F., Rossant, J., Yamaguchi, T. P., Gertsenshtein, M., Wu, X. F., Breitman, M. L. Schuh, A. C. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature* **376**, 62-66, (1995).

- 86 Fong, G. H., Rossant, J., Gertsenstein, M. Breitman, M. L. Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature* **376**, 66-70, (1995).
- 87 Dumont, D. J., Jussila, L., Taipale, J., Lymboussaki, A., Mustonen, T., Pajusola, K., . . . Alitalo, K. Cardiovascular failure in mouse embryos deficient in VEGF receptor-3. *Science* **282**, 946-949, (1998).
- 88 Artavanis-Tsakonas, S., Matsuno, K. Fortini, M. E. Notch signaling. *Science* **268**, 225-232, (1995).
- 89 Hofmann, J. J. Iruela-Arispe, M. L. Notch signaling in blood vessels: who is talking to whom about what? *Circ Res* **100**, 1556-1568, (2007).
- 90 Dufraigne, J., Funahashi, Y. Kitajewski, J. Notch signaling regulates tumor angiogenesis by diverse mechanisms. *Oncogene* **27**, 5132-5137, (2008).
- 91 Iso, T., Hamamori, Y. Kedes, L. Notch signaling in vascular development. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **23**, 543-553, (2003).
- 92 Swiatek, P. J., Lindsell, C. E., del Amo, F. F., Weinmaster, G. Gridley, T. Notch1 is essential for postimplantation development in mice. *Genes & development* **8**, 707-719, (1994).
- 93 Conlon, R. A., Reaume, A. G. Rossant, J. Notch1 is required for the coordinate segmentation of somites. *Development* **121**, 1533-1545, (1995).
- 94 Limbourg, F. P., Takeshita, K., Radtke, F., Bronson, R. T., Chin, M. T. Liao, J. K. Essential role of endothelial Notch1 in angiogenesis. *Circulation* **111**, 1826-1832, (2005).
- 95 Krebs, L. T., Xue, Y., Norton, C. R., Shutter, J. R., Maguire, M., Sundberg, J. P., . . . Gridley, T. Notch signaling is essential for vascular morphogenesis in mice. *Genes & development* **14**, 1343-1352, (2000).
- 96 Lin, A. E., Westgate, M. N., van der Velde, M. E., Lacro, R. V. Holmes, L. B. Adams-Oliver syndrome associated with cardiovascular malformations. *Clin Dysmorphol* **7**, 235-241, (1998).
- 97 Algaze, C., Esplin, E. D., Lowenthal, A., Hudgins, L., Tacy, T. A. Selamet Tierney, E. S. Expanding the phenotype of cardiovascular malformations in Adams-Oliver syndrome. *American journal of medical genetics. Part A* **161a**, 1386-1389, (2013).
- 98 Stittrich, A. B., Lehman, A., Bodian, D. L., Ashworth, J., Zong, Z., Li, H., . . . Patel, M. S. Mutations in NOTCH1 cause Adams-Oliver syndrome. *American journal of human genetics* **95**, 275-284, (2014).
- 99 Phng, L. K. Gerhardt, H. Angiogenesis: a team effort coordinated by notch. *Dev Cell* **16**, 196-208, (2009).
- 100 Favre, C. J., Mancuso, M., Maas, K., McLean, J. W., Baluk, P. McDonald, D. M. Expression of genes involved in vascular development and angiogenesis in endothelial cells of adult lung. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* **285**, H1917-1938, (2003).
- 101 Benedito, R. Duarte, A. Expression of Dll4 during mouse embryogenesis suggests multiple developmental roles. *Gene expression patterns : GEP* **5**, 750-755, (2005).
- 102 Duarte, A., Hirashima, M., Benedito, R., Trindade, A., Diniz, P., Bekman, E., . . . Rossant, J. Dosage-sensitive requirement for mouse Dll4 in artery development. *Genes & development* **18**, 2474-2478, (2004).
- 103 Gale, N. W., Dominguez, M. G., Noguera, I., Pan, L., Hughes, V., Valenzuela, D. M., . . . Yancopoulos, G. D. Haploinsufficiency of delta-like 4 ligand results in embryonic lethality due to major defects in arterial and vascular development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 15949-15954, (2004).
- 104 Xue, Y., Gao, X., Lindsell, C. E., Norton, C. R., Chang, B., Hicks, C., . . . Gridley, T. Embryonic lethality and vascular defects in mice lacking the Notch ligand Jagged1. *Hum Mol Genet* **8**, 723-730, (1999).

- 105 Liu, H., Kennard, S., Lilly, B. NOTCH3 expression is induced in mural cells through an autoregulatory loop that requires endothelial-expressed JAGGED1. *Circ Res* **104**, 466-475, (2009).
- 106 Yavropoulou, M., P.Yovos, J. G. The role of Notch signaling in bone development and disease. *Hormones (Athens)* **13**, 24-37, (2014).
- 107 Mumm, J. S., Kopan, R. Notch signaling: from the outside in. *Dev Biol* **228**, 151-165, (2000).
- 108 van Tetering, G., Vooijs, M. Proteolytic cleavage of Notch: "HIT and RUN". *Curr Mol Med* **11**, 255-269, (2011).
- 109 Hellstrom, M., Phng, L. K., Hofmann, J. J., Wallgard, E., Coultas, L., Lindblom, P., . . . Betsholtz, C. Dll4 signalling through Notch1 regulates formation of tip cells during angiogenesis. *Nature* **445**, 776-780, (2007).
- 110 Iso, T., Kedes, L., Hamamori, Y. HES and HERP families: multiple effectors of the Notch signaling pathway. *J Cell Physiol* **194**, 237-255, (2003).
- 111 Jakobsson, L., Franco, C. A., Bentley, K., Collins, R. T., Ponsioen, B., Aspalter, I. M., . . . Gerhardt, H. Endothelial cells dynamically compete for the tip cell position during angiogenic sprouting. *Nat Cell Biol* **12**, 943-953, (2010).
- 112 Harrington, L. S., Sainson, R. C., Williams, C. K., Taylor, J. M., Shi, W., Li, J. L., Harris, A. L. Regulation of multiple angiogenic pathways by Dll4 and Notch in human umbilical vein endothelial cells. *Microvasc Res* **75**, 144-154, (2008).
- 113 Suchting, S., Freitas, C., le Noble, F., Benedito, R., Breant, C., Duarte, A., Eichmann, A. The Notch ligand Delta-like 4 negatively regulates endothelial tip cell formation and vessel branching. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 3225-3230, (2007).
- 114 Shawber, C. J., Funahashi, Y., Francisco, E., Vorontchikhina, M., Kitamura, Y., Stowell, S. A., . . . Kitajewski, J. Notch alters VEGF responsiveness in human and murine endothelial cells by direct regulation of VEGFR-3 expression. *The Journal of clinical investigation* **117**, 3369-3382, (2007).
- 115 Lobov, I. B., Renard, R. A., Papadopoulos, N., Gale, N. W., Thurston, G., Yancopoulos, G. D., Wiegand, S. J. Delta-like ligand 4 (Dll4) is induced by VEGF as a negative regulator of angiogenic sprouting. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 3219-3224, (2007).
- 116 Liu, Z. J., Shirakawa, T., Li, Y., Soma, A., Oka, M., Dotto, G. P., . . . Herlyn, M. Regulation of Notch1 and Dll4 by vascular endothelial growth factor in arterial endothelial cells: implications for modulating arteriogenesis and angiogenesis. *Mol Cell Biol* **23**, 14-25, (2003).
- 117 Noguera-Troise, I., Daly, C., Papadopoulos, N. J., Coetzee, S., Boland, P., Gale, N. W., . . . Thurston, G. Blockade of Dll4 inhibits tumour growth by promoting non-productive angiogenesis. *Nature* **444**, 1032-1037, (2006).
- 118 Patel, N. S., Li, J. L., Generali, D., Poulson, R., Cranston, D. W., Harris, A. L. Up-regulation of delta-like 4 ligand in human tumor vasculature and the role of basal expression in endothelial cell function. *Cancer Res* **65**, 8690-8697, (2005).
- 119 Lewis, J. Notch signalling and the control of cell fate choices in vertebrates. *Seminars in cell & developmental biology* **9**, 583-589, (1998).
- 120 Lu, X., le Noble, F., Yuan, L., Jiang, Q., De Lafarge, B., Sugiyama, D., . . . Eichmann, A. The netrin receptor UNC5B mediates guidance events controlling morphogenesis of the vascular system. *Nature* **432**, 179-186, (2004).
- 121 Gerhardt, H., Ruhrberg, C., Abramsson, A., Fujisawa, H., Shima, D., Betsholtz, C. Neuropilin-1 is required for endothelial tip cell guidance in the developing central nervous system. *Dev Dyn* **231**, 503-509, (2004).
- 122 Yana, I., Sagara, H., Takaki, S., Takatsu, K., Nakamura, K., Nakao, K., . . . Seiki, M. Crosstalk between neovessels and mural cells directs the site-specific expression of MT1-MMP to endothelial tip cells. *J Cell Sci* **120**, 1607-1614, (2007).

- 123 Krueger, J., Liu, D., Scholz, K., Zimmer, A., Shi, Y., Klein, C., . . . le Noble, F. Flt1 acts as a negative
regulator of tip cell formation and branching morphogenesis in the zebrafish embryo. *Development* **138**, 2111-2120, (2011).
- 124 Roca, C.Adams, R. H. Regulation of vascular morphogenesis by Notch signaling. *Genes &
development* **21**, 2511-2524, (2007).
- 125 Claxton, S.Fruttiger, M. Periodic Delta-like 4 expression in developing retinal arteries. *Gene
expression patterns : GEP* **5**, 123-127, (2004).
- 126 Strasser, G. A., Kaminker, J. S.Tessier-Lavigne, M. Microarray analysis of retinal endothelial tip
cells identifies CXCR4 as a mediator of tip cell morphology and branching. *Blood* **115**, 5102-5110,
(2010).
- 127 Herreman, A., Hartmann, D., Annaert, W., Saftig, P., Craessaerts, K., Serneels, L., . . . De
Strooper, B. Presenilin 2 deficiency causes a mild pulmonary phenotype and no changes in
amyloid precursor protein processing but enhances the embryonic lethal phenotype of
presenilin 1 deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 11872-11877, (1999).
- 128 High, F. A.Epstein, J. A. The multifaceted role of Notch in cardiac development and disease. *Nat
Rev Genet* **9**, 49-61, (2008).
- 129 Fischer, A., Schumacher, N., Maier, M., Sendtner, M.Gessler, M. The Notch target genes Hey1
and Hey2 are required for embryonic vascular development. *Genes & development* **18**, 901-911,
(2004).
- 130 Fischer, A., Steidl, C., Wagner, T. U., Lang, E., Jakob, P. M., Friedl, P., . . . Gessler, M. Combined
loss of Hey1 and HeyL causes congenital heart defects because of impaired epithelial to
mesenchymal transition. *Circ Res* **100**, 856-863, (2007).
- 131 Gessler, M., Knobloch, K. P., Helisch, A., Amann, K., Schumacher, N., Rohde, E., . . . Leimeister,
C. Mouse gridlock: no aortic coarctation or deficiency, but fatal cardiac defects in Hey2 $-/-$ mice.
Current biology : CB **12**, 1601-1604, (2002).
- 132 Kokubo, H., Miyagawa-Tomita, S., Tomimatsu, H., Nakashima, Y., Nakazawa, M., Saga,
Y.Johnson, R. L. Targeted disruption of hesr2 results in atrioventricular valve anomalies that lead
to heart dysfunction. *Circ Res* **95**, 540-547, (2004).
- 133 Sakata, Y., Kamei, C. N., Nakagami, H., Bronson, R., Liao, J. K.Chin, M. T. Ventricular septal defect
and cardiomyopathy in mice lacking the transcription factor CHF1/Hey2. *Proc Natl Acad Sci U S A*
99, 16197-16202, (2002).
- 134 Donovan, J., Kordylewska, A., Jan, Y. N.Utset, M. F. Tetralogy of fallot and other congenital heart
defects in Hey2 mutant mice. *Current biology : CB* **12**, 1605-1610, (2002).
- 135 Kokubo, H., Miyagawa-Tomita, S., Nakazawa, M., Saga, Y.Johnson, R. L. Mouse hesr1 and hesr2
genes are redundantly required to mediate Notch signaling in the developing cardiovascular
system. *Dev Biol* **278**, 301-309, (2005).
- 136 Kofler, N. M., Shawber, C. J., Kangsamaksin, T., Reed, H. O., Galatioto, J.Kitajewski, J. Notch
signaling in developmental and tumor angiogenesis. *Genes & cancer* **2**, 1106-1116, (2011).
- 137 Arima, S., Nishiyama, K., Ko, T., Arima, Y., Hakozaiki, Y., Sugihara, K., . . . Kurihara, H. Angiogenic
morphogenesis driven by dynamic and heterogeneous collective endothelial cell movement.
Development **138**, 4763-4776, (2011).
- 138 Blanco, R.Gerhardt, H. VEGF and Notch in tip and stalk cell selection. *Cold Spring Harb Perspect
Med* **3**, a006569, (2013).
- 139 Kur, E., Kim, J., Tata, A., Comin, C. H., Harrington, K. I., Costa Lda, F., . . . Gu, C. Temporal
modulation of collective cell behavior controls vascular network topology. *Elife* **5**, (2016).
- 140 Sainson, R. C., Aoto, J., Nakatsu, M. N., Holderfield, M., Conn, E., Koller, E.Hughes, C. C. Cell-
autonomous notch signaling regulates endothelial cell branching and proliferation during
vascular tubulogenesis. *Faseb j* **19**, 1027-1029, (2005).

- 141 Taylor, K. L., Henderson, A. M., Hughes, C. C. Notch activation during endothelial cell network formation in vitro targets the basic HLH transcription factor HESR-1 and downregulates VEGFR-2/KDR expression. *Microvasc Res* **64**, 372-383, (2002).
- 142 Benedito, R., Rocha, S. F., Woeste, M., Zamykal, M., Radtke, F., Casanovas, O., . . . Adams, R. H. Notch-dependent VEGFR3 upregulation allows angiogenesis without VEGF-VEGFR2 signalling. *Nature* **484**, 110-114, (2012).
- 143 Tammela, T., Zarkada, G., Wallgard, E., Murtomaki, A., Suchting, S., Wirzenius, M., . . . Alitalo, K. Blocking VEGFR-3 suppresses angiogenic sprouting and vascular network formation. *Nature* **454**, 656-660, (2008).
- 144 Funahashi, Y., Shawber, C. J., Vorontchikhina, M., Sharma, A., Outtz, H. H., Kitajewski, J. Notch regulates the angiogenic response via induction of VEGFR-1. *J Angiogenesis Res* **2**, 3, (2010).
- 145 Siekmann, A. F., Lawson, N. D. Notch signalling limits angiogenic cell behaviour in developing zebrafish arteries. *Nature* **445**, 781-784, (2007).
- 146 Zarkada, G., Heinolainen, K., Makinen, T., Kubota, Y., Alitalo, K. VEGFR3 does not sustain retinal angiogenesis without VEGFR2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**, 761-766, (2015).
- 147 Hasan, S. S., Tsaryk, R., Lange, M., Wisniewski, L., Moore, J. C., Lawson, N. D., . . . Siekmann, A. F. Endothelial Notch signalling limits angiogenesis via control of artery formation. *Nat Cell Biol* **19**, 928-940, (2017).
- 148 Pitulescu, M. E., Schmidt, I., Giaimo, B. D., Antoine, T., Berkenfeld, F., Ferrante, F., . . . Adams, R. H. Dll4 and Notch signalling couples sprouting angiogenesis and artery formation. *Nat Cell Biol* **19**, 915-927, (2017).
- 149 Wacker, A., Gerhardt, H. Endothelial development taking shape. *Curr Opin Cell Biol* **23**, 676-685, (2011).
- 150 Phng, L. K., Stanchi, F., Gerhardt, H. Filopodia are dispensable for endothelial tip cell guidance. *Development* **140**, 4031-4040, (2013).
- 151 Teuwen, L. A., Draoui, N., Dubois, C., Carmeliet, P. Endothelial cell metabolism: an update anno 2017. *Curr Opin Hematol* **24**, 240-247, (2017).
- 152 Eichmann, A., Simons, M. Need glucose to sprout: local metabolic control of angiogenesis. *EMBO Mol Med* **5**, 1459-1461, (2013).
- 153 De Bock, K., Georgiadou, M., Schoors, S., Kuchnio, A., Wong, B. W., Cantelmo, A. R., . . . Carmeliet, P. Role of PFKFB3-driven glycolysis in vessel sprouting. *Cell* **154**, 651-663, (2013).
- 154 Bentley, K., Franco, C. A., Philippides, A., Blanco, R., Dierkes, M., Gebala, V., . . . Gerhardt, H. The role of differential VE-cadherin dynamics in cell rearrangement during angiogenesis. *Nat Cell Biol* **16**, 309-321, (2014).
- 155 Sigurbjornsdottir, S., Mathew, R., Leptin, M. Molecular mechanisms of de novo lumen formation. *Nature reviews. Molecular cell biology* **15**, 665-676, (2014).
- 156 Zeeb, M., Strilic, B., Lammert, E. Resolving cell-cell junctions: lumen formation in blood vessels. *Curr Opin Cell Biol* **22**, 626-632, (2010).
- 157 Davis, G. E., Camarillo, C. W. An $\alpha 2\beta 1$ Integrin-Dependent Pinocytic Mechanism Involving Intracellular Vacuole Formation and Coalescence Regulates Capillary Lumen and Tube Formation in Three-Dimensional Collagen Matrix. *Experimental Cell Research* **224**, 39-51, (1996).
- 158 Kamei, M., Saunders, W. B., Bayless, K. J., Dye, L., Davis, G. E., Weinstein, B. M. Endothelial tubes assemble from intracellular vacuoles in vivo. *Nature* **442**, 453-456, (2006).
- 159 Koh, W., Mahan, R. D., Davis, G. E. Cdc42- and Rac1-mediated endothelial lumen formation requires Pak2, Pak4 and Par3, and PKC-dependent signaling. *J Cell Sci* **121**, 989-1001, (2008).
- 160 Strilic, B., Kucera, T., Eglinger, J., Hughes, M. R., McNagny, K. M., Tsukita, S., . . . Lammert, E. The molecular basis of vascular lumen formation in the developing mouse aorta. *Dev Cell* **17**, 505-515, (2009).

- 161 Bretscher, A., Edwards, K., Fehon, R. G. ERM proteins and merlin: integrators at the cell cortex. *Nature reviews. Molecular cell biology* **3**, 586-599, (2002).
- 162 Gaengel, K., Genove, G., Armulik, A., Betsholtz, C. Endothelial-mural cell signaling in vascular development and angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **29**, 630-638, (2009).
- 163 Garmy-Susini, B., Jin, H., Zhu, Y., Sung, R. J., Hwang, R., Varner, J. Integrin alpha4beta1-VCAM-1-mediated adhesion between endothelial and mural cells is required for blood vessel maturation. *The Journal of clinical investigation* **115**, 1542-1551, (2005).
- 164 Foo, S. S., Turner, C. J., Adams, S., Compagni, A., Aubyn, D., Kogata, N., . . . Adams, R. H. Ephrin-B2 controls cell motility and adhesion during blood-vessel-wall assembly. *Cell* **124**, 161-173, (2006).
- 165 Joutel, A., Corpechot, C., Ducros, A., Vahedi, K., Chabriat, H., Mouton, P., . . . Tournier-Lasserre, E. Notch3 mutations in CADASIL, a hereditary adult-onset condition causing stroke and dementia. *Nature* **383**, 707-710, (1996).
- 166 Stojanov, D., Grozdanovic, D., Petrovic, S., Benedeto-Stojanov, D., Stefanovic, I., Stojanovic, N., Ilic, D. N. De novo mutation in the NOTCH3 gene causing CADASIL. *Bosn J Basic Med Sci* **14**, 48-50, (2014).
- 167 Benton, R. L., Maddie, M. A., Minnillo, D. R., Hagg, T., Whittemore, S. R. Griffonia simplicifolia isolectin B4 identifies a specific subpopulation of angiogenic blood vessels following contusive spinal cord injury in the adult mouse. *The Journal of comparative neurology* **507**, 1031-1052, (2008).
- 168 Huxlin, K. R., Sefton, A. J., Furby, J. H. The origin and development of retinal astrocytes in the mouse. *Journal of Neurocytology* **21**, 530-544, (1992).
- 169 Watanabe, T., Raff, M. C. Retinal astrocytes are immigrants from the optic nerve. *Nature* **332**, 834, (1988).
- 170 Fruttiger, M., Calver, A. R., Kruger, W. H., Mudhar, H. S., Michalovich, D., Takakura, N., . . . Richardson, W. D. PDGF mediates a neuron-astrocyte interaction in the developing retina. *Neuron* **17**, 1117-1131, (1996).
- 171 Dorrell, M. I., Aguilar, E., Friedlander, M. Retinal vascular development is mediated by endothelial filopodia, a preexisting astrocytic template and specific R-cadherin adhesion. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **43**, 3500-3510, (2002).
- 172 Gerhardt, H. VEGF and endothelial guidance in angiogenic sprouting. *Organogenesis* **4**, 241-246, (2008).
- 173 Stone, J., Itin, A., Alon, T., Pe'er, J., Gnessin, H., Chan-Ling, T., Keshet, E. Development of retinal vasculature is mediated by hypoxia-induced vascular endothelial growth factor (VEGF) expression by neuroglia. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **15**, 4738-4747, (1995).
- 174 Okabe, K., Kobayashi, S., Yamada, T., Kurihara, T., Tai-Nagara, I., Miyamoto, T., . . . Kubota, Y. Neurons limit angiogenesis by titrating VEGF in retina. *Cell* **159**, 584-596, (2014).
- 175 Scott, A., Powner, M. B., Gandhi, P., Clarkin, C., Gutmann, D. H., Johnson, R. S., . . . Fruttiger, M. Astrocyte-Derived Vascular Endothelial Growth Factor Stabilizes Vessels in the Developing Retinal Vasculature. *PLoS ONE* **5**, e11863, (2010).
- 176 Weidemann, A., Krohne, T. U., Aguilar, E., Kurihara, T., Takeda, N., Dorrell, M. I., . . . Johnson, R. S. Astrocyte hypoxic response is essential for pathological but not developmental angiogenesis of the retina. *Glia* **58**, 1177-1185, (2010).
- 177 Benjamin, L. E., Hemo, I., Keshet, E. A plasticity window for blood vessel remodelling is defined by pericyte coverage of the preformed endothelial network and is regulated by PDGF-B and VEGF. *Development* **125**, 1591-1598, (1998).

- 178 Crowther, M., Brown, N. J., Bishop, E. T., Lewis, C. E. Microenvironmental influence on macrophage regulation of angiogenesis in wounds and malignant tumors. *J Leukoc Biol* **70**, 478-490, (2001).
- 179 Polverini, P. J., Cotran, P. S., Gimbrone, M. A., Jr., Unanue, E. R. Activated macrophages induce vascular proliferation. *Nature* **269**, 804-806, (1977).
- 180 Lingen, M. W. Role of leukocytes and endothelial cells in the development of angiogenesis in inflammation and wound healing. *Archives of pathology & laboratory medicine* **125**, 67-71, (2001).
- 181 Rymo, S. F., Gerhardt, H., Wolfhagen Sand, F., Lang, R., Uv, A., Betsholtz, C. A two-way communication between microglial cells and angiogenic sprouts regulates angiogenesis in aortic ring cultures. *PLoS One* **6**, e15846, (2011).
- 182 Checchin, D., Sennlaub, F., Levavasseur, E., Leduc, M., Chemtob, S. Potential role of microglia in retinal blood vessel formation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **47**, 3595-3602, (2006).
- 183 Kubota, Y., Takubo, K., Shimizu, T., Ohno, H., Kishi, K., Shibuya, M., . . . Suda, T. M-CSF inhibition selectively targets pathological angiogenesis and lymphangiogenesis. *J Exp Med* **206**, 1089-1102, (2009).
- 184 Fantin, A., Vieira, J. M., Gestri, G., Denti, L., Schwarz, Q., Prykhodzij, S., . . . Ruhrberg, C. Tissue macrophages act as cellular chaperones for vascular anastomosis downstream of VEGF-mediated endothelial tip cell induction. *Blood* **116**, 829-840, (2010).
- 185 Stark, K., Eckart, A., Haidari, S., Tirniceriu, A., Lorenz, M., von Bruhl, M. L., . . . Massberg, S. Capillary and arteriolar pericytes attract innate leukocytes exiting through venules and 'instruct' them with pattern-recognition and motility programs. *Nat Immunol* **14**, 41-51, (2013).
- 186 Outtz, H. H., Tattersall, I. W., Kofler, N. M., Steinbach, N., Kitajewski, J. Notch1 controls macrophage recruitment and Notch signaling is activated at sites of endothelial cell anastomosis during retinal angiogenesis in mice. *Blood* **118**, 3436-3439, (2011).
- 187 Stefater, J. A., 3rd, Lewkowich, I., Rao, S., Mariggi, G., Carpenter, A. C., Burr, A. R., . . . Lang, R. A. Regulation of angiogenesis by a non-canonical Wnt-Flt1 pathway in myeloid cells. *Nature* **474**, 511-515, (2011).
- 188 Blaauwgeers, H. G., Holtkamp, G. M., Rutten, H., Witmer, A. N., Koolwijk, P., Partanen, T. A., . . . Schlingemann, R. O. Polarized vascular endothelial growth factor secretion by human retinal pigment epithelium and localization of vascular endothelial growth factor receptors on the inner choriocapillaris. Evidence for a trophic paracrine relation. *Am J Pathol* **155**, 421-428, (1999).
- 189 Ruhrberg, C., Gerhardt, H., Golding, M., Watson, R., Ioannidou, S., Fujisawa, H., . . . Shima, D. T. Spatially restricted patterning cues provided by heparin-binding VEGF-A control blood vessel branching morphogenesis. *Genes & development* **16**, 2684-2698, (2002).
- 190 Stalmans, I., Ng, Y. S., Rohan, R., Fruttiger, M., Bouche, A., Yuce, A., . . . D'Amore, P. A. Arteriolar and venular patterning in retinas of mice selectively expressing VEGF isoforms. *The Journal of clinical investigation* **109**, 327-336, (2002).
- 191 Ho, V. C., Duan, L. J., Cronin, C., Liang, B. T., Fong, G. H. Elevated vascular endothelial growth factor receptor-2 abundance contributes to increased angiogenesis in vascular endothelial growth factor receptor-1-deficient mice. *Circulation* **126**, 741-752, (2012).
- 192 Tammela, T., Zarkada, G., Nurmi, H., Jakobsson, L., Heinolainen, K., Tvorogov, D., . . . Alitalo, K. VEGFR-3 controls tip to stalk conversion at vessel fusion sites by reinforcing Notch signalling. *Nat Cell Biol* **13**, 1202-1213, (2011).
- 193 Leslie, J. D., Ariza-McNaughton, L., Bermange, A. L., McAdow, R., Johnson, S. L., Lewis, J. Endothelial signalling by the Notch ligand Delta-like 4 restricts angiogenesis. *Development* **134**, 839-844, (2007).

- 194 Ridgway, J., Zhang, G., Wu, Y., Stawicki, S., Liang, W. C., Chanthery, Y., . . . Yan, M. Inhibition of Dll4 signalling inhibits tumour growth by deregulating angiogenesis. *Nature* **444**, 1083-1087, (2006).
- 195 Scehnet, J. S., Jiang, W., Kumar, S. R., Krasnoperov, V., Trindade, A., Benedito, R., . . . Gill, P. S. Inhibition of Dll4-mediated signaling induces proliferation of immature vessels and results in poor tissue perfusion. *Blood* **109**, 4753-4760, (2007).
- 196 Benedito, R., Roca, C., Sorensen, I., Adams, S., Gossler, A., Fruttiger, M., Adams, R. H. The notch ligands Dll4 and Jagged1 have opposing effects on angiogenesis. *Cell* **137**, 1124-1135, (2009).
- 197 Pedrosa, A. R., Trindade, A., Fernandes, A. C., Carvalho, C., Gigante, J., Tavares, A. T., . . . Duarte, A. Endothelial Jagged1 antagonizes Dll4 regulation of endothelial branching and promotes vascular maturation downstream of Dll4/Notch1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **35**, 1134-1146, (2015).
- 198 Eklund, L., Saharinen, P. Angiopoietin signaling in the vasculature. *Exp Cell Res* **319**, 1271-1280, (2013).
- 199 Hackett, S. F., Ozaki, H., Strauss, R. W., Wahlin, K., Suri, C., Maisonpierre, P., . . . Campochiaro, P. A. Angiopoietin 2 expression in the retina: upregulation during physiologic and pathologic neovascularization. *J Cell Physiol* **184**, 275-284, (2000).
- 200 Lobb, R., Sasse, J., Sullivan, R., Shing, Y., D'Amore, P., Jacobs, J., Klagsbrun, M. Purification and characterization of heparin-binding endothelial cell growth factors. *J Biol Chem* **261**, 1924-1928, (1986).
- 201 Klagsbrun, M., Sullivan, R., Smith, S., Rybka, R., Shing, Y. E. Purification of endothelial cell growth factors by heparin affinity chromatography. *Methods Enzymol* **147**, 95-105, (1987).
- 202 Shing, Y., Folkman, J., Sullivan, R., Butterfield, C., Murray, J., Klagsbrun, M. Heparin affinity: purification of a tumor-derived capillary endothelial cell growth factor. *Science* **223**, 1296-1299, (1984).
- 203 Presta, M., Dell'Era, P., Mitola, S., Moroni, E., Ronca, R., Rusnati, M. Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis. *Cytokine & growth factor reviews* **16**, 159-178, (2005).
- 204 Rousseau, B., Larrieu-Lahargue, F., Bikfalvi, A., Javerzat, S. Involvement of fibroblast growth factors in choroidal angiogenesis and retinal vascularization. *Exp Eye Res* **77**, 147-156, (2003).
- 205 Murakami, M., Nguyen, L. T., Zhuang, Z. W., Moodie, K. L., Carmeliet, P., Stan, R. V., Simons, M. The FGF system has a key role in regulating vascular integrity. *The Journal of clinical investigation* **118**, 3355-3366, (2008).
- 206 Urness, L. D., Sorensen, L. K., Li, D. Y. Arteriovenous malformations in mice lacking activin receptor-like kinase-1. *Nat Genet* **26**, 328-331, (2000).
- 207 Ricard, N., Ciais, D., Levet, S., Subileau, M., Mallet, C., Zimmers, T. A., . . . Bailly, S. BMP9 and BMP10 are critical for postnatal retinal vascular remodeling. *Blood* **119**, 6162-6171, (2012).
- 208 David, L., Mallet, C., Mazerbourg, S., Feige, J. J., Bailly, S. Identification of BMP9 and BMP10 as functional activators of the orphan activin receptor-like kinase 1 (ALK1) in endothelial cells. *Blood* **109**, 1953-1961, (2007).
- 209 Larrivee, B., Prahst, C., Gordon, E., del Toro, R., Mathivet, T., Duarte, A., . . . Eichmann, A. ALK1 signaling inhibits angiogenesis by cooperating with the Notch pathway. *Dev Cell* **22**, 489-500, (2012).
- 210 Xu, Q., Wang, Y., Dabdoub, A., Smallwood, P. M., Williams, J., Woods, C., . . . Nathans, J. Vascular development in the retina and inner ear: control by Norrin and Frizzled-4, a high-affinity ligand-receptor pair. *Cell* **116**, 883-895, (2004).
- 211 Liu, C., Nathans, J. An essential role for frizzled 5 in mammalian ocular development. *Development* **135**, 3567-3576, (2008).

- 212 Lobov, I. B., Rao, S., Carroll, T. J., Vallance, J. E., Ito, M., Ondr, J. K., . . . Lang, R. A. WNT7b mediates macrophage-induced programmed cell death in patterning of the vasculature. *Nature* **437**, 417-421, (2005).
- 213 Klagsbrun, M.Eichmann, A. A role for axon guidance receptors and ligands in blood vessel development and tumor angiogenesis. *Cytokine & growth factor reviews* **16**, 535-548, (2005).
- 214 Erskine, L., Williams, S. E., Brose, K., Kidd, T., Rachel, R. A., Goodman, C. S., . . . Mason, C. A. Retinal ganglion cell axon guidance in the mouse optic chiasm: expression and function of robo and slits. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **20**, 4975-4982, (2000).
- 215 Rama, N., Dubrac, A., Mathivet, T., Ni Charthaigh, R. A., Genet, G., Cristofaro, B., . . . Chedotal, A. Slit2 signaling through Robo1 and Robo2 is required for retinal neovascularization. *Nat Med* **21**, 483-491, (2015).
- 216 Eichmann, A., Makinen, T.Alitalo, K. Neural guidance molecules regulate vascular remodeling and vessel navigation. *Genes & development* **19**, 1013-1021, (2005).
- 217 Carmeliet, P.Tessier-Lavigne, M. Common mechanisms of nerve and blood vessel wiring. *Nature* **436**, 193-200, (2005).
- 218 Ribatti, D., Conconi, M. T.Nussdorfer, G. G. Nonclassic endogenous novel [corrected] regulators of angiogenesis. *Pharmacol Rev* **59**, 185-205, (2007).
- 219 Liu, D., Krueger, J.Le Noble, F. The role of blood flow and microRNAs in blood vessel development. *Int J Dev Biol* **55**, 419-429, (2011).
- 220 Garcia-Cardena, G.Slegtenhorst, B. R. Hemodynamic Control of Endothelial Cell Fates in Development. *Annu Rev Cell Dev Biol* **32**, 633-648, (2016).
- 221 le Noble, F., Moyon, D., Pardanaud, L., Yuan, L., Djonov, V., Matthijsen, R., . . . Eichmann, A. Flow regulates arterial-venous differentiation in the chick embryo yolk sac. *Development* **131**, 361-375, (2004).
- 222 Marcelo, K. L., Goldie, L. C.Hirschi, K. K. Regulation of endothelial cell differentiation and specification. *Circ Res* **112**, 1272-1287, (2013).
- 223 Morini, M. F.Dejana, E. Transcriptional regulation of arterial differentiation via Wnt, Sox and Notch. *Curr Opin Hematol* **21**, 229-234, (2014).
- 224 Wang, H. U., Chen, Z. F.Anderson, D. J. Molecular distinction and angiogenic interaction between embryonic arteries and veins revealed by ephrin-B2 and its receptor Eph-B4. *Cell* **93**, 741-753, (1998).
- 225 Herbert, S. P., Huisken, J., Kim, T. N., Feldman, M. E., Houseman, B. T., Wang, R. A., . . . Stainier, D. Y. Arterial-venous segregation by selective cell sprouting: an alternative mode of blood vessel formation. *Science* **326**, 294-298, (2009).
- 226 Gerety, S. S., Wang, H. U., Chen, Z. F.Anderson, D. J. Symmetrical mutant phenotypes of the receptor EphB4 and its specific transmembrane ligand ephrin-B2 in cardiovascular development. *Mol Cell* **4**, 403-414, (1999).
- 227 Adams, R. H. Molecular control of arterial-venous blood vessel identity. *J Anat* **202**, 105-112, (2003).
- 228 Herzog, Y., Kalcheim, C., Kahane, N., Reshef, R.Neufeld, G. Differential expression of neuropilin-1 and neuropilin-2 in arteries and veins. *Mech Dev* **109**, 115-119, (2001).
- 229 You, L. R., Lin, F. J., Lee, C. T., DeMayo, F. J., Tsai, M. J.Tsai, S. Y. Suppression of Notch signalling by the COUP-TFII transcription factor regulates vein identity. *Nature* **435**, 98-104, (2005).
- 230 Mukoyama, Y. S., Shin, D., Britsch, S., Taniguchi, M.Anderson, D. J. Sensory nerves determine the pattern of arterial differentiation and blood vessel branching in the skin. *Cell* **109**, 693-705, (2002).

- 231 Visconti, R. P., Richardson, C. D.Sato, T. N. Orchestration of angiogenesis and arteriovenous contribution by angiopoietins and vascular endothelial growth factor (VEGF). *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 8219-8224, (2002).
- 232 Lawson, N. D., Vogel, A. M.Weinstein, B. M. sonic hedgehog and vascular endothelial growth factor act upstream of the Notch pathway during arterial endothelial differentiation. *Dev Cell* **3**, 127-136, (2002).
- 233 Hong, C. C., Peterson, Q. P., Hong, J. Y.Peterson, R. T. Artery/vein specification is governed by opposing phosphatidylinositol-3 kinase and MAP kinase/ERK signaling. *Current biology : CB* **16**, 1366-1372, (2006).
- 234 Simons, M.Eichmann, A. Molecular controls of arterial morphogenesis. *Circ Res* **116**, 1712-1724, (2015).
- 235 Zhong, T. P., Childs, S., Leu, J. P.Fishman, M. C. Gridlock signalling pathway fashions the first embryonic artery. *Nature* **414**, 216-220, (2001).
- 236 Krebs, L. T., Shutter, J. R., Tanigaki, K., Honjo, T., Stark, K. L.Gridley, T. Haploinsufficient lethality and formation of arteriovenous malformations in Notch pathway mutants. *Genes & development* **18**, 2469-2473, (2004).
- 237 Chi, J. T., Chang, H. Y., Haraldsen, G., Jahnsen, F. L., Troyanskaya, O. G., Chang, D. S., . . . Brown, P. O. Endothelial cell diversity revealed by global expression profiling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 10623-10628, (2003).
- 238 Aranguren, X. L., Agirre, X., Beerens, M., Coppiello, G., Uriz, M., Vandersmissen, I., . . . Luttun, A. Unraveling a novel transcription factor code determining the human arterial-specific endothelial cell signature. *Blood* **122**, 3982-3992, (2013).
- 239 Lawson, N. D., Scheer, N., Pham, V. N., Kim, C. H., Chitnis, A. B., Campos-Ortega, J. A.Weinstein, B. M. Notch signaling is required for arterial-venous differentiation during embryonic vascular development. *Development* **128**, 3675-3683, (2001).
- 240 Williams, C., Kim, S. H., Ni, T. T., Mitchell, L., Ro, H., Penn, J. S., . . . Zhong, T. P. Hedgehog signaling induces arterial endothelial cell formation by repressing venous cell fate. *Dev Biol* **341**, 196-204, (2010).
- 241 Yamamizu, K., Matsunaga, T., Uosaki, H., Fukushima, H., Katayama, S., Hiraoka-Kanie, M., . . . Yamashita, J. K. Convergence of Notch and beta-catenin signaling induces arterial fate in vascular progenitors. *The Journal of cell biology* **189**, 325-338, (2010).
- 242 Corada, M., Nyqvist, D., Orsenigo, F., Caprini, A., Giampietro, C., Taketo, M. M., . . . Dejana, E. The Wnt/beta-catenin pathway modulates vascular remodeling and specification by upregulating Dll4/Notch signaling. *Dev Cell* **18**, 938-949, (2010).
- 243 Chen, X., Qin, J., Cheng, C. M., Tsai, M. J.Tsai, S. Y. COUP-TFII is a major regulator of cell cycle and Notch signaling pathways. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)* **26**, 1268-1277, (2012).
- 244 Seo, S., Fujita, H., Nakano, A., Kang, M., Duarte, A.Kume, T. The forkhead transcription factors, Foxc1 and Foxc2, are required for arterial specification and lymphatic sprouting during vascular development. *Dev Biol* **294**, 458-470, (2006).
- 245 Davis, R. B., Curtis, C. D.Griffin, C. T. BRG1 promotes COUP-TFII expression and venous specification during embryonic vascular development. *Development* **140**, 1272-1281, (2013).
- 246 Gu, C., Rodriguez, E. R., Reimert, D. V., Shu, T., Fritzsche, B., Richards, L. J., . . . Ginty, D. D. Neuropilin-1 conveys semaphorin and VEGF signaling during neural and cardiovascular development. *Dev Cell* **5**, 45-57, (2003).
- 247 Fantin, A., Schwarz, Q., Davidson, K., Normando, E. M., Denti, L.Ruhrberg, C. The cytoplasmic domain of neuropilin 1 is dispensable for angiogenesis, but promotes the spatial separation of retinal arteries and veins. *Development* **138**, 4185-4191, (2011).

- 248 Leung, D. W., Cachianes, G., Kuang, W. J., Goeddel, D. V. Ferrara, N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* **246**, 1306-1309, (1989).
- 249 Connolly, D. T., Olander, J. V., Heuvelman, D., Nelson, R., Monsell, R., Siegel, N., . . . Feder, J. Human vascular permeability factor. Isolation from U937 cells. *J Biol Chem* **264**, 20017-20024, (1989).
- 250 Plouet, J., Schilling, J. Gospodarowicz, D. Isolation and characterization of a newly identified endothelial cell mitogen produced by AtT-20 cells. *The EMBO journal* **8**, 3801-3806, (1989).
- 251 Senger, D. R., Perruzzi, C. A., Feder, J. Dvorak, H. F. A highly conserved vascular permeability factor secreted by a variety of human and rodent tumor cell lines. *Cancer Res* **46**, 5629-5632, (1986).
- 252 Keck, P. J., Hauser, S. D., Krivi, G., Sanzo, K., Warren, T., Feder, J. Connolly, D. T. Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF. *Science* **246**, 1309-1312, (1989).
- 253 Hicklin, D. J. Ellis, L. M. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **23**, 1011-1027, (2005).
- 254 Carmeliet, P., Moons, L., Luttun, A., Vincenti, V., Compernelle, V., De Mol, M., . . . Persico, M. G. Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. *Nat Med* **7**, 575-583, (2001).
- 255 Park, J. E., Chen, H. H., Winer, J., Houck, K. A. Ferrara, N. Placenta growth factor. Potentiation of vascular endothelial growth factor bioactivity, in vitro and in vivo, and high affinity binding to Flt-1 but not to Flk-1/KDR. *J Biol Chem* **269**, 25646-25654, (1994).
- 256 Eriksson, A., Cao, R., Pawliuk, R., Berg, S. M., Tsang, M., Zhou, D., . . . Cao, Y. Placenta growth factor-1 antagonizes VEGF-induced angiogenesis and tumor growth by the formation of functionally inactive PlGF-1/VEGF heterodimers. *Cancer Cell* **1**, 99-108, (2002).
- 257 Reichelt, M., Shi, S., Hayes, M., Kay, G., Batch, J., Gole, G. A. Browning, J. Vascular endothelial growth factor-B and retinal vascular development in the mouse. *Clinical & experimental ophthalmology* **31**, 61-65, (2003).
- 258 Bellomo, D., Headrick, J. P., Silins, G. U., Paterson, C. A., Thomas, P. S., Gartside, M., . . . Kay, G. F. Mice lacking the vascular endothelial growth factor-B gene (*Vegfb*) have smaller hearts, dysfunctional coronary vasculature, and impaired recovery from cardiac ischemia. *Circ Res* **86**, E29-35, (2000).
- 259 Aase, K., von Euler, G., Li, X., Ponten, A., Thoren, P., Cao, R., . . . Eriksson, U. Vascular endothelial growth factor-B-deficient mice display an atrial conduction defect. *Circulation* **104**, 358-364, (2001).
- 260 Wanstall, J. C., Gambino, A., Jeffery, T. K., Cahill, M. M., Bellomo, D., Hayward, N. K. Kay, G. F. Vascular endothelial growth factor-B-deficient mice show impaired development of hypoxic pulmonary hypertension. *Cardiovasc Res* **55**, 361-368, (2002).
- 261 Li, X., Lee, C., Tang, Z., Zhang, F., Arjunan, P., Li, Y., . . . Dong, L. VEGF-B: a survival, or an angiogenic factor? *Cell Adh Migr* **3**, 322-327, (2009).
- 262 Rissanen, T. T., Markkanen, J. E., Gruchala, M., Heikura, T., Puranen, A., Kettunen, M. I., . . . Yla-Herttuala, S. VEGF-D is the strongest angiogenic and lymphangiogenic effector among VEGFs delivered into skeletal muscle via adenoviruses. *Circ Res* **92**, 1098-1106, (2003).
- 263 Wafai, R., Tudor, E. M., Angus, J. A. Wright, C. E. Vascular effects of FGF-2 and VEGF-B in rabbits with bilateral hind limb ischemia. *J Vasc Res* **46**, 45-54, (2009).

- 264 Silvestre, J. S., Tamarat, R., Ebrahimian, T. G., Le-Roux, A., Clergue, M., Emmanuel, F., . . . Levy, B. I. Vascular endothelial growth factor-B promotes in vivo angiogenesis. *Circ Res* **93**, 114-123, (2003).
- 265 Haiko, P., Makinen, T., Keskkitalo, S., Taipale, J., Karkkainen, M. J., Baldwin, M. E., . . . Alitalo, K. Deletion of vascular endothelial growth factor C (VEGF-C) and VEGF-D is not equivalent to VEGF receptor 3 deletion in mouse embryos. *Mol Cell Biol* **28**, 4843-4850, (2008).
- 266 Baldwin, M. E., Catimel, B., Nice, E. C., Roufail, S., Hall, N. E., Stenvers, K. L., . . . Achen, M. G. The specificity of receptor binding by vascular endothelial growth factor-d is different in mouse and man. *J Biol Chem* **276**, 19166-19171, (2001).
- 267 Bower, N. I., Vogrin, A. J., Le Guen, L., Chen, H., Stacker, S. A., Achen, M. G., Hogan, B. M. Vegfd modulates both angiogenesis and lymphangiogenesis during zebrafish embryonic development. *Development* **144**, 507-518, (2017).
- 268 Karnezis, T., Shayan, R., Caesar, C., Roufail, S., Harris, N. C., Ardipradja, K., . . . Stacker, S. A. VEGF-D promotes tumor metastasis by regulating prostaglandins produced by the collecting lymphatic endothelium. *Cancer Cell* **21**, 181-195, (2012).
- 269 Korpelainen, E. I., Karkkainen, M. J., Tenhunen, A., Lakso, M., Rauvala, H., Vierula, M., . . . Alitalo, K. Overexpression of VEGF in testis and epididymis causes infertility in transgenic mice: evidence for nonendothelial targets for VEGF. *The Journal of cell biology* **143**, 1705-1712, (1998).
- 270 Chung, A. S., Ferrara, N. Developmental and pathological angiogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* **27**, 563-584, (2011).
- 271 Potente, M., Gerhardt, H., Carmeliet, P. Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. *Cell* **146**, 873-887, (2011).
- 272 Pertovaara, L., Kaipainen, A., Mustonen, T., Orpana, A., Ferrara, N., Saksela, O., Alitalo, K. Vascular endothelial growth factor is induced in response to transforming growth factor-beta in fibroblastic and epithelial cells. *J Biol Chem* **269**, 6271-6274, (1994).
- 273 Bautz, F., Rafii, S., Kanz, L., Mohle, R. Expression and secretion of vascular endothelial growth factor-A by cytokine-stimulated hematopoietic progenitor cells. Possible role in the hematopoietic microenvironment. *Exp Hematol* **28**, 700-706, (2000).
- 274 Chintalgattu, V., Nair, D., Katwa, L. C. Cardiac myofibroblasts: a novel source of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors Flt-1 and KDR. *J Mol Cell Cardiol* **35**, 277-286, (2003).
- 275 Haigh, J. J., Gerber, H. P., Ferrara, N., Wagner, E. F. Conditional inactivation of VEGF-A in areas of collagen2a1 expression results in embryonic lethality in the heterozygous state. *Development* **127**, 1445-1453, (2000).
- 276 Spiller, K. L., Anfang, R. R., Spiller, K. J., Ng, J., Nakazawa, K. R., Daulton, J. W., Vunjak-Novakovic, G. The role of macrophage phenotype in vascularization of tissue engineering scaffolds. *Biomaterials* **35**, 4477-4488, (2014).
- 277 Taichman, N. S., Young, S., Cruchley, A. T., Taylor, P., Paleolog, E. Human neutrophils secrete vascular endothelial growth factor. *J Leukoc Biol* **62**, 397-400, (1997).
- 278 Freeman, M. R., Schneck, F. X., Gagnon, M. L., Corless, C., Soker, S., Niknejad, K., . . . Klagsbrun, M. Peripheral blood T lymphocytes and lymphocytes infiltrating human cancers express vascular endothelial growth factor: a potential role for T cells in angiogenesis. *Cancer Res* **55**, 4140-4145, (1995).
- 279 Namiki, A., Brogi, E., Kearney, M., Kim, E. A., Wu, T., Couffinhal, T., . . . Isner, J. M. Hypoxia induces vascular endothelial growth factor in cultured human endothelial cells. *J Biol Chem* **270**, 31189-31195, (1995).

- 280 Liu, Y., Cox, S. R., Morita, T.Kourembanas, S. Hypoxia regulates vascular endothelial growth factor gene expression in endothelial cells. Identification of a 5' enhancer. *Circ Res* **77**, 638-643, (1995).
- 281 Tang, N., Wang, L., Esko, J., Giordano, F. J., Huang, Y., Gerber, H. P., . . . Johnson, R. S. Loss of HIF-1alpha in endothelial cells disrupts a hypoxia-driven VEGF autocrine loop necessary for tumorigenesis. *Cancer Cell* **6**, 485-495, (2004).
- 282 Xie, K., Wei, D., Shi, Q.Huang, S. Constitutive and inducible expression and regulation of vascular endothelial growth factor. *Cytokine & growth factor reviews* **15**, 297-324, (2004).
- 283 Ferrara, N.Davis-Smyth, T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* **18**, 4-25, (1997).
- 284 Tischer, E., Mitchell, R., Hartman, T., Silva, M., Gospodarowicz, D., Fiddes, J. C.Abraham, J. A. The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J Biol Chem* **266**, 11947-11954, (1991).
- 285 Houck, K. A., Ferrara, N., Winer, J., Cachianes, G., Li, B.Leung, D. W. The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)* **5**, 1806-1814, (1991).
- 286 Guyot, M.Pages, G. VEGF Splicing and the Role of VEGF Splice Variants: From Physiological-Pathological Conditions to Specific Pre-mRNA Splicing. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **1332**, 3-23, (2015).
- 287 Ng, Y. S., Rohan, R., Sunday, M. E., Demello, D. E.D'Amore, P. A. Differential expression of VEGF isoforms in mouse during development and in the adult. *Dev Dyn* **220**, 112-121, (2001).
- 288 Hilmi, C., Guyot, M.Pages, G. VEGF spliced variants: possible role of anti-angiogenesis therapy. *J Nucleic Acids* **2012**, 162692, (2012).
- 289 Ruiz de Almodovar, C., Lambrechts, D., Mazzone, M.Carmeliet, P. Role and therapeutic potential of VEGF in the nervous system. *Physiol Rev* **89**, 607-648, (2009).
- 290 Elias, A. P.Dias, S. Microenvironment changes (in pH) affect VEGF alternative splicing. *Cancer microenvironment : official journal of the International Cancer Microenvironment Society* **1**, 131-139, (2008).
- 291 Guyot, M., Hilmi, C., Ambrosetti, D., Merlano, M., Lo Nigro, C., Durivault, J., . . . Pages, G. Targeting the pro-angiogenic forms of VEGF or inhibiting their expression as anti-cancer strategies. *Oncotarget* **8**, 9174-9188, (2017).
- 292 Konopatskaya, O., Churchill, A. J., Harper, S. J., Bates, D. O.Gardiner, T. A. VEGF165b, an endogenous C-terminal splice variant of VEGF, inhibits retinal neovascularization in mice. *Mol Vis* **12**, 626-632, (2006).
- 293 Bates, D. O., Cui, T. G., Doughty, J. M., Winkler, M., Sugiono, M., Shields, J. D., . . . Harper, S. J. VEGF165b, an inhibitory splice variant of vascular endothelial growth factor, is down-regulated in renal cell carcinoma. *Cancer Res* **62**, 4123-4131, (2002).
- 294 Olsson, A. K., Dimberg, A., Kreuger, J.Claesson-Welsh, L. VEGF receptor signalling - in control of vascular function. *Nature reviews. Molecular cell biology* **7**, 359-371, (2006).
- 295 Katoh, O., Tauchi, H., Kawaisi, K., Kimura, A.Satow, Y. Expression of the vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor gene, KDR, in hematopoietic cells and inhibitory effect of VEGF on apoptotic cell death caused by ionizing radiation. *Cancer Res* **55**, 5687-5692, (1995).
- 296 Larsson-Blomberg, L.Dzierzak, E. Isolation of tyrosine kinase related genes expressed in the early hematopoietic system. *FEBS Lett* **348**, 119-125, (1994).
- 297 Selheim, F., Holmsen, H.Vassbotn, F. S. Identification of functional VEGF receptors on human platelets. *FEBS Lett* **512**, 107-110, (2002).
- 298 Zachary, I. Neuroprotective role of vascular endothelial growth factor: signalling mechanisms, biological function, and therapeutic potential. *Neurosignals* **14**, 207-221, (2005).

- 299 Valtola, R., Salven, P., Heikkila, P., Taipale, J., Joensuu, H., Rehn, M., . . . Alitalo, K. VEGFR-3 and its ligand VEGF-C are associated with angiogenesis in breast cancer. *Am J Pathol* **154**, 1381-1390, (1999).
- 300 Laakkonen, P., Waltari, M., Holopainen, T., Takahashi, T., Pytowski, B., Steiner, P., . . . Alitalo, K. Vascular endothelial growth factor receptor 3 is involved in tumor angiogenesis and growth. *Cancer Res* **67**, 593-599, (2007).
- 301 Witmer, A. N., van Blijswijk, B. C., Dai, J., Hofman, P., Partanen, T. A., Vrensen, G. F.Schlingemann, R. O. VEGFR-3 in adult angiogenesis. *The Journal of pathology* **195**, 490-497, (2001).
- 302 Kearney, J. B., Kappas, N. C., Ellerstrom, C., DiPaola, F. W.Bautch, V. L. The VEGF receptor flt-1 (VEGFR-1) is a positive modulator of vascular sprout formation and branching morphogenesis. *Blood* **103**, 4527-4535, (2004).
- 303 Murakami, M., Iwai, S., Hiratsuka, S., Yamauchi, M., Nakamura, K., Iwakura, Y.Shibuya, M. Signaling of vascular endothelial growth factor receptor-1 tyrosine kinase promotes rheumatoid arthritis through activation of monocytes/macrophages. *Blood* **108**, 1849-1856, (2006).
- 304 Hiratsuka, S., Minowa, O., Kuno, J., Noda, T.Shibuya, M. Flt-1 lacking the tyrosine kinase domain is sufficient for normal development and angiogenesis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 9349-9354, (1998).
- 305 Ho, V. C.Fong, G. H. Vasculogenesis and Angiogenesis in VEGF Receptor-1 Deficient Mice. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **1332**, 161-176, (2015).
- 306 Terman, B. I., Dougher-Vermazen, M., Carrion, M. E., Dimitrov, D., Armellino, D. C., Gospodarowicz, D.Bohlen, P. Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial cell growth factor. *Biochem Biophys Res Commun* **187**, 1579-1586, (1992).
- 307 de Vries, C., Escobedo, J. A., Ueno, H., Houck, K., Ferrara, N.Williams, L. T. The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science* **255**, 989-991, (1992).
- 308 Kappas, N. C., Zeng, G., Chappell, J. C., Kearney, J. B., Hazarika, S., Kallianos, K. G., . . . Bautch, V. L. The VEGF receptor Flt-1 spatially modulates Flk-1 signaling and blood vessel branching. *The Journal of cell biology* **181**, 847-858, (2008).
- 309 Koch, S., Tugues, S., Li, X., Gualandi, L.Claesson-Welsh, L. Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. *The Biochemical journal* **437**, 169-183, (2011).
- 310 Shalaby, F., Ho, J., Stanford, W. L., Fischer, K. D., Schuh, A. C., Schwartz, L., . . . Rossant, J. A requirement for Flk1 in primitive and definitive hematopoiesis and vasculogenesis. *Cell* **89**, 981-990, (1997).
- 311 Dumont, D. J., Fong, G. H., Puri, M. C., Gradwohl, G., Alitalo, K.Breitman, M. L. Vascularization of the mouse embryo: a study of flk-1, tek, tie, and vascular endothelial growth factor expression during development. *Dev Dyn* **203**, 80-92, (1995).
- 312 Millauer, B., Wizigmann-Voos, S., Schnurch, H., Martinez, R., Moller, N. P., Risau, W.Ullrich, A. High affinity VEGF binding and developmental expression suggest Flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis. *Cell* **72**, 835-846, (1993).
- 313 Claesson-Welsh, L.Welsh, M. VEGFA and tumour angiogenesis. *J Intern Med* **273**, 114-127, (2013).
- 314 Lee, S., Chen, T. T., Barber, C. L., Jordan, M. C., Murdock, J., Desai, S., . . . Iruela-Arispe, M. L. Autocrine VEGF signaling is required for vascular homeostasis. *Cell* **130**, 691-703, (2007).
- 315 Matsumoto, T.Claesson-Welsh, L. VEGF receptor signal transduction. *Science's STKE : signal transduction knowledge environment* **2001**, re21, (2001).
- 316 McColl, B. K., Baldwin, M. E., Roufail, S., Freeman, C., Moritz, R. L., Simpson, R. J., . . . Achen, M. G. Plasmin activates the lymphangiogenic growth factors VEGF-C and VEGF-D. *J Exp Med* **198**, 863-868, (2003).

- 317 Ebos, J. M., Bocci, G., Man, S., Thorpe, P. E., Hicklin, D. J., Zhou, D., . . . Kerbel, R. S. A naturally occurring soluble form of vascular endothelial growth factor receptor 2 detected in mouse and human plasma. *Molecular cancer research : MCR* **2**, 315-326, (2004).
- 318 Nilsson, I., Bahram, F., Li, X., Gualandi, L., Koch, S., Jarvius, M., . . . Claesson-Welsh, L. VEGF receptor 2/-3 heterodimers detected in situ by proximity ligation on angiogenic sprouts. *The EMBO journal* **29**, 1377-1388, (2010).
- 319 Dixelius, J., Makinen, T., Wirzenius, M., Karkkainen, M. J., Wernstedt, C., Alitalo, K. Claesson-Welsh, L. Ligand-induced vascular endothelial growth factor receptor-3 (VEGFR-3) heterodimerization with VEGFR-2 in primary lymphatic endothelial cells regulates tyrosine phosphorylation sites. *J Biol Chem* **278**, 40973-40979, (2003).
- 320 Karkkainen, M. J., Haiko, P., Sainio, K., Partanen, J., Taipale, J., Petrova, T. V., . . . Alitalo, K. Vascular endothelial growth factor C is required for sprouting of the first lymphatic vessels from embryonic veins. *Nat Immunol* **5**, 74-80, (2004).
- 321 Makinen, T., Veikkola, T., Mustjoki, S., Karpanen, T., Catimel, B., Nice, E. C., . . . Alitalo, K. Isolated lymphatic endothelial cells transduce growth, survival and migratory signals via the VEGF-C/D receptor VEGFR-3. *The EMBO journal* **20**, 4762-4773, (2001).
- 322 Heinolainen, K., Karaman, S., D'Amico, G., Tammela, T., Sormunen, R., Eklund, L., . . . Zarkada, G. VEGFR3 Modulates Vascular Permeability by Controlling VEGF/VEGFR2 Signaling. *Circ Res* **120**, 1414-1425, (2017).
- 323 Cudmore, M. J., Hewett, P. W., Ahmad, S., Wang, K. Q., Cai, M., Al-Ani, B., . . . Ahmed, A. The role of heterodimerization between VEGFR-1 and VEGFR-2 in the regulation of endothelial cell homeostasis. *Nat Commun* **3**, 972, (2012).
- 324 Koch, S. Claesson-Welsh, L. Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. *Cold Spring Harb Perspect Med* **2**, a006502, (2012).
- 325 Moyon, D., Pardanaud, L., Yuan, L., Breant, C. Eichmann, A. Plasticity of endothelial cells during arterial-venous differentiation in the avian embryo. *Development* **128**, 3359-3370, (2001).
- 326 Soker, S., Miao, H. Q., Nomi, M., Takashima, S. Klagsbrun, M. VEGF165 mediates formation of complexes containing VEGFR-2 and neuropilin-1 that enhance VEGF165-receptor binding. *J Cell Biochem* **85**, 357-368, (2002).
- 327 Whitaker, G. B., Limberg, B. J. Rosenbaum, J. S. Vascular endothelial growth factor receptor-2 and neuropilin-1 form a receptor complex that is responsible for the differential signaling potency of VEGF(165) and VEGF(121). *J Biol Chem* **276**, 25520-25531, (2001).
- 328 Koch, S., van Meeteren, L. A., Morin, E., Testini, C., Westrom, S., Bjorkelund, H., . . . Claesson-Welsh, L. NRP1 presented in trans to the endothelium arrests VEGFR2 endocytosis, preventing angiogenic signaling and tumor initiation. *Dev Cell* **28**, 633-646, (2014).
- 329 Karpanen, T., Heckman, C. A., Keskitalo, S., Jeltsch, M., Ollila, H., Neufeld, G., . . . Alitalo, K. Functional interaction of VEGF-C and VEGF-D with neuropilin receptors. *Faseb j* **20**, 1462-1472, (2006).
- 330 Migdal, M., Huppertz, B., Tessler, S., Comforti, A., Shibuya, M., Reich, R., . . . Neufeld, G. Neuropilin-1 is a placenta growth factor-2 receptor. *J Biol Chem* **273**, 22272-22278, (1998).
- 331 Takashima, S., Kitakaze, M., Asakura, M., Asanuma, H., Sanada, S., Tashiro, F., . . . Hori, M. Targeting of both mouse neuropilin-1 and neuropilin-2 genes severely impairs developmental yolk sac and embryonic angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 3657-3662, (2002).
- 332 Silva, R., D'Amico, G., Hodivala-Dilke, K. M. Reynolds, L. E. Integrins: the keys to unlocking angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **28**, 1703-1713, (2008).
- 333 Pampori, N., Hato, T., Stupack, D. G., Aidoudi, S., Cheresh, D. A., Nemerow, G. R. Shattil, S. J. Mechanisms and consequences of affinity modulation of integrin alpha(V)beta(3) detected with a novel patch-engineered monovalent ligand. *J Biol Chem* **274**, 21609-21616, (1999).

- 334 Masson-Gadais, B., Houle, F., Laferriere, J., Huot, J. Integrin $\alpha v \beta 3$, requirement for VEGFR2-mediated activation of SAPK2/p38 and for Hsp90-dependent phosphorylation of focal adhesion kinase in endothelial cells activated by VEGF. *Cell stress & chaperones* **8**, 37-52, (2003).
- 335 Mahabeleshwar, G. H., Feng, W., Phillips, D. R., Byzova, T. V. Integrin signaling is critical for pathological angiogenesis. *J Exp Med* **203**, 2495-2507, (2006).
- 336 Mahabeleshwar, G. H., Byzova, T. V. Vascular integrin signaling. *Methods Enzymol* **443**, 199-226, (2008).
- 337 Byzova, T. V., Goldman, C. K., Pampori, N., Thomas, K. A., Bett, A., Shattil, S. J., Plow, E. F. A mechanism for modulation of cellular responses to VEGF: activation of the integrins. *Mol Cell* **6**, 851-860, (2000).
- 338 Gulino, D., Delachanal, E., Concord, E., Genoux, Y., Morand, B., Valiron, M. O., . . . Vernet, T. Alteration of endothelial cell monolayer integrity triggers resynthesis of vascular endothelium cadherin. *J Biol Chem* **273**, 29786-29793, (1998).
- 339 Carmeliet, P., Lampugnani, M. G., Moons, L., Breviario, F., Compernelle, V., Bono, F., . . . Dejana, E. Targeted deficiency or cytosolic truncation of the VE-cadherin gene in mice impairs VEGF-mediated endothelial survival and angiogenesis. *Cell* **98**, 147-157, (1999).
- 340 Gory-Faure, S., Prandini, M. H., Pointu, H., Roullot, V., Pignot-Paintrand, I., Vernet, M., Huber, P. Role of vascular endothelial-cadherin in vascular morphogenesis. *Development* **126**, 2093-2102, (1999).
- 341 Dosch, D., Ballmer-Hofer, K. Transmembrane domain-mediated orientation of receptor monomers in active VEGFR-2 dimers. *Faseb j* **24**, 32-38, (2010).
- 342 Jin, Z. G., Ueba, H., Tanimoto, T., Lungu, A. O., Frame, M. D., Berk, B. C. Ligand-independent activation of vascular endothelial growth factor receptor 2 by fluid shear stress regulates activation of endothelial nitric oxide synthase. *Circ Res* **93**, 354-363, (2003).
- 343 Patel-Hett, S., D'Amore, P. A. Signal transduction in vasculogenesis and developmental angiogenesis. *Int J Dev Biol* **55**, 353-363, (2011).
- 344 Zhuang, G., Yu, K., Jiang, Z., Chung, A., Yao, J., Ha, C., . . . Ferrara, N. Phosphoproteomic analysis implicates the mTORC2-FoxO1 axis in VEGF signaling and feedback activation of receptor tyrosine kinases. *Sci Signal* **6**, ra25, (2013).
- 345 Sakurai, Y., Ohgimoto, K., Kataoka, Y., Yoshida, N., Shibuya, M. Essential role of Flk-1 (VEGF receptor 2) tyrosine residue 1173 in vasculogenesis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 1076-1081, (2005).
- 346 Holmqvist, K., Cross, M. J., Rolny, C., Hagerkvist, R., Rahimi, N., Matsumoto, T., . . . Welsh, M. The adaptor protein shb binds to tyrosine 1175 in vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor-2 and regulates VEGF-dependent cellular migration. *J Biol Chem* **279**, 22267-22275, (2004).
- 347 Liao, H. J., Kume, T., McKay, C., Xu, M. J., Ihle, J. N., Carpenter, G. Absence of erythropoiesis and vasculogenesis in Plcg1-deficient mice. *J Biol Chem* **277**, 9335-9341, (2002).
- 348 Ji, Q. S., Winnier, G. E., Niswender, K. D., Horstman, D., Wisdom, R., Magnuson, M. A., Carpenter, G. Essential role of the tyrosine kinase substrate phospholipase C- γ 1 in mammalian growth and development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 2999-3003, (1997).
- 349 Takahashi, T., Ueno, H., Shibuya, M. VEGF activates protein kinase C-dependent, but Ras-independent Raf-MEK-MAP kinase pathway for DNA synthesis in primary endothelial cells. *Oncogene* **18**, 2221-2230, (1999).
- 350 Xia, P., Aiello, L. P., Ishii, H., Jiang, Z. Y., Park, D. J., Robinson, G. S., . . . King, G. L. Characterization of vascular endothelial growth factor's effect on the activation of protein kinase C, its isoforms, and endothelial cell growth. *The Journal of clinical investigation* **98**, 2018-2026, (1996).

- 351 Lanahan, A. A., Hermans, K., Claes, F., Kerley-Hamilton, J. S., Zhuang, Z. W., Giordano, F. J., . . .
Simons, M. VEGF receptor 2 endocytic trafficking regulates arterial morphogenesis. *Dev Cell* **18**,
713-724, (2010).
- 352 Takahashi, T., Yamaguchi, S., Chida, K., Shibuya, M. A single autophosphorylation site on KDR/Flk-
1 is essential for VEGF-A-dependent activation of PLC-gamma and DNA synthesis in vascular
endothelial cells. *The EMBO journal* **20**, 2768-2778, (2001).
- 353 Wythe, J. D., Dang, L. T., Devine, W. P., Boudreau, E., Artap, S. T., He, D., . . . Fish, J. E. ETS factors
regulate Vegf-dependent arterial specification. *Dev Cell* **26**, 45-58, (2013).
- 354 Ha, C. H., Jhun, B. S., Kao, H. Y., Jin, Z. G. VEGF stimulates HDAC7 phosphorylation and
cytoplasmic accumulation modulating matrix metalloproteinase expression and angiogenesis.
Arterioscler Thromb Vasc Biol **28**, 1782-1788, (2008).
- 355 Wang, S., Li, X., Parra, M., Verdin, E., Bassel-Duby, R., Olson, E. N. Control of endothelial cell
proliferation and migration by VEGF signaling to histone deacetylase 7. *Proc Natl Acad Sci U S A*
105, 7738-7743, (2008).
- 356 Warner, A. J., Lopez-Dee, J., Knight, E. L., Feramisco, J. R., Prigent, S. A. The Shc-related adaptor
protein, Sck, forms a complex with the vascular-endothelial-growth-factor receptor KDR in
transfected cells. *The Biochemical journal* **347**, 501-509, (2000).
- 357 Parsons, J. T. Focal adhesion kinase: the first ten years. *J Cell Sci* **116**, 1409-1416, (2003).
- 358 Funai, N. S., Kriz, V., Zang, G., Calounova, G., Akerblom, B., Mares, J., . . . Welsh, M. Dysfunctional
microvasculature as a consequence of shb gene inactivation causes impaired tumor growth.
Cancer Res **69**, 2141-2148, (2009).
- 359 Sun, Z., Li, X., Massena, S., Kutschera, S., Padhan, N., Gualandi, L., . . . Claesson-Welsh, L. VEGFR2
induces c-Src signaling and vascular permeability in vivo via the adaptor protein TSAd. *J Exp Med*
209, 1363-1377, (2012).
- 360 Matsumoto, T., Bohman, S., Dixelius, J., Berge, T., Dimberg, A., Magnusson, P., . . . Claesson-
Welsh, L. VEGF receptor-2 Y951 signaling and a role for the adapter molecule TSAd in tumor
angiogenesis. *The EMBO journal* **24**, 2342-2353, (2005).
- 361 Weis, S., Cui, J., Barnes, L., Cheresh, D. Endothelial barrier disruption by VEGF-mediated Src
activity potentiates tumor cell extravasation and metastasis. *The Journal of cell biology* **167**, 223-
229, (2004).
- 362 Li, X., Padhan, N., Sjostrom, E. O., Roche, F. P., Testini, C., Honkura, N., . . . Claesson-Welsh, L.
VEGFR2 pY949 signalling regulates adherens junction integrity and metastatic spread. *Nat*
Commun **7**, 11017, (2016).
- 363 Westhoff, M. A., Serrels, B., Fincham, V. J., Frame, M. C., Carragher, N. O. SRC-mediated
phosphorylation of focal adhesion kinase couples actin and adhesion dynamics to survival
signaling. *Mol Cell Biol* **24**, 8113-8133, (2004).
- 364 Chen, X. L., Nam, J. O., Jean, C., Lawson, C., Walsh, C. T., Goka, E., . . . Schlaepfer, D. D. VEGF-
induced vascular permeability is mediated by FAK. *Dev Cell* **22**, 146-157, (2012).
- 365 Lamallice, L., Houle, F., Huot, J. Phosphorylation of Tyr1214 within VEGFR-2 triggers the
recruitment of Nck and activation of Fyn leading to SAPK2/p38 activation and endothelial cell
migration in response to VEGF. *J Biol Chem* **281**, 34009-34020, (2006).
- 366 Gourlaouen, M., Welti, J. C., Vasudev, N. S., Reynolds, A. R. Essential role for endocytosis in the
growth factor-stimulated activation of ERK1/2 in endothelial cells. *J Biol Chem* **288**, 7467-7480,
(2013).
- 367 Lampugnani, M. G., Orsenigo, F., Gagliani, M. C., Tacchetti, C., Dejana, E. Vascular endothelial
cadherin controls VEGFR-2 internalization and signaling from intracellular compartments. *The*
Journal of cell biology **174**, 593-604, (2006).

- 368 Basagiannis, D., Zografou, S., Murphy, C., Fotsis, T., Morbidelli, L., Ziche, M., . . . Christoforidis, S. VEGF induces signalling and angiogenesis by directing VEGFR2 internalisation through macropinocytosis. *J Cell Sci* **129**, 4091-4104, (2016).
- 369 Ballmer-Hofer, K., Andersson, A. E., Ratcliffe, L. E. Berger, P. Neuropilin-1 promotes VEGFR-2 trafficking through Rab11 vesicles thereby specifying signal output. *Blood* **118**, 816-826, (2011).
- 370 Tzima, E., Irani-Tehrani, M., Kiosses, W. B., Dejana, E., Schultz, D. A., Engelhardt, B., . . . Schwartz, M. A. A mechanosensory complex that mediates the endothelial cell response to fluid shear stress. *Nature* **437**, 426-431, (2005).
- 371 Sawamiphak, S., Seidel, S., Essmann, C. L., Wilkinson, G. A., Pitulescu, M. E., Acker, T. Acker-Palmer, A. Ephrin-B2 regulates VEGFR2 function in developmental and tumour angiogenesis. *Nature* **465**, 487-491, (2010).
- 372 Mellberg, S., Dimberg, A., Bahram, F., Hayashi, M., Rennel, E., Ameer, A., . . . Claesson-Welsh, L. Transcriptional profiling reveals a critical role for tyrosine phosphatase VE-PTP in regulation of VEGFR2 activity and endothelial cell morphogenesis. *Faseb j* **23**, 1490-1502, (2009).
- 373 Mattila, E., Auvinen, K., Salmi, M. Ivaska, J. The protein tyrosine phosphatase TCPTP controls VEGFR2 signalling. *J Cell Sci* **121**, 3570-3580, (2008).
- 374 Cohen, P. The origins of protein phosphorylation. *Nat Cell Biol* **4**, E127-130, (2002).
- 375 Sacco, F., Perfetto, L., Castagnoli, L. Cesareni, G. The human phosphatase interactome: An intricate family portrait. *FEBS Lett* **586**, 2732-2739, (2012).
- 376 Chen, M. J., Dixon, J. E. Manning, G. Genomics and evolution of protein phosphatases. *Sci Signal* **10**, (2017).
- 377 Matthews, H. R. Protein kinases and phosphatases that act on histidine, lysine, or arginine residues in eukaryotic proteins: a possible regulator of the mitogen-activated protein kinase cascade. *Pharmacology & therapeutics* **67**, 323-350, (1995).
- 378 Klumpp, S. Kriegstein, J. Phosphorylation and dephosphorylation of histidine residues in proteins. *Eur J Biochem* **269**, 1067-1071, (2002).
- 379 Olsen, J. V., Blagoev, B., Gnäd, F., Macek, B., Kumar, C., Mortensen, P. Mann, M. Global, in vivo, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks. *Cell* **127**, 635-648, (2006).
- 380 Tautz, L., Critton, D. A. Grotegut, S. Protein tyrosine phosphatases: structure, function, and implication in human disease. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **1053**, 179-221, (2013).
- 381 King, N., Hittinger, C. T. Carroll, S. B. Evolution of key cell signaling and adhesion protein families predates animal origins. *Science* **301**, 361-363, (2003).
- 382 Tan, C. S., Pasulescu, A., Lim, W. A., Pawson, T., Bader, G. D. Linding, R. Positive selection of tyrosine loss in metazoan evolution. *Science* **325**, 1686-1688, (2009).
- 383 Burnett, G. Kennedy, E. P. The enzymatic phosphorylation of proteins. *J Biol Chem* **211**, 969-980, (1954).
- 384 Fischer, E. H. Krebs, E. G. Conversion of phosphorylase b to phosphorylase a in muscle extracts. *J Biol Chem* **216**, 121-132, (1955).
- 385 Sutherland, E. W., Jr. Wosilait, W. D. Inactivation and activation of liver phosphorylase. *Nature* **175**, 169-170, (1955).
- 386 Krebs, E. G. Nobel Lecture. Protein phosphorylation and cellular regulation I. *Bioscience reports* **13**, 127-142, (1993).
- 387 Fischer, E. H. Protein Phosphorylation and Cellular Regulation II (Nobel Lecture). *Angewandte Chemie International Edition in English* **32**, 1130-1137, (1993).
- 388 Collett, M. S. Erikson, R. L. Protein kinase activity associated with the avian sarcoma virus src gene product. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**, 2021-2024, (1978).

- 389 Czernilofsky, A. P., Levinson, A. D., Varmus, H. E., Bishop, J. M., Tischler, E., Goodman, H. M. Nucleotide sequence of an avian sarcoma virus oncogene (src) and proposed amino acid sequence for gene product. *Nature* **287**, 198-203, (1980).
- 390 Brautigan, D. L., Bornstein, P., Gallis, B. Phosphotyrosyl-protein phosphatase. Specific inhibition by Zn. *J Biol Chem* **256**, 6519-6522, (1981).
- 391 Tonks, N. K., Diltz, C. D., Fischer, E. H. Purification of the major protein-tyrosine-phosphatases of human placenta. *J Biol Chem* **263**, 6722-6730, (1988).
- 392 Tonks, N. K., Charbonneau, H. Protein tyrosine dephosphorylation and signal transduction. *Trends Biochem Sci* **14**, 497-500, (1989).
- 393 Guan, K. L., Haun, R. S., Watson, S. J., Geahlen, R. L., Dixon, J. E. Cloning and expression of a protein-tyrosine-phosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 1501-1505, (1990).
- 394 Alonso, A., Pulido, R. The extended human PTPome: a growing tyrosine phosphatase family. *The FEBS journal* **283**, 1404-1429, (2016).
- 395 Julien, S. G., Dube, N., Hardy, S., Tremblay, M. L. Inside the human cancer tyrosine phosphatome. *Nature reviews. Cancer* **11**, 35-49, (2011).
- 396 Tonks, N. K. Protein tyrosine phosphatases: from genes, to function, to disease. *Nature reviews. Molecular cell biology* **7**, 833-846, (2006).
- 397 Raugei, G., Ramponi, G., Chiarugi, P. Low molecular weight protein tyrosine phosphatases: small, but smart. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **59**, 941-949, (2002).
- 398 Shen, T., Huang, S. The role of Cdc25A in the regulation of cell proliferation and apoptosis. *Anticancer Agents Med Chem* **12**, 631-639, (2012).
- 399 Bordo, D., Bork, P. The rhodanese/Cdc25 phosphatase superfamily. Sequence-structure-function relations. *EMBO Rep* **3**, 741-746, (2002).
- 400 Barford, D., Flint, A. J., Tonks, N. K. Crystal structure of human protein tyrosine phosphatase 1B. *Science* **263**, 1397-1404, (1994).
- 401 Barr, A. J., Ugochukwu, E., Lee, W. H., King, O. N., Filippakopoulos, P., Alfano, I., . . . Knapp, S. Large-scale structural analysis of the classical human protein tyrosine phosphatome. *Cell* **136**, 352-363, (2009).
- 402 Charbonneau, H., Tonks, N. K., Kumar, S., Diltz, C. D., Harrylock, M., Cool, D. E., . . . Walsh, K. A. Human placenta protein-tyrosine-phosphatase: amino acid sequence and relationship to a family of receptor-like proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 5252-5256, (1989).
- 403 Andersen, J. N., Mortensen, O. H., Peters, G. H., Drake, P. G., Iversen, L. F., Olsen, O. H., . . . Moller, N. P. Structural and evolutionary relationships among protein tyrosine phosphatase domains. *Mol Cell Biol* **21**, 7117-7136, (2001).
- 404 Andersen, J. N., Jansen, P. G., Echwald, S. M., Mortensen, O. H., Fukada, T., Del Vecchio, R., . . . Moller, N. P. A genomic perspective on protein tyrosine phosphatases: gene structure, pseudogenes, and genetic disease linkage. *Faseb j* **18**, 8-30, (2004).
- 405 Tonks, N. K. Protein tyrosine phosphatases--from housekeeping enzymes to master regulators of signal transduction. *The FEBS journal* **280**, 346-378, (2013).
- 406 Zhang, Z. Y., Palfey, B. A., Wu, L., Zhao, Y. Catalytic function of the conserved hydroxyl group in the protein tyrosine phosphatase signature motif. *Biochemistry* **34**, 16389-16396, (1995).
- 407 Denu, J. M., Dixon, J. E. A catalytic mechanism for the dual-specific phosphatases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 5910-5914, (1995).
- 408 Stuckey, J. A., Schubert, H. L., Fauman, E. B., Zhang, Z. Y., Dixon, J. E., Saper, M. A. Crystal structure of Yersinia protein tyrosine phosphatase at 2.5 Å and the complex with tungstate. *Nature* **370**, 571-575, (1994).
- 409 Jia, Z., Barford, D., Flint, A. J., Tonks, N. K. Structural basis for phosphotyrosine peptide recognition by protein tyrosine phosphatase 1B. *Science* **268**, 1754-1758, (1995).

- 410 Labbe, D. P., Hardy, S. Tremblay, M. L. Protein tyrosine phosphatases in cancer: friends and foes! *Prog Mol Biol Transl Sci* **106**, 253-306, (2012).
- 411 Zhang, Z. Y. Kinetic and mechanistic characterization of a mammalian protein-tyrosine phosphatase, PTP1. *J Biol Chem* **270**, 11199-11204, (1995).
- 412 Zhang, Z. Y. Dixon, J. E. Active site labeling of the Yersinia protein tyrosine phosphatase: the determination of the pKa of the active site cysteine and the function of the conserved histidine 402. *Biochemistry* **32**, 9340-9345, (1993).
- 413 Denu, J. M., Stuckey, J. A., Saper, M. A. Dixon, J. E. Form and function in protein dephosphorylation. *Cell* **87**, 361-364, (1996).
- 414 Skinner, A. L., Vartia, A. A., Williams, T. D. Laurence, J. S. Enzyme activity of phosphatase of regenerating liver is controlled by the redox environment and its C-terminal residues. *Biochemistry* **48**, 4262-4272, (2009).
- 415 Denu, J. M., Lohse, D. L., Vijayalakshmi, J., Saper, M. A. Dixon, J. E. Visualization of intermediate and transition-state structures in protein-tyrosine phosphatase catalysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 2493-2498, (1996).
- 416 Tonks, N. K. PTP1B: from the sidelines to the front lines! *FEBS Lett* **546**, 140-148, (2003).
- 417 Ke, S., Ho, M. C., Zhadin, N., Deng, H. Callender, R. Investigation of catalytic loop structure, dynamics, and function relationship of Yersinia protein tyrosine phosphatase by temperature-jump relaxation spectroscopy and X-ray structural determination. *The journal of physical chemistry. B* **116**, 6166-6176, (2012).
- 418 Zhou, G., Denu, J. M., Wu, L. Dixon, J. E. The catalytic role of Cys124 in the dual specificity phosphatase VHR. *J Biol Chem* **269**, 28084-28090, (1994).
- 419 Brandao, T. A., Johnson, S. J. Hengge, A. C. The molecular details of WPD-loop movement differ in the protein-tyrosine phosphatases YopH and PTP1B. *Arch Biochem Biophys* **525**, 53-59, (2012).
- 420 Sarmiento, M., Puius, Y. A., Vetter, S. W., Keng, Y. F., Wu, L., Zhao, Y., . . . Zhang, Z. Y. Structural basis of plasticity in protein tyrosine phosphatase 1B substrate recognition. *Biochemistry* **39**, 8171-8179, (2000).
- 421 Wang, S., Taberner, L., Zhang, M., Harms, E., Van Etten, R. L. Stauffacher, C. V. Crystal structures of a low-molecular weight protein tyrosine phosphatase from *Saccharomyces cerevisiae* and its complex with the substrate p-nitrophenyl phosphate. *Biochemistry* **39**, 1903-1914, (2000).
- 422 Salmeen, A., Andersen, J. N., Myers, M. P., Tonks, N. K. Barford, D. Molecular basis for the dephosphorylation of the activation segment of the insulin receptor by protein tyrosine phosphatase 1B. *Mol Cell* **6**, 1401-1412, (2000).
- 423 Blanchetot, C., Chagnon, M., Dube, N., Halle, M. Tremblay, M. L. Substrate-trapping techniques in the identification of cellular PTP targets. *Methods* **35**, 44-53, (2005).
- 424 Song, H., Hanlon, N., Brown, N. R., Noble, M. E., Johnson, L. N. Barford, D. Phosphoprotein-protein interactions revealed by the crystal structure of kinase-associated phosphatase in complex with phosphoCDK2. *Mol Cell* **7**, 615-626, (2001).
- 425 Garton, A. J., Flint, A. J. Tonks, N. K. Identification of p130(cas) as a substrate for the cytosolic protein tyrosine phosphatase PTP-PEST. *Mol Cell Biol* **16**, 6408-6418, (1996).
- 426 Cote, J. F., Charest, A., Wagner, J. Tremblay, M. L. Combination of gene targeting and substrate trapping to identify substrates of protein tyrosine phosphatases using PTP-PEST as a model. *Biochemistry* **37**, 13128-13137, (1998).
- 427 Grazia Lampugnani, M., Zanetti, A., Corada, M., Takahashi, T., Balconi, G., Breviario, F., . . . Dejana, E. Contact inhibition of VEGF-induced proliferation requires vascular endothelial cadherin, beta-catenin, and the phosphatase DEP-1/CD148. *The Journal of cell biology* **161**, 793-804, (2003).

- 428 Nakamura, Y., Patrushev, N., Inomata, H., Mehta, D., Urao, N., Kim, H. W., . . . Ushio-Fukai, M. Role of protein tyrosine phosphatase 1B in vascular endothelial growth factor signaling and cell-cell adhesions in endothelial cells. *Circ Res* **102**, 1182-1191, (2008).
- 429 Bhattacharya, R., Kwon, J., Wang, E., Mukherjee, P., Mukhopadhyay, D. Src homology 2 (SH2) domain containing protein tyrosine phosphatase-1 (SHP-1) dephosphorylates VEGF Receptor-2 and attenuates endothelial DNA synthesis, but not migration*. *Journal of molecular signaling* **3**, 8, (2008).
- 430 Mitola, S., Brenchio, B., Piccinini, M., Tertoolen, L., Zammataro, L., Breier, G., . . . Bussolino, F. Type I collagen limits VEGFR-2 signaling by a SHP2 protein-tyrosine phosphatase-dependent mechanism 1. *Circ Res* **98**, 45-54, (2006).
- 431 Hao, Q., Samten, B., Ji, H. L., Zhao, Z. J., Tang, H. Tyrosine phosphatase PTP-MEG2 negatively regulates vascular endothelial growth factor receptor signaling and function in endothelial cells. *American journal of physiology. Cell physiology* **303**, C548-553, (2012).
- 432 Huang, L., Sankar, S., Lin, C., Kontos, C. D., Schroff, A. D., Cha, E. H., . . . Peters, K. G. HCPTPA, a protein tyrosine phosphatase that regulates vascular endothelial growth factor receptor-mediated signal transduction and biological activity. *J Biol Chem* **274**, 38183-38188, (1999).
- 433 Baumer, S., Keller, L., Holtmann, A., Funke, R., August, B., Gamp, A., . . . Vestweber, D. Vascular endothelial cell-specific phosphotyrosine phosphatase (VE-PTP) activity is required for blood vessel development. *Blood* **107**, 4754-4762, (2006).
- 434 Dominguez, M. G., Hughes, V. C., Pan, L., Simmons, M., Daly, C., Anderson, K., . . . Gale, N. W. Vascular endothelial tyrosine phosphatase (VE-PTP)-null mice undergo vasculogenesis but die embryonically because of defects in angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 3243-3248, (2007).
- 435 Nawroth, R., Poell, G., Ranft, A., Kloep, S., Samulowitz, U., Fachinger, G., . . . Vestweber, D. VE-PTP and VE-cadherin ectodomains interact to facilitate regulation of phosphorylation and cell contacts. *The EMBO journal* **21**, 4885-4895, (2002).
- 436 Fachinger, G., Deutsch, U., Risau, W. Functional interaction of vascular endothelial-protein-tyrosine phosphatase with the angiopoietin receptor Tie-2. *Oncogene* **18**, 5948-5953, (1999).
- 437 Nottebaum, A. F., Cagna, G., Winderlich, M., Gamp, A. C., Linnepe, R., Polaschegg, C., . . . Vestweber, D. VE-PTP maintains the endothelial barrier via plakoglobin and becomes dissociated from VE-cadherin by leukocytes and by VEGF. *J Exp Med* **205**, 2929-2945, (2008).
- 438 Broermann, A., Winderlich, M., Block, H., Frye, M., Rossaint, J., Zarbock, A., . . . Vestweber, D. Dissociation of VE-PTP from VE-cadherin is required for leukocyte extravasation and for VEGF-induced vascular permeability in vivo. *J Exp Med* **208**, 2393-2401, (2011).
- 439 Hayashi, M., Majumdar, A., Li, X., Adler, J., Sun, Z., Vertuani, S., . . . Claesson-Welsh, L. VE-PTP regulates VEGFR2 activity in stalk cells to establish endothelial cell polarity and lumen formation. *Nat Commun* **4**, 1672, (2013).
- 440 Stuiblé, M., Tremblay, M. L. In control at the ER: PTP1B and the down-regulation of RTKs by dephosphorylation and endocytosis. *Trends Cell Biol* **20**, 672-679, (2010).
- 441 Haj, F. G., Verveer, P. J., Squire, A., Neel, B. G., Bastiaens, P. I. Imaging sites of receptor dephosphorylation by PTP1B on the surface of the endoplasmic reticulum. *Science* **295**, 1708-1711, (2002).
- 442 Anderie, I., Schulz, I., Schmid, A. Direct interaction between ER membrane-bound PTP1B and its plasma membrane-anchored targets. *Cell Signal* **19**, 582-592, (2007).
- 443 Seely, B. L., Staubs, P. A., Reichart, D. R., Berhanu, P., Milarski, K. L., Saltiel, A. R., . . . Olefsky, J. M. Protein tyrosine phosphatase 1B interacts with the activated insulin receptor. *Diabetes* **45**, 1379-1385, (1996).

- 444 Elchebly, M., Payette, P., Michaliszyn, E., Cromlish, W., Collins, S., Loy, A. L., . . . Kennedy, B. P. Increased insulin sensitivity and obesity resistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatase-1B gene. *Science* **283**, 1544-1548, (1999).
- 445 Lanahan, A. A., Lech, D., Dubrac, A., Zhang, J., Zhuang, Z. W., Eichmann, A. Simons, M. PTP1b is a physiologic regulator of vascular endothelial growth factor signaling in endothelial cells. *Circulation* **130**, 902-909, (2014).
- 446 Lanahan, A., Zhang, X., Fantin, A., Zhuang, Z., Rivera-Molina, F., Speichinger, K., . . . Simons, M. The neuropilin 1 cytoplasmic domain is required for VEGF-A-dependent arteriogenesis. *Dev Cell* **25**, 156-168, (2013).
- 447 Borges, L. G., Seifert, R. A., Grant, F. J., Hart, C. E., Distecche, C. M., Edelhoff, S., . . . Bowen-Pope, D. F. Cloning and characterization of rat density-enhanced phosphatase-1, a protein tyrosine phosphatase expressed by vascular cells. *Circ Res* **79**, 570-580, (1996).
- 448 Autschbach, F., Palou, E., Mechtersheimer, G., Rohr, C., Piroto, F., Gassler, N., . . . Gaya, A. Expression of the membrane protein tyrosine phosphatase CD148 in human tissues. *Tissue Antigens* **54**, 485-498, (1999).
- 449 Ostman, A., Yang, Q. Tonks, N. K. Expression of DEP-1, a receptor-like protein-tyrosine-phosphatase, is enhanced with increasing cell density. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 9680-9684, (1994).
- 450 Chabot, C., Spring, K., Gratton, J. P., Elchebly, M. Royal, I. New role for the protein tyrosine phosphatase DEP-1 in Akt activation and endothelial cell survival. *Mol Cell Biol* **29**, 241-253, (2009).
- 451 Pera, I. L., Iuliano, R., Florio, T., Susini, C., Trapasso, F., Santoro, M., . . . Fusco, A. The rat tyrosine phosphatase eta increases cell adhesion by activating c-Src through dephosphorylation of its inhibitory phosphotyrosine residue. *Oncogene* **24**, 3187-3195, (2005).
- 452 Spring, K., Lapointe, L., Caron, C., Langlois, S. Royal, I. Phosphorylation of DEP-1/PTPRJ on threonine 1318 regulates Src activation and endothelial cell permeability induced by vascular endothelial growth factor. *Cell Signal* **26**, 1283-1293, (2014).
- 453 Spring, K., Chabot, C., Langlois, S., Lapointe, L., Trinh, N. T., Caron, C., . . . Royal, I. Tyrosine phosphorylation of DEP-1/CD148 as a mechanism controlling Src kinase activation, endothelial cell permeability, invasion, and capillary formation. *Blood* **120**, 2745-2756, (2012).
- 454 Fournier, P., Dussault, S., Fusco, A., Rivard, A. Royal, I. Tyrosine Phosphatase PTPRJ/DEP-1 Is an Essential Promoter of Vascular Permeability, Angiogenesis, and Tumor Progression. *Cancer Res* **76**, 5080-5091, (2016).
- 455 Zhu, J. W., Doan, K., Park, J., Chau, A. H., Zhang, H., Lowell, C. A. Weiss, A. Receptor-like tyrosine phosphatases CD45 and CD148 have distinct functions in chemoattractant-mediated neutrophil migration and response to *S. aureus*. *Immunity* **35**, 757-769, (2011).
- 456 Trapasso, F., Drusco, A., Costinean, S., Alder, H., Aqeilan, R. I., Iuliano, R., . . . Fusco, A. Genetic ablation of Ptpnj, a mouse cancer susceptibility gene, results in normal growth and development and does not predispose to spontaneous tumorigenesis. *DNA Cell Biol* **25**, 376-382, (2006).
- 457 Takahashi, T., Takahashi, K., St John, P. L., Fleming, P. A., Tomemori, T., Watanabe, T., . . . Daniel, T. O. A mutant receptor tyrosine phosphatase, CD148, causes defects in vascular development. *Mol Cell Biol* **23**, 1817-1831, (2003).
- 458 Mohn, K. L., Laz, T. M., Hsu, J. C., Melby, A. E., Bravo, R. Taub, R. The immediate-early growth response in regenerating liver and insulin-stimulated H-35 cells: comparison with serum-stimulated 3T3 cells and identification of 41 novel immediate-early genes. *Mol Cell Biol* **11**, 381-390, (1991).
- 459 Diamond, R. H., Cressman, D. E., Laz, T. M., Abrams, C. S. Taub, R. PRL-1, a unique nuclear protein tyrosine phosphatase, affects cell growth. *Mol Cell Biol* **14**, 3752-3762, (1994).

- 460 Zhao, Z., Lee, C. C., Monckton, D. G., Yazdani, A., Coolbaugh, M. I., Li, X., . . . Caskey, C. T. Characterization and genomic mapping of genes and pseudogenes of a new human protein tyrosine phosphatase. *Genomics* **35**, 172-181, (1996).
- 461 Cates, C. A., Michael, R. L., Stayrook, K. R., Harvey, K. A., Burke, Y. D., Randall, S. K., . . . Crowell, D. N. Prenylation of oncogenic human PTP(CAAX) protein tyrosine phosphatases. *Cancer Lett* **110**, 49-55, (1996).
- 462 Zeng, Q., Hong, W. Tan, Y. H. Mouse PRL-2 and PRL-3, two potentially prenylated protein tyrosine phosphatases homologous to PRL-1. *Biochem Biophys Res Commun* **244**, 421-427, (1998).
- 463 Montagna, M., Serova, O., Sylla, B. S., Feunteun, J. Lenoir, G. M. A 100-kb physical and transcriptional map around the EDH17B2 gene: identification of three novel genes and a pseudogene of a human homologue of the rat PRL-1 tyrosine phosphatase. *Hum Genet* **96**, 532-538, (1995).
- 464 Kozlov, G., Cheng, J., Ziomek, E., Banville, D., Gehring, K. Ekiel, I. Structural insights into molecular function of the metastasis-associated phosphatase PRL-3. *J Biol Chem* **279**, 11882-11889, (2004).
- 465 Sun, J. P., Wang, W. Q., Yang, H., Liu, S., Liang, F., Fedorov, A. A., . . . Zhang, Z. Y. Structure and biochemical properties of PRL-1, a phosphatase implicated in cell growth, differentiation, and tumor invasion. *Biochemistry* **44**, 12009-12021, (2005).
- 466 Jeong, D. G., Kim, S. J., Kim, J. H., Son, J. H., Park, M. R., Lim, S. M., . . . Ryu, S. E. Trimeric structure of PRL-1 phosphatase reveals an active enzyme conformation and regulation mechanisms. *J Mol Biol* **345**, 401-413, (2005).
- 467 Bessette, D. C., Qiu, D. Pallen, C. J. PRL PTPs: mediators and markers of cancer progression. *Cancer metastasis reviews* **27**, 231-252, (2008).
- 468 Al-Aidaros, A. Q. Zeng, Q. PRL-3 phosphatase and cancer metastasis. *J Cell Biochem* **111**, 1087-1098, (2010).
- 469 Stephens, B., Han, H., Hostetter, G., Demeure, M. J. Von Hoff, D. D. Small interfering RNA-mediated knockdown of PRL phosphatases results in altered Akt phosphorylation and reduced clonogenicity of pancreatic cancer cells. *Mol Cancer Ther* **7**, 202-210, (2008).
- 470 Hardy, S., Uetani, N., Wong, N., Kostantin, E., Labbe, D. P., Begin, L. R., . . . Tremblay, M. L. The protein tyrosine phosphatase PRL-2 interacts with the magnesium transporter CNNM3 to promote oncogenesis. *Oncogene* **34**, 986-995, (2015).
- 471 Dumauval, C. M., Sandusky, G. E., Crowell, P. L. Randall, S. K. Cellular localization of PRL-1 and PRL-2 gene expression in normal adult human tissues. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* **54**, 1401-1412, (2006).
- 472 Gungabeesoon, J., Tremblay, M. L. Uetani, N. Localizing PRL-2 expression and determining the effects of dietary Mg(2+) on expression levels. *Histochem Cell Biol* **146**, 99-111, (2016).
- 473 Lin, M. D., Lee, H. T., Wang, S. C., Li, H. R., Hsien, H. L., Cheng, K. W., . . . Chen, Y. H. Expression of phosphatase of regenerating liver family genes during embryogenesis: an evolutionary developmental analysis among Drosophila, amphioxus, and zebrafish. *BMC Dev Biol* **13**, 18, (2013).
- 474 Uetani, N., Hardy, S., Gravel, S.-P., Kiessling, S., Pietrobon, A., Wong, N. N., . . . Tremblay, M. L. PRL2 links magnesium flux and sex-dependent circadian metabolic rhythms. *JCI Insight* **2**, e91722, (2017).
- 475 Bai, Y., Zhou, H. M., Zhang, L., Dong, Y., Zeng, Q., Shou, W. Zhang, Z. Y. Role of phosphatase of regenerating liver 1 (PRL1) in spermatogenesis. *Sci Rep* **6**, 34211, (2016).
- 476 Kobayashi, M., Bai, Y., Dong, Y., Yu, H., Chen, S., Gao, R., . . . Liu, Y. PRL2/PTP4A2 phosphatase is important for hematopoietic stem cell self-renewal. *Stem Cells* **32**, 1956-1967, (2014).

- 477 Dong, Y., Zhang, L., Zhang, S., Bai, Y., Chen, H., Sun, X., . . . Zhang, Z. Y. Phosphatase of
regenerating liver 2 (PRL2) is essential for placental development by down-regulating PTEN
(Phosphatase and Tensin Homologue Deleted on Chromosome 10) and activating Akt protein.
287, 32172-32179, (2012).
- 478 Zimmerman, M. W., McQueeney, K. E., Isenberg, J. S., Pitt, B. R., Wasserloos, K. A., Homanics, G.
E.Lazo, J. S. Protein-tyrosine phosphatase 4A3 (PTP4A3) promotes vascular endothelial growth
factor signaling and enables endothelial cell motility. *J Biol Chem* **289**, 5904-5913, (2014).
- 479 Yan, H., Kong, D., Ge, X., Gao, X.Han, X. Generation of conditional knockout alleles for PRL-3. *J*
Biomed Res **25**, 438-443, (2011).
- 480 Stephens, B. J., Han, H., Gokhale, V.Von Hoff, D. D. PRL phosphatases as potential molecular
targets in cancer. *Mol Cancer Ther* **4**, 1653-1661, (2005).
- 481 Sun, J. P., Luo, Y., Yu, X., Wang, W. Q., Zhou, B., Liang, F.Zhang, Z. Y. Phosphatase activity,
trimerization, and the C-terminal polybasic region are all required for PRL1-mediated cell growth
and migration. *J Biol Chem* **282**, 29043-29051, (2007).
- 482 Wang, J., Kirby, C. E.Herbst, R. The tyrosine phosphatase PRL-1 localizes to the endoplasmic
reticulum and the mitotic spindle and is required for normal mitosis. *J Biol Chem* **277**, 46659-
46668, (2002).
- 483 Zeng, Q., Si, X., Horstmann, H., Xu, Y., Hong, W.Pallen, C. J. Prenylation-dependent association of
protein-tyrosine phosphatases PRL-1, -2, and -3 with the plasma membrane and the early
endosome. *J Biol Chem* **275**, 21444-21452, (2000).
- 484 Dursina, B., Reents, R., Delon, C., Wu, Y., Kulharia, M., Thutewohl, M., . . . Alexandrov, K.
Identification and specificity profiling of protein prenyltransferase inhibitors using new
fluorescent phosphoisoprenoids. *J Am Chem Soc* **128**, 2822-2835, (2006).
- 485 Fiordalisi, J. J., Keller, P. J.Cox, A. D. PRL tyrosine phosphatases regulate rho family GTPases to
promote invasion and motility. *Cancer Res* **66**, 3153-3161, (2006).
- 486 Wang, Y.Lazo, J. S. Metastasis-associated phosphatase PRL-2 regulates tumor cell migration and
invasion. *Oncogene* **31**, 818-827, (2012).
- 487 Fauman, E. B., Cogswell, J. P., Lovejoy, B., Rocque, W. J., Holmes, W., Montana, V. G., . . . Saper,
M. A. Crystal structure of the catalytic domain of the human cell cycle control phosphatase,
Cdc25A. *Cell* **93**, 617-625, (1998).
- 488 Lee, J. O., Yang, H., Georgescu, M. M., Di Cristofano, A., Maehama, T., Shi, Y., . . . Pavletich, N. P.
Crystal structure of the PTEN tumor suppressor: implications for its phosphoinositide
phosphatase activity and membrane association. *Cell* **99**, 323-334, (1999).
- 489 Meng, T. C., Fukada, T.Tonks, N. K. Reversible oxidation and inactivation of protein tyrosine
phosphatases in vivo. *Mol Cell* **9**, 387-399, (2002).
- 490 den Hertog, J., Groen, A.van der Wijk, T. Redox regulation of protein-tyrosine phosphatases.
Arch Biochem Biophys **434**, 11-15, (2005).
- 491 Salmeen, A., Andersen, J. N., Myers, M. P., Meng, T. C., Hinks, J. A., Tonks, N. K.Barford, D. Redox
regulation of protein tyrosine phosphatase 1B involves a sulphenyl-amide intermediate. *Nature*
423, 769-773, (2003).
- 492 Bae, Y. S., Kang, S. W., Seo, M. S., Baines, I. C., Tekle, E., Chock, P. B.Rhee, S. G. Epidermal growth
factor (EGF)-induced generation of hydrogen peroxide. Role in EGF receptor-mediated tyrosine
phosphorylation. *J Biol Chem* **272**, 217-221, (1997).
- 493 Salmeen, A.Barford, D. Functions and mechanisms of redox regulation of cysteine-based
phosphatases. *Antioxidants & redox signaling* **7**, 560-577, (2005).
- 494 Lei, K., Townsend, D. M.Tew, K. D. Protein cysteine sulfinic acid reductase (sulfiredoxin) as a
regulator of cell proliferation and drug response. *Oncogene* **27**, 4877-4887, (2008).

- 495 Ostman, A., Frijhoff, J., Sandin, A.Bohmer, F. D. Regulation of protein tyrosine phosphatases by reversible oxidation. *Journal of biochemistry* **150**, 345-356, (2011).
- 496 Funato, Y.Miki, H. Reversible oxidation of PRL family protein-tyrosine phosphatases. *Methods* **65**, 184-189, (2014).
- 497 Yu, L., Kelly, U., Ebright, J. N., Malek, G., Saloupis, P., Rickman, D. W., . . . Bowes Rickman, C. Oxidative stress-induced expression and modulation of Phosphatase of Regenerating Liver-1 (PRL-1) in mammalian retina. *Biochim Biophys Acta* **1773**, 1473-1482, (2007).
- 498 Gulerez, I., Funato, Y., Wu, H., Yang, M., Kozlov, G., Miki, H.Gehring, K. Phosphocysteine in the PRL-CNNM pathway mediates magnesium homeostasis. *EMBO Rep* **17**, 1890-1900, (2016).
- 499 Ishii, T., Funato, Y.Miki, H. Thioredoxin-related protein 32 (TRP32) specifically reduces oxidized phosphatase of regenerating liver (PRL). *J Biol Chem* **288**, 7263-7270, (2013).
- 500 Rios, P., Li, X.Kohn, M. Molecular mechanisms of the PRL phosphatases. *The FEBS journal* **280**, 505-524, (2013).
- 501 McParland, V., Varsano, G., Li, X., Thornton, J., Baby, J., Aravind, A., . . . Kohn, M. The metastasis-promoting phosphatase PRL-3 shows activity toward phosphoinositides. *Biochemistry* **50**, 7579-7590, (2011).
- 502 Kim, K. A., Song, J. S., Jee, J., Sheen, M. R., Lee, C., Lee, T. G., . . . Cheong, C. Structure of human PRL-3, the phosphatase associated with cancer metastasis. *FEBS Lett* **565**, 181-187, (2004).
- 503 Pascaru, M., Tanase, C., Vacaru, A. M., Boeti, P., Neagu, E., Popescu, I.Szedlacsek, S. E. Analysis of molecular determinants of PRL-3. *J Cell Mol Med* **13**, 3141-3150, (2009).
- 504 Orsatti, L., Forte, E., Tomei, L., Caterino, M., Pessi, A.Talamo, F. 2-D Difference in gel electrophoresis combined with Pro-Q Diamond staining: a successful approach for the identification of kinase/phosphatase targets. *Electrophoresis* **30**, 2469-2476, (2009).
- 505 Forte, E., Orsatti, L., Talamo, F., Barbato, G., De Francesco, R.Tomei, L. Ezrin is a specific and direct target of protein tyrosine phosphatase PRL-3. *Biochim Biophys Acta* **1783**, 334-344, (2008).
- 506 Peng, L., Jin, G., Wang, L., Guo, J., Meng, L.Shou, C. Identification of integrin alpha1 as an interacting protein of protein tyrosine phosphatase PRL-3. *Biochem Biophys Res Commun* **342**, 179-183, (2006).
- 507 Foy, M., Anezo, O., Saule, S.Planque, N. PRL-3/PTP4A3 phosphatase regulates integrin beta1 in adhesion structures during migration of human ocular melanoma cells. *Exp Cell Res* **353**, 88-99, (2017).
- 508 Wang, H., Quah, S. Y., Dong, J. M., Manser, E., Tang, J. P.Zeng, Q. PRL-3 down-regulates PTEN expression and signals through PI3K to promote epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Res* **67**, 2922-2926, (2007).
- 509 Mizuuchi, E., Semba, S., Kodama, Y.Yokozaki, H. Down-modulation of keratin 8 phosphorylation levels by PRL-3 contributes to colorectal carcinoma progression. *Int J Cancer* **124**, 1802-1810, (2009).
- 510 Jiang, Y., Liu, X. Q., Rajput, A., Geng, L., Ongchin, M., Zeng, Q., . . . Wang, J. Phosphatase PRL-3 is a direct regulatory target of TGFbeta in colon cancer metastasis. *Cancer Res* **71**, 234-244, (2011).
- 511 Funato, Y., Yamazaki, D., Mizukami, S., Du, L., Kikuchi, K.Miki, H. Membrane protein CNNM4-dependent Mg²⁺ efflux suppresses tumor progression. *The Journal of clinical investigation* **124**, 5398-5410, (2014).
- 512 Kostantin, E., Hardy, S., Valinsky, W. C., Kompatscher, A., de Baaij, J. H., Zolotarov, Y., . . . Tremblay, M. L. Inhibition of PRL-2.CNNM3 Protein Complex Formation Decreases Breast Cancer Proliferation and Tumor Growth. *J Biol Chem* **291**, 10716-10725, (2016).

- 513 Gimenez-Mascarell, P., Oyenarte, I., Hardy, S., Breiderhoff, T., Stuver, M., Kostantin, E., . . .
Martinez-Cruz, L. A. Structural Basis of the Oncogenic Interaction of Phosphatase PRL-1 with the
Magnesium Transporter CNNM2. *J Biol Chem* **292**, 786-801, (2017).
- 514 Zhang, H., Kozlov, G., Li, X., Wu, H., Gulerez, I., Gehring, K. PRL3 phosphatase active site is
required for binding the putative magnesium transporter CNNM3. *Sci Rep* **7**, 48, (2017).
- 515 Lorenz, U. Protein tyrosine phosphatase assays. *Curr Protoc Immunol* **Chapter 11**, Unit 11.17,
(2011).
- 516 Davis, R. L., Robinson, J. D. Characteristics of 3-O-methylfluorescein phosphate hydrolysis by the
(Na⁺ + K⁺)-ATPase. *J Bioenerg Biomembr* **20**, 571-584, (1988).
- 517 Gottlin, E. B., Xu, X., Epstein, D. M., Burke, S. P., Eckstein, J. W., Ballou, D. P., Dixon, J. E. Kinetic
analysis of the catalytic domain of human cdc25B. *J Biol Chem* **271**, 27445-27449, (1996).
- 518 Liang, F., Liang, J., Wang, W. Q., Sun, J. P., Udho, E., Zhang, Z. Y. PRL3 promotes cell invasion and
proliferation by down-regulation of Csk leading to Src activation. *J Biol Chem* **282**, 5413-5419,
(2007).
- 519 Wang, Q., Holmes, D. I., Powell, S. M., Lu, Q., Waxman, J. Analysis of stromal-epithelial
interactions in prostate cancer identifies PTPCAAX2 as a potential oncogene. *Cancer Lett* **175**,
63-69, (2002).
- 520 Mollevi, D. G., Aytes, A., Padulles, L., Martinez-Iniesta, M., Baixeras, N., Salazar, R., . . .
Villanueva, A. PRL-3 is essentially overexpressed in primary colorectal tumours and associates
with tumour aggressiveness. *Br J Cancer* **99**, 1718-1725, (2008).
- 521 Saha, S., Bardelli, A., Buckhaults, P., Velculescu, V. E., Rago, C., St Croix, B., . . . Vogelstein, B. A
phosphatase associated with metastasis of colorectal cancer. *Science* **294**, 1343-1346, (2001).
- 522 Peng, L., Ning, J., Meng, L., Shou, C. The association of the expression level of protein tyrosine
phosphatase PRL-3 protein with liver metastasis and prognosis of patients with colorectal
cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* **130**, 521-526, (2004).
- 523 Kato, H., Semba, S., Miskad, U. A., Seo, Y., Kasuga, M., Yokozaki, H. High expression of PRL-3
promotes cancer cell motility and liver metastasis in human colorectal cancer: a predictive
molecular marker of metachronous liver and lung metastases. *Clinical cancer research : an
official journal of the American Association for Cancer Research* **10**, 7318-7328, (2004).
- 524 Ooki, A., Yamashita, K., Kikuchi, S., Sakuramoto, S., Katada, N., Watanabe, M. Phosphatase of
regenerating liver-3 as a prognostic biomarker in histologically node-negative gastric cancer.
Oncol Rep **21**, 1467-1475, (2009).
- 525 Wang, Z., Cai, S. R., He, Y. L., Zhan, W. H., Zhang, C. H., Wu, H., . . . Song, W. Elevated PRL-3
expression was more frequently detected in the large primary gastric cancer and exhibits a poor
prognostic impact on the patients. *J Cancer Res Clin Oncol* **135**, 1041-1046, (2009).
- 526 Li, Z. R., Wang, Z., Zhu, B. H., He, Y. L., Peng, J. S., Cai, S. R., . . . Zhan, W. H. Association of
tyrosine PRL-3 phosphatase protein expression with peritoneal metastasis of gastric carcinoma
and prognosis. *Surg Today* **37**, 646-651, (2007).
- 527 Miskad, U. A., Semba, S., Kato, H., Yokozaki, H. Expression of PRL-3 phosphatase in human gastric
carcinomas: close correlation with invasion and metastasis. *Pathobiology* **71**, 176-184, (2004).
- 528 Polato, F., Codegoni, A., Fruscio, R., Perego, P., Mangioni, C., Saha, S., . . . Broggin, M. PRL-3
phosphatase is implicated in ovarian cancer growth. *Clinical cancer research : an official journal
of the American Association for Cancer Research* **11**, 6835-6839, (2005).
- 529 Ren, T., Jiang, B., Xing, X., Dong, B., Peng, L., Meng, L., . . . Shou, C. Prognostic significance of
phosphatase of regenerating liver-3 expression in ovarian cancer. *Pathology oncology research :
POR* **15**, 555-560, (2009).
- 530 Wang, L., Peng, L., Dong, B., Kong, L., Meng, L., Yan, L., . . . Shou, C. Overexpression of
phosphatase of regenerating liver-3 in breast cancer: association with a poor clinical outcome.

- Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* **17**, 1517-1522, (2006).
- 531 Radke, I., Gotte, M., Kersting, C., Mattsson, B., Kiesel, L., Wulfing, P. Expression and prognostic impact of the protein tyrosine phosphatases PRL-1, PRL-2, and PRL-3 in breast cancer. *Br J Cancer* **95**, 347-354, (2006).
- 532 Yeh, H. C., Huang, C. N., Li, C. C., Chang, L. L., Lin, H. H., Ke, H. L., . . . Wu, W. J. Overexpression of PTP4A3 is associated with metastasis and unfavorable prognosis in bladder cancer. *World J Urol* **34**, 835-846, (2016).
- 533 Yamashita, S., Masuda, Y., Matsumoto, K., Okumura, Y., Matsuzaki, H., Kurizaki, T., . . . Kawahara, K. Down-regulation of the human PRL-3 gene is associated with the metastasis of primary non-small cell lung cancer. *Annals of thoracic and cardiovascular surgery : official journal of the Association of Thoracic and Cardiovascular Surgeons of Asia* **13**, 236-239, (2007).
- 534 Kong, L., Li, Q., Wang, L., Liu, Z., Sun, T. The value and correlation between PRL-3 expression and matrix metalloproteinase activity and expression in human gliomas. *Neuropathology* **27**, 516-521, (2007).
- 535 Laurent, C., Valet, F., Planque, N., Silveri, L., Maacha, S., Anezo, O., . . . Saule, S. High PTP4A3 phosphatase expression correlates with metastatic risk in uveal melanoma patients. *Cancer Res* **71**, 666-674, (2011).
- 536 Wu, X., Zeng, H., Zhang, X., Zhao, Y., Sha, H., Ge, X., . . . Xu, Q. Phosphatase of regenerating liver-3 promotes motility and metastasis of mouse melanoma cells. *Am J Pathol* **164**, 2039-2054, (2004).
- 537 Zhou, J., Wang, S., Lu, J., Li, J., Ding, Y. Over-expression of phosphatase of regenerating liver-3 correlates with tumor progression and poor prognosis in nasopharyngeal carcinoma. *Int J Cancer* **124**, 1879-1886, (2009).
- 538 Zhou, J., Cheong, L. L., Liu, S. C., Chong, P. S., Mahara, S., Bi, C., . . . Chng, W. J. The pro-metastasis tyrosine phosphatase, PRL-3 (PTP4A3), is a novel mediator of oncogenic function of BCR-ABL in human chronic myeloid leukemia. *Mol Cancer* **11**, 72, (2012).
- 539 Broyl, A., Hose, D., Lokhorst, H., de Knecht, Y., Peeters, J., Jauch, A., . . . Sonneveld, P. Gene expression profiling for molecular classification of multiple myeloma in newly diagnosed patients. *Blood* **116**, 2543-2553, (2010).
- 540 Bardelli, A., Saha, S., Sager, J. A., Romans, K. E., Xin, B., Markowitz, S. D., . . . Vogelstein, B. PRL-3 expression in metastatic cancers. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **9**, 5607-5615, (2003).
- 541 Guzinska-Ustymowicz, K., Pryczynicz, A. PRL-3, an emerging marker of carcinogenesis, is strongly associated with poor prognosis. *Anticancer Agents Med Chem* **11**, 99-108, (2011).
- 542 Wang, Y., Li, Z. F., He, J., Li, Y. L., Zhu, G. B., Zhang, L. H., Li, Y. L. Expression of the human phosphatases of regenerating liver (PRLs) in colonic adenocarcinoma and its correlation with lymph node metastasis. *Int J Colorectal Dis* **22**, 1179-1184, (2007).
- 543 Liu, Y. Q., Li, H. X., Lou, X., Lei, J. Y. Expression of phosphatase of regenerating liver 1 and 3 mRNA in esophageal squamous cell carcinoma. *Archives of pathology & laboratory medicine* **132**, 1307-1312, (2008).
- 544 Luo, Y., Liang, F., Zhang, Z. Y. PRL1 promotes cell migration and invasion by increasing MMP2 and MMP9 expression through Src and ERK1/2 pathways. *Biochemistry* **48**, 1838-1846, (2009).
- 545 Nakashima, M., Lazo, J. S. Phosphatase of regenerating liver-1 promotes cell migration and invasion and regulates filamentous actin dynamics. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **334**, 627-633, (2010).

- 546 Hardy, S., Wong, N. N., Muller, W. J., Park, M., Tremblay, M. L. Overexpression of the protein tyrosine phosphatase PRL-2 correlates with breast tumor formation and progression. *Cancer Res* **70**, 8959-8967, (2010).
- 547 Kobayashi, M., Chen, S., Bai, Y., Yao, C., Gao, R., Sun, X. J., . . . Liu, Y. Phosphatase PRL2 promotes AML1-ETO-induced acute myeloid leukemia. *Leukemia* **31**, 1453-1457, (2017).
- 548 Akiyama, S., Dhavan, D., Yi, T. PRL-2 increases Epo and IL-3 responses in hematopoietic cells. *Blood cells, molecules & diseases* **44**, 209-214, (2010).
- 549 Yagi, T., Morimoto, A., Eguchi, M., Hibi, S., Sako, M., Ishii, E., . . . Ichikawa, H. Identification of a gene expression signature associated with pediatric AML prognosis. *Blood* **102**, 1849-1856, (2003).
- 550 Dumauval, C. M., Sandusky, G. E., Soo, H. W., Werner, S. R., Crowell, P. L., Randall, S. K. Tissue-specific alterations of PRL-1 and PRL-2 expression in cancer. *Am J Transl Res* **4**, 83-101, (2012).
- 551 Wang, H., Vardy, L. A., Tan, C. P., Loo, J. M., Guo, K., Li, J., . . . Zeng, Q. PCBP1 suppresses the translation of metastasis-associated PRL-3 phosphatase. *Cancer Cell* **18**, 52-62, (2010).
- 552 Peng, L., Xing, X., Li, W., Qu, L., Meng, L., Lian, S., . . . Shou, C. PRL-3 promotes the motility, invasion, and metastasis of LoVo colon cancer cells through PRL-3-integrin beta1-ERK1/2 and-MMP2 signaling. *Mol Cancer* **8**, 110, (2009).
- 553 Al-Aidaros, A. Q., Yuen, H. F., Guo, K., Zhang, S. D., Chung, T. H., Chng, W. J., Zeng, Q. Metastasis-associated PRL-3 induces EGFR activation and addiction in cancer cells. *The Journal of clinical investigation* **123**, 3459-3471, (2013).
- 554 Ye, Z., Al-Aidaros, A. Q., Park, J. E., Yuen, H. F., Zhang, S. D., Gupta, A., . . . Zeng, Q. PRL-3 activates mTORC1 in Cancer Progression. *Sci Rep* **5**, 17046, (2015).
- 555 Liu, Y., Zhou, J., Chen, J., Gao, W., Le, Y., Ding, Y., Li, J. PRL-3 promotes epithelial mesenchymal transition by regulating cadherin directly. *Cancer biology & therapy* **8**, 1352-1359, (2009).
- 556 Meng, F., Wu, G. The rejuvenated scenario of epithelial-mesenchymal transition (EMT) and cancer metastasis. *Cancer metastasis reviews* **31**, 455-467, (2012).
- 557 Prczynicz, A., Guzinska-Ustymowicz, K., Niewiarowska, K., Cepowicz, D., Kemon, A. PRL-3 and E-cadherin show mutual interactions and participate in lymph node metastasis formation in gastric cancer. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* **35**, 6587-6592, (2014).
- 558 Xiong, J., Li, Z., Zhang, Y., Li, D., Zhang, G., Luo, X., . . . Chen, H. PRL-3 promotes the peritoneal metastasis of gastric cancer through the PI3K/Akt signaling pathway by regulating PTEN. *Oncol Rep* **36**, 1819-1828, (2016).
- 559 Larue, L., Bellacosa, A. Epithelial-mesenchymal transition in development and cancer: role of phosphatidylinositol 3' kinase/AKT pathways. *Oncogene* **24**, 7443-7454, (2005).
- 560 Jin, S., Wang, K., Xu, K., Xu, J., Sun, J., Chu, Z., . . . Yin, D. Oncogenic function and prognostic significance of protein tyrosine phosphatase PRL-1 in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget* **5**, 3685-3696, (2014).
- 561 Mitra, S. K., Hanson, D. A., Schlaepfer, D. D. Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. *Nature reviews. Molecular cell biology* **6**, 56-68, (2005).
- 562 Li, L., Okura, M., Imamoto, A. Focal adhesions require catalytic activity of Src family kinases to mediate integrin-matrix adhesion. *Mol Cell Biol* **22**, 1203-1217, (2002).
- 563 Yeatman, T. J. A renaissance for SRC. *Nature reviews. Cancer* **4**, 470-480, (2004).
- 564 Martin, G. S. The hunting of the Src. *Nature reviews. Molecular cell biology* **2**, 467-475, (2001).
- 565 Huvoneers, S., Danen, E. H. Adhesion signaling - crosstalk between integrins, Src and Rho. *J Cell Sci* **122**, 1059-1069, (2009).
- 566 Achiwa, H., Lazo, J. S. PRL-1 tyrosine phosphatase regulates c-Src levels, adherence, and invasion in human lung cancer cells. *Cancer Res* **67**, 643-650, (2007).

- 567 Liang, F., Luo, Y., Dong, Y., Walls, C. D., Liang, J., Jiang, H. Y., . . . Zhang, Z. Y. Translational control of C-terminal Src kinase (Csk) expression by PRL3 phosphatase. *J Biol Chem* **283**, 10339-10346, (2008).
- 568 Sacchetti, C., Bai, Y., Stanford, S. M., Di Benedetto, P., Cipriani, P., Santelli, E., . . . Bottini, N. PTP4A1 promotes TGFbeta signaling and fibrosis in systemic sclerosis. *Nat Commun* **8**, 1060, (2017).
- 569 Daouti, S., Li, W. H., Qian, H., Huang, K. S., Holmgren, J., Levin, W., . . . Niu, H. A selective phosphatase of regenerating liver phosphatase inhibitor suppresses tumor cell anchorage-independent growth by a novel mechanism involving p130Cas cleavage. *Cancer Res* **68**, 1162-1169, (2008).
- 570 Gari, H. H., DeGala, G. D., Ray, R., Lucia, M. S. Lambert, J. R. PRL-3 engages the focal adhesion pathway in triple-negative breast cancer cells to alter actin structure and substrate adhesion properties critical for cell migration and invasion. *Cancer Lett* **380**, 505-512, (2016).
- 571 Lee, S. K., Han, Y. M., Yun, J., Lee, C. W., Shin, D. S., Ha, Y. R., . . . Kwon, B. M. Phosphatase of regenerating liver-3 promotes migration and invasion by upregulating matrix metalloproteinases-7 in human colorectal cancer cells. *Int J Cancer* **131**, E190-203, (2012).
- 572 Mayinuer, A., Yasen, M., Mogushi, K., Obulhasim, G., Xieraili, M., Aihara, A., . . . Arij, S. Upregulation of protein tyrosine phosphatase type IVA member 3 (PTP4A3/PRL-3) is associated with tumor differentiation and a poor prognosis in human hepatocellular carcinoma. *Ann Surg Oncol* **20**, 305-317, (2013).
- 573 Zhao, W. B., Li, Y., Liu, X., Zhang, L. Y. Wang, X. Evaluation of PRL-3 expression, and its correlation with angiogenesis and invasion in hepatocellular carcinoma. *Int J Mol Med* **22**, 187-192, (2008).
- 574 Basak, S., Jacobs, S. B., Krieg, A. J., Pathak, N., Zeng, Q., Kaldis, P., . . . Attardi, L. D. The metastasis-associated gene Prl-3 is a p53 target involved in cell-cycle regulation. *Mol Cell* **30**, 303-314, (2008).
- 575 Werner, S. R., Lee, P. A., DeCamp, M. W., Crowell, D. N., Randall, S. K. Crowell, P. L. Enhanced cell cycle progression and down regulation of p21(Cip1/Waf1) by PRL tyrosine phosphatases. *Cancer Lett* **202**, 201-211, (2003).
- 576 Guo, K., Li, J., Wang, H., Osato, M., Tang, J. P., Quah, S. Y., . . . Zeng, Q. PRL-3 initiates tumor angiogenesis by recruiting endothelial cells in vitro and in vivo. *Cancer Res* **66**, 9625-9635, (2006).
- 577 Itoh, T., Tanioka, M., Yoshida, H., Yoshioka, T., Nishimoto, H. Itohara, S. Reduced angiogenesis and tumor progression in gelatinase A-deficient mice. *Cancer Res* **58**, 1048-1051, (1998).
- 578 Fang, J., Shing, Y., Wiederschain, D., Yan, L., Butterfield, C., Jackson, G., . . . Moses, M. A. Matrix metalloproteinase-2 is required for the switch to the angiogenic phenotype in a tumor model. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 3884-3889, (2000).
- 579 Vu, T. H., Shipley, J. M., Bergers, G., Berger, J. E., Helms, J. A., Hanahan, D., . . . Werb, Z. MMP-9/gelatinase B is a key regulator of growth plate angiogenesis and apoptosis of hypertrophic chondrocytes. *Cell* **93**, 411-422, (1998).
- 580 Ming, J., Liu, N., Gu, Y., Qiu, X. Wang, E. H. PRL-3 facilitates angiogenesis and metastasis by increasing ERK phosphorylation and up-regulating the levels and activities of Rho-A/C in lung cancer. *Pathology* **41**, 118-126, (2009).
- 581 Guo, K., Li, J., Tang, J. P., Koh, V., Gan, B. Q. Zeng, Q. Catalytic domain of PRL-3 plays an essential role in tumor metastasis: formation of PRL-3 tumors inside the blood vessels. *Cancer biology & therapy* **3**, 945-951, (2004).
- 582 St Croix, B., Rago, C., Velculescu, V., Traverso, G., Romans, K. E., Montgomery, E., . . . Kinzler, K. W. Genes expressed in human tumor endothelium. *Science* **289**, 1197-1202, (2000).

- 583 Rouleau, C., Roy, A., St Martin, T., Dufault, M. R., Boutin, P., Liu, D., . . . Teicher, B. A. Protein tyrosine phosphatase PRL-3 in malignant cells and endothelial cells: expression and function. *Mol Cancer Ther* **5**, 219-229, (2006).
- 584 Aird, W. C. Molecular heterogeneity of tumor endothelium. *Cell Tissue Res* **335**, 271-281, (2009).
- 585 Parker, B. S., Argani, P., Cook, B. P., Liangfeng, H., Chartrand, S. D., Zhang, M., . . . Madden, S. L. Alterations in vascular gene expression in invasive breast carcinoma. *Cancer Res* **64**, 7857-7866, (2004).
- 586 Velculescu, V. E., Zhang, L., Vogelstein, B. Kinzler, K. W. Serial analysis of gene expression. *Science* **270**, 484-487, (1995).
- 587 Sager, J. A., Benvenuti, S. Bardelli, A. PRL-3: a phosphatase for metastasis? *Cancer biology & therapy* **3**, 952-953, (2004).
- 588 Nelson, J., Bagnato, A., Battistini, B. Nisen, P. The endothelin axis: emerging role in cancer. *Nature reviews. Cancer* **3**, 110-116, (2003).
- 589 Xu, J., Cao, S., Wang, L., Xu, R., Chen, G. Xu, Q. VEGF promotes the transcription of the human PRL-3 gene in HUVEC through transcription factor MEF2C. *PLoS One* **6**, e27165, (2011).
- 590 Sacilotto, N., Chouliaras, K. M., Nikitenko, L. L., Lu, Y. W., Fritzsche, M., Wallace, M. D., . . . De Val, S. MEF2 transcription factors are key regulators of sprouting angiogenesis. *Genes & development* **30**, 2297-2309, (2016).
- 591 Hartley, J. L., Temple, G. F. Brasch, M. A. DNA cloning using in vitro site-specific recombination. *Genome research* **10**, 1788-1795, (2000).
- 592 Vernon, W. B. The role of magnesium in nucleic-acid and protein metabolism. *Magnesium* **7**, 234-248, (1988).
- 593 Egeblad, M. Werb, Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nature reviews. Cancer* **2**, 161-174, (2002).
- 594 Coussens, L. M. Werb, Z. Matrix metalloproteinases and the development of cancer. *Chemistry & biology* **3**, 895-904, (1996).
- 595 Louis, D. N., Perry, A., Reifenberger, G., von Deimling, A., Figarella-Branger, D., Cavenee, W. K., . . . Ellison, D. W. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta neuropathologica* **131**, 803-820, (2016).
- 596 Dolecek, T. A., Propp, J. M., Stroup, N. E. Kruchko, C. CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2005-2009. *Neuro Oncol* **14 Suppl 5**, v1-49, (2012).
- 597 Stupp, R., Hegi, M. E., Mason, W. P., van den Bent, M. J., Taphoorn, M. J., Janzer, R. C., . . . Mirimanoff, R. O. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *The Lancet. Oncology* **10**, 459-466, (2009).
- 598 Stupp, R., Mason, W. P., van den Bent, M. J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M. J., . . . Mirimanoff, R. O. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *The New England journal of medicine* **352**, 987-996, (2005).
- 599 Friedman, H. S., Kerby, T. Calvert, H. Temozolomide and treatment of malignant glioma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **6**, 2585-2597, (2000).
- 600 Denny, B. J., Wheelhouse, R. T., Stevens, M. F., Tsang, L. L. Slack, J. A. NMR and molecular modeling investigation of the mechanism of activation of the antitumor drug temozolomide and its interaction with DNA. *Biochemistry* **33**, 9045-9051, (1994).
- 601 Norden, A. D., Drappatz, J. Wen, P. Y. Antiangiogenic therapies for high-grade glioma. *Nature reviews. Neurology* **5**, 610-620, (2009).

- 602 Nagpal, S., Harsh, G.Recht, L. Bevacizumab improves quality of life in patients with recurrent glioblastoma. *Chemotherapy research and practice* **2011**, 602812, (2011).
- 603 Cohen, M. H., Shen, Y. L., Keegan, P.Pazdur, R. FDA drug approval summary: bevacizumab (Avastin) as treatment of recurrent glioblastoma multiforme. *The oncologist* **14**, 1131-1138, (2009).
- 604 Verhoeff, J. J., van Tellingen, O., Claes, A., Stalpers, L. J., van Linde, M. E., Richel, D. J., . . . van Furth, W. R. Concerns about anti-angiogenic treatment in patients with glioblastoma multiforme. *BMC cancer* **9**, 444, (2009).
- 605 Seystahl, K., Wick, W.Weller, M. Therapeutic options in recurrent glioblastoma--An update. *Crit Rev Oncol Hematol* **99**, 389-408, (2016).
- 606 Elchebly, M., Wagner, J., Kennedy, T. E., Lanctot, C., Michaliszyn, E., Itie, A., . . . Tremblay, M. L. Neuroendocrine dysplasia in mice lacking protein tyrosine phosphatase sigma. *Nat Genet* **21**, 330-333, (1999).
- 607 Meathrel, K., Adamek, T., Batt, J., Rotin, D.Doering, L. C. Protein tyrosine phosphatase sigma-deficient mice show aberrant cytoarchitecture and structural abnormalities in the central nervous system. *Journal of neuroscience research* **70**, 24-35, (2002).
- 608 Fox, A. N.Zinn, K. The heparan sulfate proteoglycan syndecan is an in vivo ligand for the Drosophila LAR receptor tyrosine phosphatase. *Current biology : CB* **15**, 1701-1711, (2005).
- 609 Morris, L. G., Taylor, B. S., Bivona, T. G., Gong, Y., Eng, S., Brennan, C. W., . . . Chan, T. A. Genomic dissection of the epidermal growth factor receptor (EGFR)/PI3K pathway reveals frequent deletion of the EGFR phosphatase PTPRS in head and neck cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 19024-19029, (2011).
- 610 Wang, Z. C., Gao, Q., Shi, J. Y., Guo, W. J., Yang, L. X., Liu, X. Y., . . . Fan, J. Protein tyrosine phosphatase receptor S acts as a metastatic suppressor in hepatocellular carcinoma by control of epidermal growth factor receptor-induced epithelial-mesenchymal transition. *Hepatology (Baltimore, Md.)* **62**, 1201-1214, (2015).
- 611 Parsons, D. W., Jones, S., Zhang, X., Lin, J. C., Leary, R. J., Angenendt, P., . . . Kinzler, K. W. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science* **321**, 1807-1812, (2008).
- 612 Humphrey, P. A., Wong, A. J., Vogelstein, B., Friedman, H. S., Werner, M. H., Bigner, D. D.Bigner, S. H. Amplification and expression of the epidermal growth factor receptor gene in human glioma xenografts. *Cancer Res* **48**, 2231-2238, (1988).
- 613 Smith, J. S., Tachibana, I., Passe, S. M., Huntley, B. K., Borell, T. J., Iturria, N., . . . Jenkins, R. B. PTEN mutation, EGFR amplification, and outcome in patients with anaplastic astrocytoma and glioblastoma multiforme. *Journal of the National Cancer Institute* **93**, 1246-1256, (2001).
- 614 Omuro, A. M., Faivre, S.Raymond, E. Lessons learned in the development of targeted therapy for malignant gliomas. *Mol Cancer Ther* **6**, 1909-1919, (2007).
- 615 Sugawa, N., Ekstrand, A. J., James, C. D.Collins, V. P. Identical splicing of aberrant epidermal growth factor receptor transcripts from amplified rearranged genes in human glioblastomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 8602-8606, (1990).
- 616 Eskilsson, E., Rosland, G. V., Talasila, K. M., Knappskog, S., Keunen, O., Sottoriva, A., . . . Miletic, H. EGFRvIII mutations can emerge as late and heterogenous events in glioblastoma development and promote angiogenesis through Src activation. *Neuro Oncol* **18**, 1644-1655, (2016).
- 617 D'Asti, E., Chennakrishnaiah, S., Lee, T. H.Rak, J. Extracellular Vesicles in Brain Tumor Progression. *Cellular and molecular neurobiology* **36**, 383-407, (2016).
- 618 Magnus, N., Meehan, B., Garnier, D., Hashemi, M., Montermini, L., Lee, T. H., . . . Rak, J. The contribution of tumor and host tissue factor expression to oncogene-driven gliomagenesis. *Biochem Biophys Res Commun* **454**, 262-268, (2014).

- 619 Leung, B. M., Leshner-Perez, S. C., Matsuoka, T., Moraes, C. Takayama, S. Media additives to promote spheroid circularity and compactness in hanging drop platform. *Biomaterials science* **3**, 336-344, (2015).
- 620 Hille, F. Charpentier, E. CRISPR-Cas: biology, mechanisms and relevance. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* **371**, (2016).
- 621 Mali, P., Yang, L., Esvelt, K. M., Aach, J., Guell, M., DiCarlo, J. E., . . . Church, G. M. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science* **339**, 823-826, (2013).
- 622 Ribatti, D. The chick embryo chorioallantoic membrane as a model for tumor biology. *Exp Cell Res* **328**, 314-324, (2014).
- 623 Monvoisin, A., Alva, J. A., Hofmann, J. J., Zovein, A. C., Lane, T. F. Iruela-Arispe, M. L. VE-cadherin-CreERT2 transgenic mouse: a model for inducible recombination in the endothelium. *Dev Dyn* **235**, 3413-3422, (2006).
- 624 Petrovic, J., Galvez, H., Neves, J., Abello, G. Giraldez, F. Differential regulation of Hes/Hey genes during inner ear development. *Developmental neurobiology* **75**, 703-720, (2015).
- 625 Ho, M., Hoke, D. E., Chua, Y. J., Li, Q. X., Culvenor, J. G., Masters, C., . . . Evin, G. Effect of Metal Chelators on gamma-Secretase Indicates That Calcium and Magnesium Ions Facilitate Cleavage of Alzheimer Amyloid Precursor Substrate. *International journal of Alzheimer's disease* **2011**, 950932, (2010).
- 626 Posti, J. P., Bori, M., Kauko, T., Sankinen, M., Nordberg, J., Rahi, M., . . . Sipila, J. O. Presenting symptoms of glioma in adults. *Acta neurologica Scandinavica* **131**, 88-93, (2015).