



HAL
open science

Une mutation ponctuelle, Y685F dans le cytoplasmique domaine de la VE-cadhérine affecte la transcriptomique endothéliale: des études fondamentales aux applications cliniques

Olivia Garnier

► **To cite this version:**

Olivia Garnier. Une mutation ponctuelle, Y685F dans le cytoplasmique domaine de la VE-cadhérine affecte la transcriptomique endothéliale: des études fondamentales aux applications cliniques. Biologie cellulaire. Université Grenoble Alpes [2020-..], 2023. Français. NNT : 2023GRALV099 . tel-04556676

HAL Id: tel-04556676

<https://theses.hal.science/tel-04556676>

Submitted on 23 Apr 2024

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

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

École doctorale : CSV- Chimie et Sciences du Vivant

Spécialité : Biologie cellulaire

Unité de recherche : BGE - Laboratoire Biosciences et bioingénierie pour la Santé

Une mutation ponctuelle, Y685F dans le cytoplasmique domaine de la VE-cadhérine affecte la transcriptomique endothéliale : des études fondamentales aux applications cliniques

A single point mutation Y685F within the VE-cadherin cytoplasmic domain affects endothelial transcriptomic: from fundamental studies to clinical applications.

Présentée par :

Olivia GARNIER

Direction de thèse :

Isabelle VILGRAIN

DIRECTEUR DE RECHERCHE, Université Grenoble Alpes

Directrice de thèse

Rapporteurs :

Gilles PAGES

DIRECTEUR DE RECHERCHE, INSERM délégation PACA-Corse

Olivia LENOIR

CHARGÉE DE RECHERCHE HDR, INSERM délégation Ile-de-France

Thèse soutenue publiquement le **29 novembre 2023**, devant le jury composé de :

Christophe RIBUOT,

PROFESSEUR DES UNIVERSITÉS, Université Grenoble Alpes

Président

Isabelle VILGRAIN,

DIRECTRICE DE RECHERCHE, CNRS délégation Alpes

Directrice de thèse

Gilles PAGES,

DIRECTEUR DE RECHERCHE, INSERM délégation PACA-Corse

Rapporteur

Olivia LENOIR,

CHARGÉE DE RECHERCHE HDR, INSERM délégation Ile-de-France

Rapporteuse

Barbara GARMY-SUSINI,

DIRECTRICE DE RECHERCHE, INSERM délégation Occitanie

Examinatrice

Pyrénées

Donald MARTIN,

PROFESSEUR DES UNIVERSITÉS, Université Grenoble Alpes

Examineur



Remerciements

Cette thèse est l'aboutissement de plusieurs années de travail rendu possible grâce aux soutiens de nombreuses personnes physiques et morales sans lesquelles, elle n'aurait pas pu avoir lieu. Je souhaite remercier en premier lieu le labex GRAL (Grenoble Alliance for Integrated Structural and Cell Biology) pour avoir financé mes 3 années de doctorat.

Je remercie l'ensemble des membres du jury d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse. Merci à Gilles PAGES et Olivia LENOIR qui ont très gentilement accepté d'être rapporteurs de mon travail de ma thèse. Merci également aux examinateurs Donald MARTIN, Barbara GARMY-SUSINI et Christophe RIBUOT d'avoir accepté d'examiner mon travail. Enfin, encore merci à Christophe RIBUOT d'avoir présidé mon jury de thèse. Merci pour votre disponibilité.

Je remercie Isabelle VILGRAIN, ma directrice de thèse, de m'avoir fait confiance pendant ces trois années, de m'avoir partagé son expertise, de m'avoir beaucoup aidé dans la rédaction des articles et du manuscrit. Je suis particulièrement reconnaissante pour son accompagnement et son soutien ainsi que sa gentillesse sans faille tout au long de cette thèse. Je tenais à la remercier de m'avoir fait partager sa passion pour la recherche toujours aussi vigoureuse, toutes ses théories qui donnaient envie de les vérifier par les expériences et sa vision du monde scientifique.

Je remercie également toute l'équipe BIOMICS de nous avoir accueillis chaleureusement en plein milieu de ma thèse, de nous avoir libéré de la place dans votre labo pour nous installer, de nous avoir aidé pour le déménagement et d'avoir toujours été bienveillant avec nous malgré la divergence du modèle utilisé et du sujet. Merci d'avoir toujours été disponible pour répondre à mes questions, pour me donner des conseils, de m'avoir formé aux nouveaux appareils, de m'avoir consacré du temps et d'avoir toujours été à l'écoute. Merci beaucoup pour cette ambiance bienveillante.

Je remercie également Aude SALOMON, Violaine SIMON qui pendant ma première année ont toujours été présentes et bienveillantes pour m'aider dans la mise au point des protocoles, à la formation des techniques et toujours pris le temps de répondre à mes interrogations. Je voulais aussi remercier infiniment Aude DURAND, Eva FAUROBERT, Mylène PIZET, Gilles CARPENTIER, Marco SAPORANO, Arnold FERTIN et Donald MARTIN pour le précieux temps qu'ils m'ont accordé, leur patience, et leur conseil et de m'avoir fait partager leur passion. Je remercie également SERGENT Frédéric qui a été d'un vrai soutien au cours de cette thèse. Il a toujours été d'une grande écoute, d'une grande bonté et toujours prêt à m'accorder du temps dans son emploi du temps bien chargé pour m'aider ou me donner des conseils techniques. Ce fut un véritable plaisir de l'avoir en voisin de paillasse.

Je remercie également Charlène MAGALLON et Soumalamy BAMA-TOUPET pour leur aide précieuse à l'animalerie, d'avoir pris le temps de me conseiller, de m'aider à gérer l'élevage de souris et de leur sourire à chacune de mes visites à l'animalerie.

Je tenais également à rendre hommage aux souris qui ont servi aux expériences. Je n'aurai pas pu accomplir tout ce travail sans elles. Elles ont pris une place majeure dans l'avancement de mon projet et dans la contribution des connaissances scientifiques.

Pour finir, je voudrais remercier ma famille, mon frère Geoffrey et mes parents Sandrine et Thierry pour toujours avoir su m'épauler, m'écouter même s'ils ne connaissent pas trop le monde scientifique, de m'avoir soutenu dans les plus grands moments de doute, de m'avoir toujours encouragé dans tous mes choix depuis que je sais lire et écrire. Merci d'avoir toujours été des parents attentionnés et présents à mes côtés. Merci également à mes amies Morgane et Laetitia qui bien que notre rythme de vie évolue et que les impératifs de la vie font que l'on se voit moins, ont toujours donné lieu à des moments uniques quand on se voyait, et à de grands moments de rire qui me permettait de me sortir la tête des expériences râtées. Je remercie également Fifi, ma chienne de m'avoir toujours accueillie après une longue journée avec le grand sourire et ses demandes de caresses, de m'avoir remonté le moral en te voyant te frotter joyeusement dans l'herbe et gambader au milieu des chemins de randonnée en Chartreuse, Belledonne et Vercors. Et enfin je tenais à remercier du fond du cœur, mon jeune mari, Laurent qui a toujours été d'un immense soutien, toujours prêt à m'aider. Merci beaucoup de m'avoir toujours écouté attentivement même si parfois je commençais la discussion sans contexte. Il est mon confident, mon roc en qui je peux compter quelque soit la situation, une personne remarquable qui sait instantanément me faire rire parfois malgré lui et a toujours ri à mes blagues souvent pas drôles. Merci beaucoup de faire parti de cette aventure.

TABLE DES MATIERES

Liste des abréviations.....	7
Table des figures.....	10
Préambule.....	12
Partie I : Introduction sur l'endothélium des vaisseaux sanguins.....	13
CHAPITRE I : Le système cardiovasculaire.....	14
Introduction.....	14
I.1.Le système vasculaire.....	14
I.1.1. La circulation systémique.....	15
I.1.1.1. Le réseau artériel.....	15
I.1.1.2. Le réseau artériolaire.....	16
I.1.1.3. Le réseau capillaire.....	17
I.1.1.4. Le réseau veineux.....	19
I.1.2. Le système pulmonaire.....	20
I.1.2.1. Constituants cellulaires du poumon.....	22
I.1.2.1.A. L'épithélium alvéolaire.....	22
I.1.2.1.B. Les macrophages alvéolaires.....	23
I.1.2.1.C. Les fibroblastes.....	24
I.1.2.1.D. L'endothélium dans le poumon.....	24
I.1.2.2. Les fonctions de l'endothélium pulmonaire.....	25
I.1.2.2.A. Intégrité de la barrière pour le transport de l'oxygène et des nutriments.....	25
I.1.2.2.B. Régulation du système immunitaire.....	26
I.1.2.3. Les pathologies pulmonaires.....	26
I.1.2.3.A. ALI et ARDS.....	26
I.1.2.3.B. Hypertension pulmonaire.....	27
I.1.2.3.C. La fibrose pulmonaire idiopathique (FPI).....	27
I.1.2.3.D. Bronchopneumopathie chronique obstructive.....	28
Chronic obstructive pulmonary disease (COPD)	
I.1.3. L'angiogenèse.....	29
I.1.3.1. Les différents moyens de formation des vaisseaux.....	29
I.1.3.1.A. L'angiogenèse par bourgeonnement.....	29
I.1.3.1.B. L'angiogenèse par intussusception.....	31
I.1.3.1.C. La vasculogenèse.....	32
I.1.3.2. VEGF, acteur central de l'angiogenèse.....	32
I.1.3.2.A. La famille de VEGF.....	32
I.1.3.2.B. VEGF ou VEGF-A.....	33
I.1.3.2.C. Les récepteurs de VEGF.....	34

I.2. Les cellules endothéliales et leur hétérogénéité	37
I.2.1. La structure des cellules endothéliales	38
I.2.1.1. Le glycocalyx.....	41
I.2.2. L'hétérogénéité des cellules endothéliales	42
I.2.3 Les fonctions des cellules endothéliales	43
I.2.3.1. Perméabilité.....	43
I.2.3.2. La diapédèse des leucocytes	43
I.2.3.3. La thrombose.....	45
I.2.3.4. Le tonus vasculaire.....	46
I.2.3.4.A La régulation de la vasomotricité	46
I.2.3.4.A.1 La régulation de la vasodilatation.....	47
I.2.3.4.A.2. La régulation de la vasoconstriction.....	49
I.2.3.4.B. L'hétérogénéité du tonus vasculaire.....	50
I.2.4. Le programme transcriptionnel des cellules endothéliales.....	51

CHAPITRE II: Les jonctions endothéliales.....53

II.1. Les jonctions gaps	54
II.2. Les jonctions serrées	55
II.3. Les jonctions d'adhérence.....	57

CHAPITRE III : La VE-cadhérine et ses fonctions..... 58

III.1. Structure de la VE-cadhérine.....	58
III.2. Les partenaires de la VE-cadhérine	59
III.3. Les fonctions de la cellule endothéliale et l'implication de la VE-cadhérine	65
III.3.1. L'angiogénèse.....	65
III.3.2. L'angiogénèse pathologique et la VE-cadhérine.....	67
III.3.3. La régulation du trafic des leucocytes et le rôle de la VE-cadhérine.....	67
III.3.4. La perméabilité.....	69
III.3.4.1. L'induction de la perméabilité	69
III.3.4.2. Stabilité de l'endothélium.....	72
Conclusion.....	73

CHAPITRE IV: Objectifs de thèse.....74

PARTIE 2: Contribution de la Tyrosine Y685 VE-cadhérine dans la reprogrammation de la cellule endothéliale du poumon 75

CHAPITRE I: Analyse du profil transcriptomique et des voies de signalisations des cellules endothéliales microvasculaires des poumons de souris porteuse de la mutation Y685F VE-cadhérine ...76

I.1.Objectifs de l'étude.....	76
I.2.Principaux résultats de l'étude	76
I.3. Article:	
<i>Transcriptomic profiling and pathway analysis of mouse lung microvascular endothelial cells with Y685F VE-cadherin knock-in</i>	<i>79</i>
I.4. Revue	
<i>Dialogue between VE-Cadherin and Sphingosine 1 Phosphate Receptor1 (S1PR1) for Protecting Endothelial Functions.....</i>	<i>141</i>
I.5.Conclusion de l'article et perspectives.....	155

CHAPITRE II : Les sphéroïdes de microtumeur fournissent un modèle pour l'étude des molécules impliquées dans l'organisation vasculaire : le cas de la VE-cadhérine..... 157

II.1. Contexte et objectif d'étude	157
II.2. Les principaux résultats.....	158
II.3. Article:	
<i>Microtumor Spheroids Provide a Model for Studying Molecules Involved in Vascular Organization: An Illustrative Study for VE-cadherin.....</i>	<i>159</i>
II.4. Conclusion et perspectives	172

Chapitre III : Mécanisme moléculaire de l'endothéliatis dans l'infection par SARS-COV-2 : évidence du clivage de la VE-cadhérine par ACE2 173

III.1 Contexte et objectifs d'étude.....	173
III.2. Les principaux résultats	174
III.3. Article:	
<i>Molecular Mechanisms of Endothelialitis in SARS-CoV-2 Infection: Evidence for VE-Cadherin Cleavage by ACE2.....</i>	<i>175</i>
III.4. Conclusion et perspectives	191

PARTIE 3: Discussions générales et perspectives de la thèse 192

Références bibliographiques..... 196

Liste des abréviations

ACE2: Angiotensine Converting Enzyme-2	C-ter: C-terminal
ADAM17: désintégrine et métalloprotéase 17	DEP-1: Density-enhanced phosphatase
ADP: adénosine diphosphate	Dll4: Delta-like-4
AMP: adénosine monophosphate	DlgA: Drosophila disc large tumor suppressor
ATP: adénosine triphosphate	ECM: matrice extracellulaire
Akt: protéine kinase B	Ec-SOD: extracellulaires superoxide dismutase
ALI: acute lung injury, lésion pulmonaire aiguë	EDHF: endothelium hyperpolarization factor
α -caténine: alpha-catenin	EGF-2: epidermal growth factor 2
Ang-1: angiopoïétine 1	E-NTPDase1 : ecto-nucléotidase
ARDS: acute respiratory distress syndrome, syndrome de détresse respiratoire aiguë	ESAM: Endothelial cell selective adhesion molecule,
ATI: alveolaire type I, pneumocytes de type 1	ET-1: endothéline-1
AT II: alveolaire type 2, pneumocytes de type 2	FACS: Fluorescence Activated Cell Sorting"
AT III : antithrombine III	FAK: tyrosine kinase d'adhésion focale ,focal adhesion kinase
B-arrestine2: beta-arrestine 2	FGF: fibroblast growth factor
β -caténine: Beta-caténine	FGF2/FGFR1: fibroblast growth factor 2 receptor
Ca(2+): calcium	FOXC2: forhead box protein 2
CAR: coxsackie and adenovirus receptor	FOXF1: forkhead box 1
Car 4: carbonic anhydrase 4	FPI : fibrose pulmonaire idiopathique (FPI)
CBD: carboxy-terminal catenin binding domain	HDL: <i>high density lipoprotein</i> , lipoprotéines de haute densité
CD200: OX-2 glycoprotéine membranaire	Hep: heparin-lime molécules
CD200R: récepteur de OX-2 glycoprotéine membranaire	HEV : <i>High endothelial venule</i>
ChIP: Chromatin immunoprecipitation, immunoprecipitation de chromatine	HTAP: hypertension artérielle pulmonaire
COPD : Chronic obstructive pulmonary disease, Bronchopneumopathie chronique obstructive	HUVECs: cellules endothéliales de veines ombilicales humaines
COVID-19: coronavirus	GAG: glycosaminoglycanes
COX-2: cyclooxygenase-2	GAG-chain: glycosaminoglycan
Csk: C-terminal Src kinase	

GEF: guanine nucleotide exchange factors

ICAM-1: intercellular adhesion molecule, molécule d'adhésion intercellulaire

IGFBP2: Insulin-like growth factor-binding protein 2

IPF: idiopathic pulmonary fibrosis, fibrose pulmonaire idiopathique

JAM: junctional adhesion molecule, molécule d'adhésion des jonctions

KI : knock-in, souris porteuse de la mutation Y685F de la VE-cadhérine

LEF/TCF: T cell factor/lymphoid enhancer factor family

Mitogen-activated protein kinases: MAPK

MMP3: metalloprotease 3

N-cadhérine: cadhérine neurale

NCK: SH2/SH3 adaptor protein neuronal CDK

Nf-kb: nuclear factor-kappa B

NO: oxyde nitrique

NOS: oxide nitrique synthase

NR2F2 : nuclear receptor subfamily 2 group F member 2 (NR2F2)

N-ter: N-terminal

P120: P120-catenin

PDZ: zonula occludens-1 protein (ZO)domain

PECAM-1: Platelet endothelial cell adhesion molecule

PGE(2): protaglandin E(2)

PH-PF: fibrose pulmonaire associée à l'hypertension pulmonaire

PGI2: prostacycline

PI3K: Phosphoinositide 3-kinase

PLC gamma: phospholipase C isoformes gamma

PROX1: prospero homeobox 1

PSA: protéines du surfactant A

PSD95: post synaptic density protein

PTP1B: protéine tyrosine phosphatase 1B

PTKSrc: protéine-tyrosine kinases

Pyk2: Protein-tyrosine kinase 2-beta

RCPG: récepteurs couplés aux protéines G

RNA-seq: RNA sequencing

ROS: les espèces réactives de l'oxygène

S1P: Sphingosine-1-phosphate

S1PR1: Sphingosine-1-phosphate récepteur

scRNA-seq: Single cell RNA sequencing, séquençage unicellulaire de l'ARN.

SHB: Src homology-2 domain containing protein B

Shp1/2: protéine-tyrosine phosphatase

SPHK: sphingosine kinase

Src: proto-oncogène tyrosine-protéine kinase Src

TAZ: Tafazzin

TER: trans-endothéliale des leucocytes (TER).

TGF-β: transforming growth factor

TF: tissue factor activation of the coagulation

TFPI: tissue factor pathways inhibitor

Tie-2: Angiopoietin-1 receptor

TLR: toll-like receptor

TM: thrombomoduline

TNBC: triple negative breast cancer, cancer du sein triple négatif

TNF-α: tumor necrosis factor alpha

TRPV4: Transient receptor potential cation channel member 4

Tsad: T cell-specific adaptor

Vav2: guanine nucleotide exchange factor

V-cam1: Vascular cell adhesion molecule , t
molécule d'adhésion cellulaire vasculaire

VLDL: *very low density lipoprotein*, lipoprotein
de très basse densité

VE-PTP: Vascular endothelial phosphatase

VE-cadhérine: Vascular endothelial cadherin

VEGF: vascular growth factor

VM: vasculogenic mimicry,

VEGFR: vascular growth factor receptor

VM: vasculogenic mimicry, mimétisme
vasculogénique

VE-PTP: Vascular endothelial protein tyrosine
phosphatase

VSMC: cellules musculaires lisses (Vascular
Smooth Muscle cells),

WT: souris sauvage

Y: tyrosine

YAP: Yes associated protein

Yes: Proto-oncogene tyrosine kinase

ZO-1: zonula-occludens

Table des figures

Figure 1: Organisation générale de la circulation sanguine	15
Figure 2: Structure et composition des différents vaisseaux sanguins.....	16
Figure 3: Schéma des capillaires	17
Figure 4: Les différents types de capillaires.....	19
Figure 5: Les poumons dans le corps humain	20
Figure 6: Structure du poumon vu de face et de côté	21
Figure 7: Structure interne du poumon humain.....	21
Figure 8: Composition des alvéoles pulmonaires	24
Figure 9: Facteurs responsables du dysfonctionnement de l'endothélium pulmonaire	26
Figure 10 : Mécanismes clés contribuant à la progression d'ALI et d'ARDS	27
Figure 11: Dérégulation des vasoconstricteurs conduisant au remodelage vasculaire avec une hypertrophie de la média, la prolifération des cellules endothéliales, l'augmentation des cytokines inflammatoires induisant une prolifération des fibroblastes et in fine à la modification de la pression et l'apparition de l'hypertension pulmonaire.....	28
Figure 12: Remodelage vasculaire dans les poumons chez les patients atteints de fibrose pulmonaire associée à de l'hypertension (PH-PF) et COPD avec de l'hypertension	29
Figure 13: Les différentes étapes de l'angiogenèse par bourgeonnement.....	30
Figure 14 : Mécanismes moléculaires contribuant à l'activation des cellules « tip », l'élongation des cellules « stalk » et le recrutement des péricytes.....	31
Figure 15: L'intussusception ou la formation de 2 vaisseaux à partir d'un vaisseau existant	31
Figure 16: La vasculogenèse pendant le développement	32
Figure 17: VEGF-VEGFR interaction et voies de signalisation	34
Figure 18: Structure et mécanisme d'activation de VEGFR2	35
Figure 19 : Les cascades de signalisation de VEGFR2	37
Figure 20: Formation des cellules endothéliales	38
Figure 21: Structure de la cellule endothéliale	38
Figure 22: Immunofluorescence de la VE-cadhérine et de CD31 dans des cellules endothéliales d'aorte de porc en condition sans flux (a,b) et avec flux (c,d)	40
Figure 23: Images en microscopie à contraste de phase de cellules endothéliales de veine de cordon ombilical humain (HUVECs) ou d'artère (HUAEC)ensemencées à 15 000 cellules par puits et cultivées pendant 2, 4 et 7 jours. Grossissement 10x.....	40

Figure 24: Schéma représentant la structure du glycocalyx et sa composition	41
Figure 25 : Endothelium et la diapédèse des leucocytes.....	44
Figure 26: Facteurs des cellules endothéliales inhibiteurs de la coagulation	45
Figure 27: Facteurs induisant la vasoconstriction ou la vasodilatation.....	47
Figure 28: Formation de l'oxyde nitrique NO et régulation sur les cellules musculaires lisses	48
Figure 29 : Régulation de la vasoconstriction et la vasodilatation par l'endothéline-1.....	49
Figure 30 : Le système rénine-angiotensine.....	50
Figure 31: Les différents types de jonctions inter- endothéliales : les jonctions serrées, les jonctions d'adhérence et les jonctions gaps.....	53
Figure 32: Les connexines des jonctions gaps	54
Figure 33: Représentation des jonctions serrées	55
Figure 34: Schéma des jonctions endothéliales serrés et des jonctions d'adhérence.....	57
Figure 35: Représentation de la structure de la VE-cadhérine et de ses partenaires	59
Figure 36: Structure de Src.....	61
Figure 37: Changement de configuration et d'activité de Src	62
Figure 38: Mécanisme d'endocytose de la VE-cadhérine	66
Figure 39: La diapédèse des leucocytes requiert plusieurs étapes régulées par la cellule endothéliale et les leucocytes	68
Figure 40: Mécanisme permettant l'ouverture des jonctions pour l'extravasation des leucocytes....	69
Figure 41: Mécanismes impliquant la VE-cadhérine dans la diapédèse et la perméabilité	71

Préambule

L'endothélium vasculaire est la monocouche de cellules endothéliales qui tapisse l'intérieur des vaisseaux sanguins. Il joue un rôle crucial dans la formation de nouveaux vaisseaux et le passage des nutriments, de l'oxygène, de solutés et de cellules immunitaires entre les tissus et le sang. Il est responsable du bon fonctionnement des organes et sera donc adapté aux besoins spécifiques de chaque organe. La perméabilité sélective aux molécules et aux cellules immunitaires est finement régulée par des protéines au niveau des jonctions des cellules endothéliales. Parmi elles, la Vascular Endothelial-cadherin (VE-cadhérine), spécifique aux cellules endothéliales est très importante pour l'intégrité de l'endothélium vasculaire. La VE-cadhérine est localisée au niveau des jonctions adhérentes, qui sont des contacts adhésifs intercellulaires cruciaux pour le maintien et la régulation de la fonction microvasculaire normale. L'invalidation du gène correspondant induit un phénotype mortel précoce chez la souris. Les fonctions de la VE-cadhérine s'étendent à de nombreux processus comme l'angiogenèse, le tonus musculaire et la migration des cellules immunitaires au travers de la barrière endothéliale. Une dérégulation de cette dernière est souvent associée à de nombreuses pathologies comme l'hypertension, les glioblastomes et le cancer du sein.

Les altérations de la VE-cadhérine sont des processus qui conduisent à une dissociation des contacts endothéliaux et qui peuvent être induits par des mécanismes de phosphorylation dans la partie intracellulaire, sur des acides aminés tyrosine ou sérine sous l'action de protéine kinases. Ces modifications covalentes de la protéine jouent un rôle majeur dans son internalisation, de même que dans le clivage de la partie extracellulaire, mais également dans l'activation de voies de signalisation. Dans cette étude, notre intérêt s'est porté sur le site Y685 déjà décrit par le laboratoire du fait de son importance en cancérologie, mais cette fois-ci nous avons émis l'hypothèse qu'une mutation de ce site pourrait être responsable de la délocalisation de la β -caténine, partenaire de la VE-cadhérine et responsable de la régulation de gènes endothéliaux. Par conséquent, obtenir des informations concernant ce site permettrait d'appréhender de façon ciblée les mécanismes de déstabilisation de la microvasculature en particulier tumorale.

Un modèle murin de souris knock-in généré au laboratoire a été utilisé, dans lequel toutes les molécules de VE-cadhérine possèdent un acide aminé phénylalanine F à la place de la tyrosine Y685, ce qui les rend non phosphorylables. Cela nous a permis d'étudier le rôle de la Y685 de la VE-cadhérine sur la reprogrammation des cellules endothéliales pulmonaires. Nous avons également développé un modèle 3D de cancer du sein triple négatif pour étudier l'impact de thérapies ciblées sur les modifications de la VE-cadhérine et plus récemment, en relation avec le clivage de la protéine, nous avons étudié l'impact de la pathologie COVID sur la VE-cadhérine.

Partie I:
Introduction sur l'endothélium des
vaisseaux sanguins

CHAPITRE I :

LE SYSTEME CARDIOVASCULAIRE

Introduction

Tous les organes, tous les tissus et toutes les cellules ont un besoin de vital d'oxygène et de nutriments pour leur fonctionnement physiologique. Ce rôle est attribué au système vasculaire et au système lymphatique qui ont la responsabilité de répondre aux besoins de tout l'organisme pour l'approvisionnement en nutriments et gaz jusqu'à l'élimination des déchets.

Le système cardiovasculaire est constitué de deux circulations : la circulation pulmonaire et la circulation systémique (Fig1). Grâce à ces deux systèmes, ils garantissent la circulation du sang au travers d'un vaste réseau de vaisseaux sanguins allant des artères et des capillaires, aux veinules et aux veines. Le système lymphatique quant à lui a une forte relation avec le système vasculaire. Son rôle est axé sur la réabsorption de l'eau et de protéines au niveau des capillaires lymphatiques. Les capillaires lymphatiques convergent pour donner les vaisseaux puis les canaux. Ces derniers déversent la lymphe dans le système veineux au niveau des veines de la base du cou. Ils contribuent également à la défense immunitaire et favorise l'absorption des lipides lors de la digestion (Bessaguet, Henrion, et Desmoulière 2022).

Ce chapitre du manuscrit sera centré sur l'importance du système cardiovasculaire dans la physiologie de l'organisme. Nous nous intéresserons à ses fonctions au système cardiovasculaire puis nous nous focaliserons sur l'endothélium, de sa composition jusqu'aux fonctions qu'il remplit pour maintenir l'homéostasie et comment ses dérégulations sont à l'origine de diverses pathologies. Nous verrons l'importante hétérogénéité de l'endothélium dépendant des organes, notamment dans le cas du poumon, où son dysfonctionnement est source de nombreuses pathologies.

I.1 Le système vasculaire

Le système vasculaire transporte le sang au travers des organes afin de leur apporter oxygène et nutriments nécessaires à leur bon fonctionnement.

Pour parvenir à cet objectif, il est composé de plusieurs types de vaisseaux : les artères, les veines et les capillaires. Dans ce réseau vasculaire, on distingue la grande circulation de la petite circulation. La grande circulation ou *circulation systémique* englobe les vaisseaux partant du ventricule gauche du cœur pour fournir les nutriments et l'oxygène aux organes tandis que la petite circulation ou *circulation pulmonaire* est caractérisée par une faible pression (Bessaguet, Henrion, et Desmoulière 2022). La paroi des artères y est très mince et élastique avec l'absence de sphincters pré-capillaires. Contrairement à la grande circulation, les veines sont hautement oxygénées puisque le sang provient du poumon (Fig1) (Classification & Structure of Blood Vessels | SEER Training s. d.) (Bessaguet, Henrion, et Desmoulière 2022).

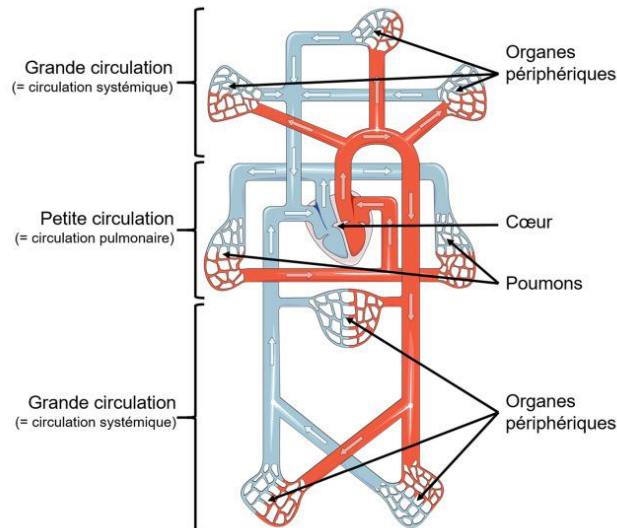


Figure 1: Organisation générale de la circulation sanguine.
(Bessaguet, Henrion, et Desmoulière 2022)

I.1.1. La circulation systémique

Dans le système systémique, on retrouve le réseau artériel, le réseau artériolaire, le réseau capillaire et le réseau veineux. Tout ce réseau est soumis à des contraintes qui lui sont propres et répondent à des fonctions bien spécifiques :

- Transporter le sang et ses constituants (oxygène, nutriment, hématies, cellules immunitaires)
- Réguler la pression sanguine (la force exercée par le sang sur la paroi des vaisseaux)
- Diriger le flux sanguin vers les organes

I.1.1.1. Le réseau artériel

Le réseau artériel comporte la partie vasculaire comprise entre l'aorte et les artérioles. Il est directement en contact avec le ventricule gauche du cœur. Il est composé d'artères de calibre supérieur à 500 μ m qui vont faciliter l'écoulement du sang via un flux sanguin de haute pression (100mmHg) (Bonizol Camasao et Mantovani 2021). La dilatation des vaisseaux va contribuer à l'éjection du sang issu du cœur suivie par la contraction des vaisseaux pour induire le déplacement du sang vers les différents tissus. L'élasticité des artères permet l'uniformisation du débit par la conversion du débit pulsé issu du cœur en débit continu dans les artères périphériques (Bessaguet, Henrion, et Desmoulière 2022).

Les artères sont composées de différentes couches : l'adventice (la tunique externe), la média (la tunique moyenne), la membrane basale et l'intima (la tunique interne) (Fig 2) (Jouda, Murillo, et Wang 2022).

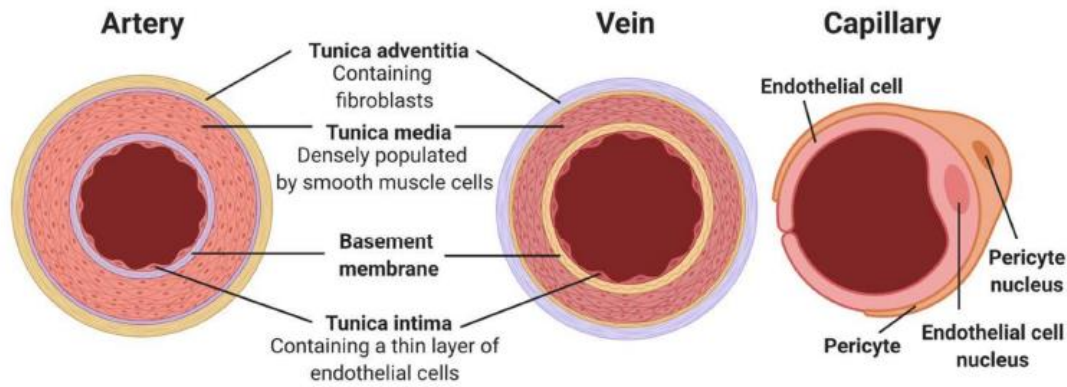


Figure 2: Structure et composition des différents vaisseaux sanguins.

(Jouda, Murillo, et Wang 2022)

L'adventice est séparée de la média par la lame élastique externe. Cette couche contient majoritairement des fibroblastes, du collagène et des fibres élastiques, de nombreuses terminaisons nerveuses, des cellules inflammatoires et des vaisseaux lymphatiques. Elle permet d'ancrer les vaisseaux aux tissus avoisinants et d'empêcher l'expansion disproportionnée des vaisseaux (Sajeesh et al. 2022). Dans les artères, cette couche est plus fine que la média (Ng et al. 2018).

La média est la couche la plus épaisse et est constituée de cellules musculaires lisses qui vont réguler le flux sanguin et la pression artérielle. Elle contient aussi des fibres élastiques dont les composants majeurs sont l'élastine, le collagène, la fibronectine et des protéoglycanes synthétisés par les cellules musculaires lisses (Ng et al. 2018).

La lame basale est essentiellement composée de glycoprotéines et de fibres de collagène sans aucune cellule. Positionnée entre l'intima et la média, elle facilite la diffusion des substances à travers les différentes couches.

L'intima est une fine couche de cellules endothéliales (CE) jointives ancrée dans la membrane basale. Elle joue un rôle dans la contraction des cellules musculaires lisses issus du média, dans les échanges des gaz et des nutriments, la formation des vaisseaux sanguins, l'inhibition de la formation de caillots et la régulation des cellules du système immunitaire (Bessaguet, Henrion, et Desmoulière 2022).

I.1.1.2. Le réseau artériolaire

Le réseau artériolaire est formé des vaisseaux dont le diamètre de la lumière est compris entre 10 et 500 μm . Ceux-ci peuvent se contracter ou se dilater et adapter ainsi leur diamètre afin de contrôler le flux sanguin et la pression artérielle grâce à la présence de cellules musculaires lisses. Dans ce réseau, la pression sanguine a déjà diminué (90-95 mmHg, par rapport à 100 mmHg dans les artères) car le diamètre des vaisseaux diminue à chaque embranchement et ils possèdent moins de fibres de collagène élastiques (Bessaguet, Henrion, et Desmoulière 2022). De ce fait, ils présentent une forte résistance. Les artéoles sont constamment maintenues dans un tonus vasculaire par l'action des cellules musculaires lisses et ce même au repos. Du point de vue de la composition, elles sont identiques aux artères mais avec une diminution de l'épaisseur de ces différentes couches exceptées l'intima qui reste identique. La

média est limitée à une ou deux couches de cellules musculaires lisses et l'adventice a une épaisseur bien inférieure à celle des artères (Bonizol Camasao et Mantovani 2021).

I.1.1.3. Le réseau capillaire

Le réseau capillaire, qui possède un diamètre compris entre 5 et 30 μm , fait la jonction entre les artérioles et les veinules. La pression est assez faible et moins importante que dans les artérioles. L'accès à ce réseau se fait par des cellules musculaires lisses qui composent les sphincters pré-capillaires. Le réseau capillaire a la capacité d'irriguer les tissus en fonction des besoins. C'est par ce réseau que les échanges de gaz et de nutriments se font, du fait du petit diamètre des vaisseaux (Fig 3).

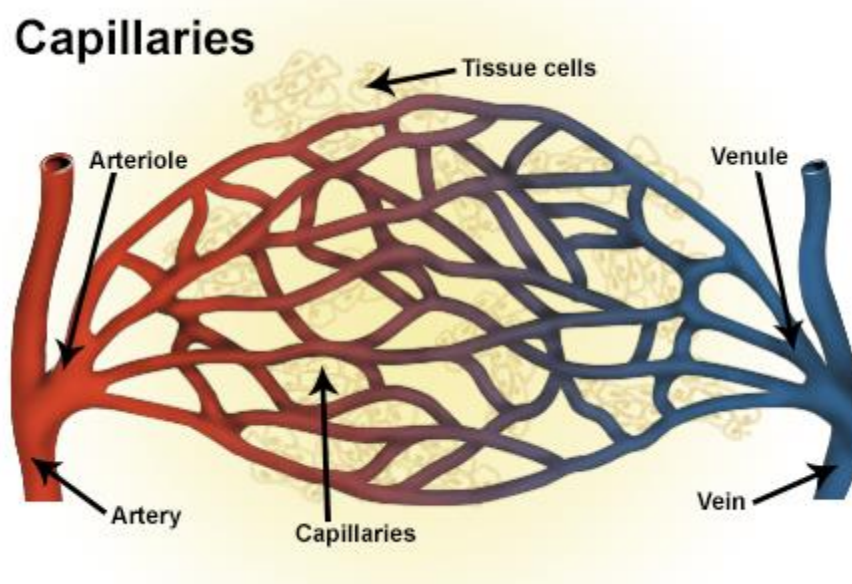


Figure 3: Schéma des capillaires (SEER Training Modules, Module Name. U. S. National Institutes of Health, National Cancer Institute)

Ces échanges de gaz, d'ions et solutés peuvent se faire selon différentes méthodes :

- Par diffusion où les molécules de type oxygène, dioxyde de carbone et acide gras vont être transportées de manière passive par leur gradient de concentration au travers des différentes membranes biologiques. Les autres molécules de type sucre et ions vont aussi être diffusées par ce même processus mais entre les espaces inter-cellulaires en fonction de leur gradient de concentration et de leur taille.
- Par transport vésiculaire signifiant que les molécules de grandes tailles vont être endocytées dans la cellule endothéliale et sécrétées de l'autre côté dans le tissu.
- Par le phénomène de filtration-réabsorption qui consiste en la filtration de l'eau des capillaires vers le liquide interstitiel puis la réabsorption du liquide interstitiel vers les capillaires.

Ce déplacement dépend de la pression sanguine pour pousser l'eau en dehors des capillaires, et de la pression osmotique dont la concentration élevée en protéine dans le sang provoque une entrée d'eau dans les capillaires. La filtration est observée du côté des artérioles tandis que la réabsorption l'est du côté des veinules. Toutefois, tout le liquide n'est pas réabsorbé et l'excès est récupéré par le système lymphatique (Bessaguet, Henrion, et Desmoulière 2022).

La fonction des capillaires dépend de l'activité métabolique des tissus comme les muscles squelettiques, le foie et le rein qui possèdent un réseau de capillaire très développé. A contrario, la cornée de l'œil, l'épiderme de la peau en sont dépourvus (Classification & Structure of Blood Vessels | SEER Training s. d.).

Pour remplir leur rôle d'échange entre le sang et les tissus, les capillaires ont différents aspects morphologiques qui permettent de mieux répondre aux besoins des organes: les capillaires continus, les capillaires fenêtrés et les capillaires sinusoïdes.

- Les capillaires fenêtrés ont des fenestrations (des pores) entre les cellules endothéliales permettant le passage de molécules. Ces capillaires sont ainsi très perméables et sont principalement retrouvés dans les glomérules rénaux, le pancréas, les glandes endocrines et l'intestin grêle. Ces tissus sont principalement connus pour faire faire beaucoup d'échanges.
- Les capillaires sinusoïdes ont des pores intercellulaires étendus associés à une membrane basale incomplète. Cette structure permet le passage de grosses molécules allant jusqu'aux cellules et induit une diminution du flux sanguin et ainsi un meilleur échange des nutriments et de l'oxygène avec les organes. Les capillaires sinusoïdes sont présents dans le foie, la rate, la moelle osseuse. (Bessaguet, Henrion, et Desmoulière 2022).
- Les capillaires non fenestrés ou continus sont localisés dans la peau, les poumons, le cœur, les muscles squelettiques et la barrière hémato-céphalique. Ils servent principalement à faire diffuser des particules de petites tailles ou de plus grosses via des transporteurs(Godwin, Tariq, et Crane 2023) et sont beaucoup moins perméables que des autres (Fig4) (Bessaguet, Henrion, et Desmoulière 2022) (Structure and Function of Blood Vessels | Anatomy and Physiology II s. d.)).

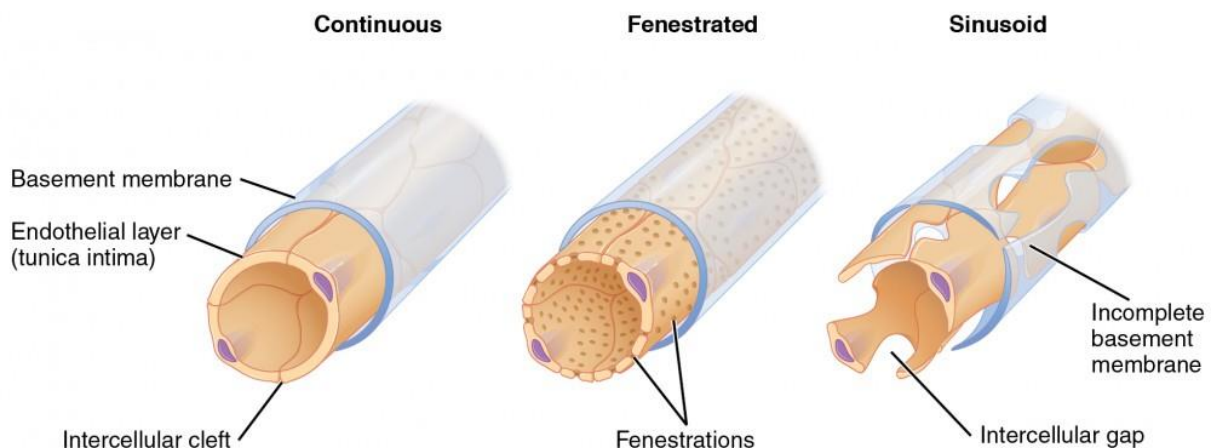


Figure 4: Les différents types de capillaires.

SEER Training Modules, Module Name. U. S. National Institutes of Health, National Cancer Institute

Contrairement aux autres types de vaisseaux, les capillaires sont dépourvus des différentes couches. Ils n'ont qu'un endothélium en interaction avec des cellules avec des capacités contractiles: les péricytes. La fonction des péricytes est de maintenir une stabilité de cet endothélium ; ils peuvent également aider à la régulation des échanges. Ces cellules sont très caractéristiques du fait de leur morphologie étoilée (Fig2) (Jouda, Murillo, et Wang 2022).

I.1.1.4. Le réseau veineux

Le réseau veineux se situe à la sortie des capillaires. Il est subdivisé en plusieurs types de veines selon leur taille : les veinules post-capillaires et musculaires (de diamètre <1mm), les veines moyennes (6-15mm) et les grosses veines (>15mm) (Bonizol Camasao et Mantovani 2021). Les petites veinules vont s'élargir pour devenir des veines jusqu'au cœur (Classification & Structure of Blood Vessels | SEER Training s. d.) . Les veinules post-capillaires reçoivent le sang issu des capillaires et peuvent également être le lieu de la diapédèse pour les cellules immunitaires. Elles sont marquées par la présence de péricytes et l'absence de média contrairement aux veinules musculaires (Ng et al. 2018). Tout comme le réseau artériolaire, le réseau veineux excepté pour les veines post-capillaires, a la capacité de réguler le débit sanguin via les cellules musculaires lisses. Il est de faible pression (5-15mmHg) mais représente un réservoir de sang qui permet le retour veineux vers le cœur (Bessaguet, Henrion, et Desmoulière 2022). Etant donné sa localisation, ce réseau est faiblement oxygéné. Les veines présentent les mêmes structures que les artères mais avec quelques différences : elles ont une tunica adventia plus épaisse que les artères et moins de cellules musculaires lisses, ce qui entraîne un amincissement de la paroi et une perte de rigidité. Les veines larges et moyennes sont pourvues de valves qui permettent au sang de retourner au cœur et d'avoir un flux sanguin unidirectionnel (Fig2) (Classification & Structure of Blood Vessels | SEER Training s. d.).

Les fonctions des différents types de vaisseaux (veines, artères, capillaires) comme l'échange des nutriments, de l'oxygène, l'extravasation des cellules immunitaires, du flux sanguin, de la coagulation sanguine sont contrôlées par l'intima ou la tunique interne composée de l'endothélium.

I.1.2. Le système pulmonaire

Les poumons humains situés dans le thorax constituent le système respiratoire. Ils sont protégés notamment par la cage thoracique et sont enveloppés par la plèvre. Entre les deux poumons, se trouve la région du médiastin qui s'étend du sternum à la colonne vertébrale et contient notamment l'œsophage, la trachée, le cœur et les ganglions lymphatiques médiastinaux. Ces derniers jouent un rôle prépondérant dans l'élimination des déchets de l'organisme via la lymphe (Review: Anatomy of the Lung | SEER Training s. d.).

Les poumons sont séparés en deux lobes qui sont divisés en plusieurs segments. Ainsi, le poumon gauche contient deux lobes tandis que le droit en dénombre trois. Ils permettent l'inspiration et l'expiration de l'air grâce à la contraction active et automatique du diaphragme. L'air inspiré circule dans la trachée qui elle-même se sépare en deux bronches souches à gauche et à droite. Les bronches souches vont se ramifier en bronches et bronchioles dans chacun des poumons. Ces ramifications se terminent par des petites alvéoles pulmonaires. L'oxygène traverse la paroi des alvéoles pour accéder au sang et fournir tout l'oxygène nécessaire aux cellules de l'organisme. Alors que le gaz carbonique émis par les cellules est ramené dans les poumons via le sang, il traverse également les parois des alvéoles pulmonaires et est ensuite évacué par les bronches puis la trachée et enfin le nez ou la bouche (Fig 5, 6, 7). (Les poumons - Cancer du poumon s. d.). La capacité respiratoire normale est d'environ 0.5 litre d'air inspiré et expiré. Si on inspire profondément, elle peut s'élever jusqu'à 2 litres d'air. L'air inspiré contient 21% d'oxygène tandis que l'air expiré n'en contient plus que 17%. Le pourcentage de gaz carbonique augmente de 0.04% à 4% (Bern s. d.).

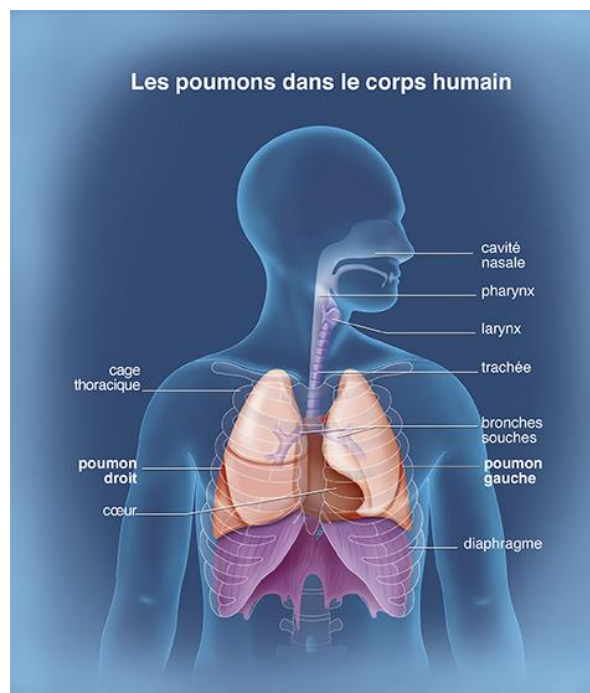


Figure 5 : Les poumons dans le corps humain

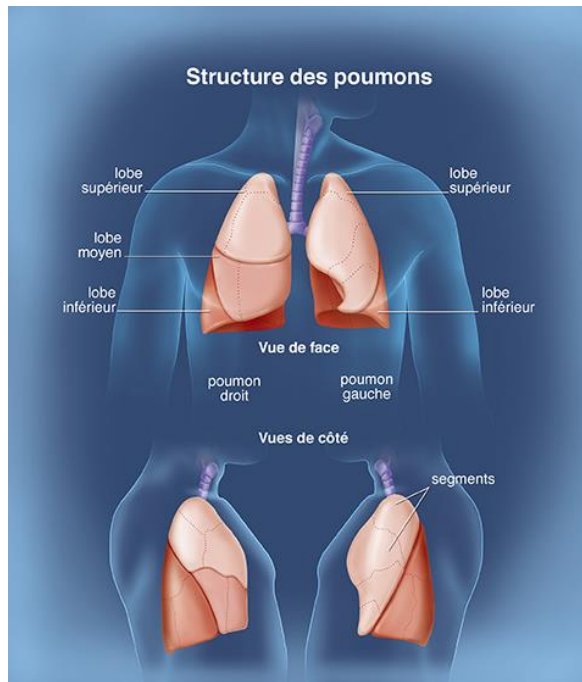


Figure 6 : Structure du poumon vu de face et de côté

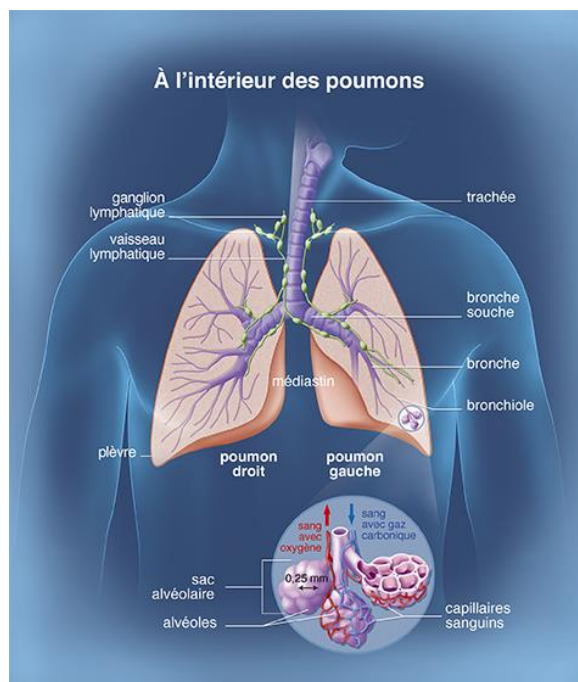


Figure 7: Structure interne du poumon humain
(Les poumons - Cancer du poumon s. d.)

I.1.2.1. Constituants cellulaires du poumon

Pour parvenir à maintenir cette homéostasie, le poumon est composé de différentes couches de cellules dont chacune remplit un rôle bien distinct. L'épithélium, l'endothélium, les macrophages et les fibroblastes assurent ainsi le bon fonctionnement de l'organe (Fig8) (Nova, Skovierova, et Calkovska 2019a).

I.1.2.1.A. L'épithélium alvéolaire

La barrière alvéolaire, constituée de l'épithélium, est essentielle dans la protection du poumon contre les organismes étrangers et les stimuli externes qui engendreraient des dysfonctionnements pulmonaires. Elle est activement impliquée dans la réponse du système immunitaire et contribue à l'équilibre du fluide à la surface des alvéoles. Elle est métaboliquement très active et fine pour garantir des échanges gazeux efficaces entre l'air et les vaisseaux sanguins (Fig8)(Nova, Skovierova, et Calkovska 2019a). Cet épithélium pulmonaire est constitué des pneumocytes de type 1 (alvéolaire type I : ATI) et des pneumocytes de type 2 (alvéolaire type 2 : ATII). Les cellules AT1 sont propices aux échanges gazeux par leur faible épaisseur (0.2 μm) et une surface moyenne par cellule de 5000 μm^2 chez les hommes adultes (Biomolécules | Free Full-Text | New Insights into the Alveolar Epithelium as a Driver of Acute Respiratory Distress Syndrome s. d.). Du fait de leur cytoplasme très fin, elles sont très sensibles aux blessures, aux polluants et aux attaques microbiennes, notamment à cause du nombre réduit de mitochondries. Elles jouent également des rôles dans la régulation de la prolifération cellulaire, du transport des ions comme le sodium via des canaux ioniques, et du transport de l'eau via les aquaporines. Elles peuvent participer à la réponse immunitaire en modulant l'activité des macrophages alvéolaires, exprimer des toll-like receptor (TLR) à leur surface et sécréter des cytokines pro-inflammatoires (Nova, Skovierova, et Calkovska 2019a).

Les pneumocytes de type ATII ont une morphologie « cubique » avec des microvillosités au pôle apical et des corps lamellaires. Elles sont assez petites avec une surface apicale de 200 μm^2 par cellule. Elles représentent seulement 7% de l'épithélium alvéolaire mais sont beaucoup plus nombreuses que les pneumocytes de type AT1. Le principal rôle des ATII est la régulation du surfactant pulmonaire. Dans le système respiratoire, ce surfactant a une fonction primordiale en tant que mécanisme de défense. Les protéines du surfactant contrôlent l'activité des cellules impliquées dans l'inflammation. Les ATII elles-mêmes sont reconnues impliquées dans la protection des alvéoles par leur capacité à activer les lymphocytes T via l'expression de protéines transmembranaires (CD80, CD54, CD58, CD86) et de facteurs de croissance (transforming growth factor :TGF- β)(Zissel et al. 2000). Elles produisent également des peptides antimicrobiens (neutrophil α -defensins, β -defensins,)(Nova, Skovierova, et Calkovska 2019b). Ces cellules sont fortement engagées dans la réparation des tissus endommagés grâce à leur capacité d'auto-régénération et de trans-différenciation en cellules AT1. Une atteinte des cellules ATII est responsable de nombreuses pathologies de type fibrose idiopathique pulmonaire. Elles sont notamment très sensibles à l'hypoxie, l'une des conséquences retrouvée dans de nombreuses maladies comme le cancer du poumon ou l'hypertension pulmonaire (Nova, Skovierova, et Calkovska 2019b).

I.1.2.1.B. Les macrophages alvéolaires

En plus des ATI, des macrophages alvéolaires se trouvent dans l'espace bronchoalvéolaire pour assurer cette fonction de protection. Ils sont localisés à proximité des ATI ou des ATI (Fig8). Les macrophages situés dans les voies respiratoires plus larges vont résider dans le surfactant pulmonaire. Ils sont également présents dans l'espace interstitiel entre les alvéoles et les vaisseaux sanguins (Hussell et Bell 2014). Les macrophages alvéolaires sont des cellules mononuclées avec une capacité à phagocyter. Elles proviennent de la différenciation des monocytes pendant leur migration dans les tissus. Les macrophages peuvent se diviser en trois groupes :

-**Les macrophages M1** régulent la défense de l'hôte contre les infections virales ou bactériennes. Ils ont ainsi des propriétés pro-inflammatoires et leur production est dépendante de l'interféron-gamma.

-**Les macrophages M2** jouent un rôle anti-inflammatoire et leur action est plutôt centré sur la réparation des tissus endommagés. Ils sont activés par l'interleukine 4 et l'interleukine 3.

-**Les macrophages dits régulateurs** vont eux contrôler les réponses immunitaires pour éviter des réactions auto-immunes ou une réaction inflammatoire exacerbée.

La régulation des macrophages est strictement contrôlée par l'interaction cellules-cellules ou par des facteurs solubles présents dans l'environnement. L'épithélium joue un rôle important dans l'inhibition de l'activité des macrophages. L'activité des macrophages peut être régulée par les cellules ATI qui elles-mêmes expriment OX-2 glycoprotéine membranaire (CD200), une glycoprotéine transmembranaire. La liaison de CD200 avec son récepteur sur les macrophages (récepteur de CD200) CD200R résulte en une atténuation de l'activité des macrophages (Herold, Mayer, et Lohmeyer 2011). CD200R est largement retrouvé exprimé chez les macrophages alvéolaires de la souris comparés à d'autres organes (Hussell et Bell 2014). Il existe également la production de l'interleukine 10, de l'expression de TGF- β issu de l'épithélium qui vont aussi avoir pour objectif d'inhiber l'activité des macrophages (Hussell et Bell 2014). Les Toll-like receptors (TRL2 et TLR6) exprimés sur la membrane des macrophages reconnaissent les molécules associées aux agents pathogènes et conduisent à l'activation du facteur de transcription nuclear factor-kappa B (Nf-kb) induisant à son tour l'expression de gènes associés à la réponse immunitaire comme la production de cytokines inflammatoires. Des protéines du surfactant A qui sont très abondantes dans le fluide des poumons et sont produites par les ATI sont retrouvées comme capables d'inhiber l'activité des macrophages en bloquant l'interaction des Toll-like receptors (TLR2 et TLR6) avec leur ligands empêchant l'activation de la voie de signalisation initiatrice de la réponse inflammatoire (Hussell et Bell 2014)

I.1.2.1.C. Les fibroblastes

L'espace interstitiel entre l'épithélium et l'endothélium contient des fibroblastes (Fig8) (Nova, Skovierova, et Calkovska 2019a) qui sont importants dans le développement pulmonaire notamment dans l'alvéolisation en supportant la prolifération et la différenciation des AT2 en AT1 ainsi que la production des protéines du surfactant, celles qui permettent le modelage de la matrice extra-cellulaire (Ultrastructure of developing alveoli. I. The role of the interstitial fibroblast - Vaccaro - 1978 - The Anatomical Record - Wiley Online Library s. d.), (Ushakumary, Riccetti, et Perl 2021). À l'état basal, les fibroblastes sécrètent peu de matrice extracellulaire, contrairement à une situation de blessure du poumon où ils en produisent beaucoup. Toutefois, lorsque ce processus devient dérégulé, des dommages pulmonaires sont engendrés. Il a ainsi été démontré une augmentation de la sécrétion de collagène produit par les fibroblastes pulmonaires dans des souris ayant des symptômes de blessure aiguë du poumon (Acute lung injury : ALI) (Z. He, Zhu, et Jiang 2009). Il est à noter que la rigidité de la matrice extra-cellulaire est un régulateur de l'activité des fibroblastes qui se voit accrue dans les cas de blessures excessives induisant notamment un changement de phénotype des fibroblastes, la synthèse de la matrice et une sous-régulation des molécules anti-fibrotiques (cyclooxygénase-2 : COX-2, protasglanidine E(2) : PGE(2)) (White 2015), (F. Liu et al. 2010).

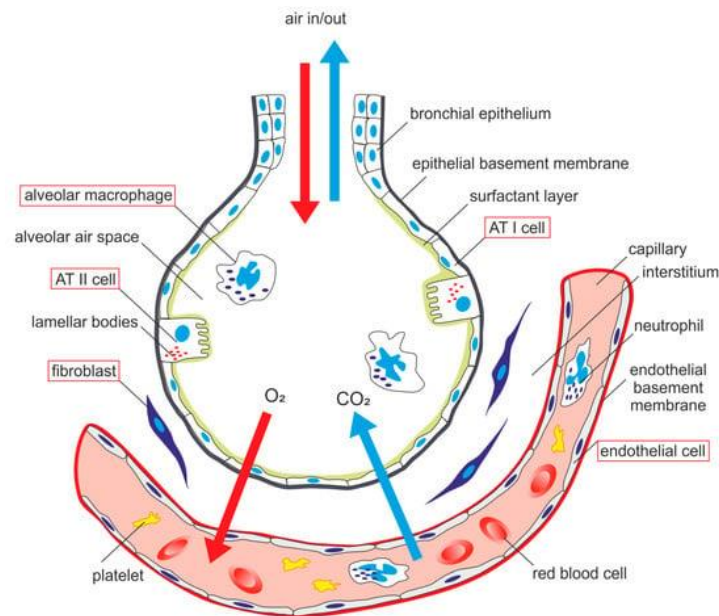


Figure 8: Composition des alvéoles pulmonaires (Nova, Skovierova, et Calkovska 2019a)

I.1.2.1.D. L'endothélium dans le poumon

Le poumon est séparé par deux systèmes respiratoires bien distincts : le système de la circulation systémique bronchiale et le système de la circulation pulmonaire. La circulation pulmonaire a un lit vasculaire qui est unique avec un flux sanguin certes important mais de faible résistance induisant ainsi une faible pression pulmonaire. Ces caractéristiques particulières sont expliquées par une faible opposition au flux sanguin et ses artérioles pré-capillaires qui ont une membrane épaisse (Huertas et al. 2018). Le dysfonctionnement des cellules endothéliales est souvent associé à de nombreuses pathologies.

Les différents types de vaisseaux du réseau *systémique* sont riches en capillaires qui sont le lieu d'échanges entre le sang et les tissus et de ce fait ils forment une barrière plus restrictive laissant passer un faible volume de fluide contenant l'eau, les solutés et l'oxygène (Gebb et Stevens 2004). Les cellules endothéliales des capillaires sont en contact direct avec les cellules épithéliales et jouent un véritable rôle dans l'intégrité de la barrière pulmonaire.

I.1.2.2. Les fonctions de l'endothélium pulmonaire

I.1.2.2.A. Intégrité de la barrière pour le transport de l'oxygène et des nutriments

Pour maintenir l'homéostasie pulmonaire, l'endothélium joue un rôle central notamment par sa localisation entre les vaisseaux sanguins et le tissu pulmonaire. Ses principaux rôles vont s'orienter autour de la régulation des transports de protéines, des échanges de gaz, de cellules et de fluides entre le sang et l'espace interstitiel. Ce sont des capillaires de type non fenestré. Les échanges peuvent se faire via les cellules endothéliales, ou passage transcellulaire, et entre les cellules endothéliales via les jonctions inter-endothéliales, ou passage paracellulaire. Par conséquent, les jonctions ont un rôle crucial dans le transport et le maintien de l'intégrité de la barrière (Vassiliou et al. 2020). Une dérégulation de cette barrière peut être d'ordre génétique, hormonal, de l'âge de l'individu, du sexe, de la sécrétion de facteurs pro-inflammatoires, de l'hypoxie, des toxines, de la cigarette, du flux sanguin, du stress oxydatif ou bien d'infection par des virus (Fig. 9) (Huertas et al. 2018). En effet, le tonus vasculaire joue un rôle capital dans la stabilité de l'endothélium. Pour maintenir un tonus vasculaire stable, la cellule endothéliale doit synthétiser et sécréter des protéines capables de répondre aux variations du flux sanguin. Pour cela, la cellule endothéliale est métaboliquement très active afin de s'adapter aux signaux externes. Elle va notamment sécréter des agents vasodilatateurs ou vasoconstricteurs qui vont rétablir l'équilibre du flux sanguin. Les vasoconstricteurs ont pour objectif de rétrécir les vaisseaux sanguins afin d'accroître la pression sanguine et de réduire le flux sanguin tandis que les vasodilatateurs auront l'effet opposé. Une dérégulation de l'équilibre entre les vasodilatateurs et les vasoconstricteurs entraîne une hypertension et une augmentation de la résistance vasculaire retrouvée dans certaines pathologies de type lésion pulmonaire aiguë (acute lung injury, ALI) où une augmentation de vasoconstricteurs comme l'angiotensine II et l'endothéline¹ a pu être observée (Maniatis et al. 2008). Cette dernière par exemple est souvent retrouvée élevée chez les patients atteints d'hypertension pulmonaire, dans les cas d'atteinte pulmonaire et notamment chez les patients touchés par syndrome de détresse respiratoire aiguë (ARDS). Son augmentation aberrante peut être associée à une hypoperfusion, une augmentation de la résistance vasculaire et ainsi conduire à l'hypertension et in fine à une atteinte irréversible du poumon (Vassiliou et al. 2020).

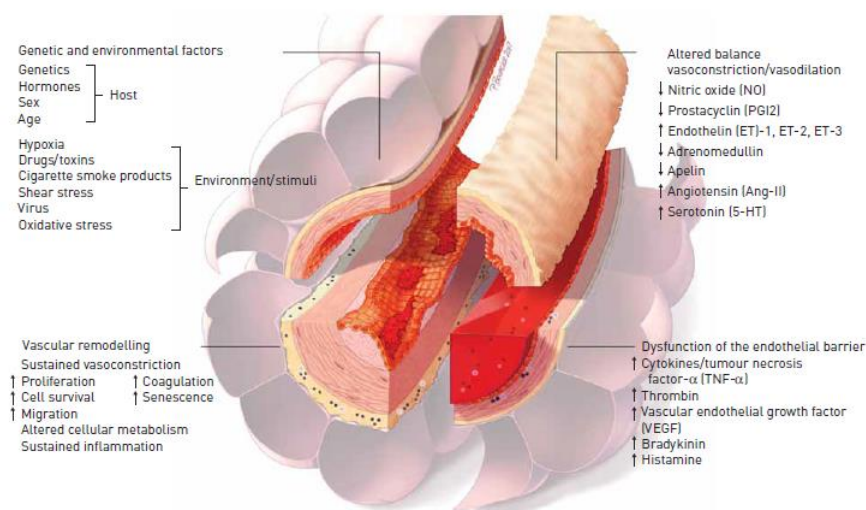


Figure 9: Facteurs responsables du dysfonctionnement de l'endothélium pulmonaire (Huertas et al. 2018)

I.1.2.2.B. Régulation du système immunitaire

Les cellules endothéliales forment une barrière semi-sélective qui régule la migration des cellules immunitaires. L'activation des cellules endothéliales produit des cytokines, recrute et active les cellules immunitaires et les plaquettes (W. Zhao, Wang, Wang, et al. 2023). Dans le cas de fibrose pulmonaire idiopathique (idiopathic pulmonary fibrosis, IPF), les cellules endothéliales sont activées et produisent en grande concentration de nombreux facteurs pro-inflammatoires et des molécules d'adhésion comme P et E-sélectine contribuant au recrutement des cellules immunitaires. Elles contribuent alors à la fibrose pulmonaire en sécrétant des facteurs pro-fibrotiques. Ainsi, l'activation du système immunitaire amplifie les dommages tissulaires et active également les fibroblastes qui surproduisent le collagène (Leach et al. 2013). Cao et son équipe ont démontré que l'activation des cellules endothéliales en cas de fibroses permet le recrutement des macrophages au lieu de l'inflammation. Ces derniers induisent l'expression de Jag1 dans les cellules endothéliales connu pour activer les fibroblastes (Z. Cao et al. 2016). Récemment, il a été suggéré que le recrutement des monocytes pouvait être induit par les métalloprotéases 19 exprimées par les cellules endothéliales. MMP19 induisait la transition endothéliale-mésenchymateuse retrouvée dans les patients atteints d' IPF(W. Zhao, Wang, Yang, et al. 2023).

I.1.2.3. Les pathologies pulmonaires

I.1.2.3.A. ALI et ARDS

La dérégulation de la barrière endothéliale pulmonaire est l'un des principaux facteurs de nombreuses maladies comme le syndrome de détresse respiratoire aiguë (acute respiratory distress syndrome, ARDS) ou lésion pulmonaire aiguë (acute lung injury (ALI) (Vassiliou et al. 2020). ALI est un cas de défaut respiratoire et d'hypoxie aiguë qui peut progresser en détresse respiratoire aiguë. Son taux de mortalité est très élevé : autour de 30 à 40 %. La dysfonction des cellules endothéliales pulmonaires est une cause

majeure de ces pathologies par la perte de l'intégrité de la barrière, par la formation d'œdèmes, l'augmentation de la coagulation, l'infiltration de cellules inflammatoires dans l'espace alvéolaire et l'augmentation de la production de cytokines inflammatoires dans les poumons. Ainsi ces processus promeuvent l'inflammation, engendrant des dommages profonds au niveau épithélial et endothélial (Fig10) (Y.-X. Li et al. 2022) (Cusack et al. 2023). Cette dysfonction conduit ensuite à la vasoconstriction pulmonaire, l'augmentation de la résistance pulmonaire et donc à l'hypertension. Associée à la progression de la pathologie, une diminution de la densité des capillaires et une hypertrophie des cellules musculaires lisses conduisent à l'épaississement de la média (Borek et al. 2023).

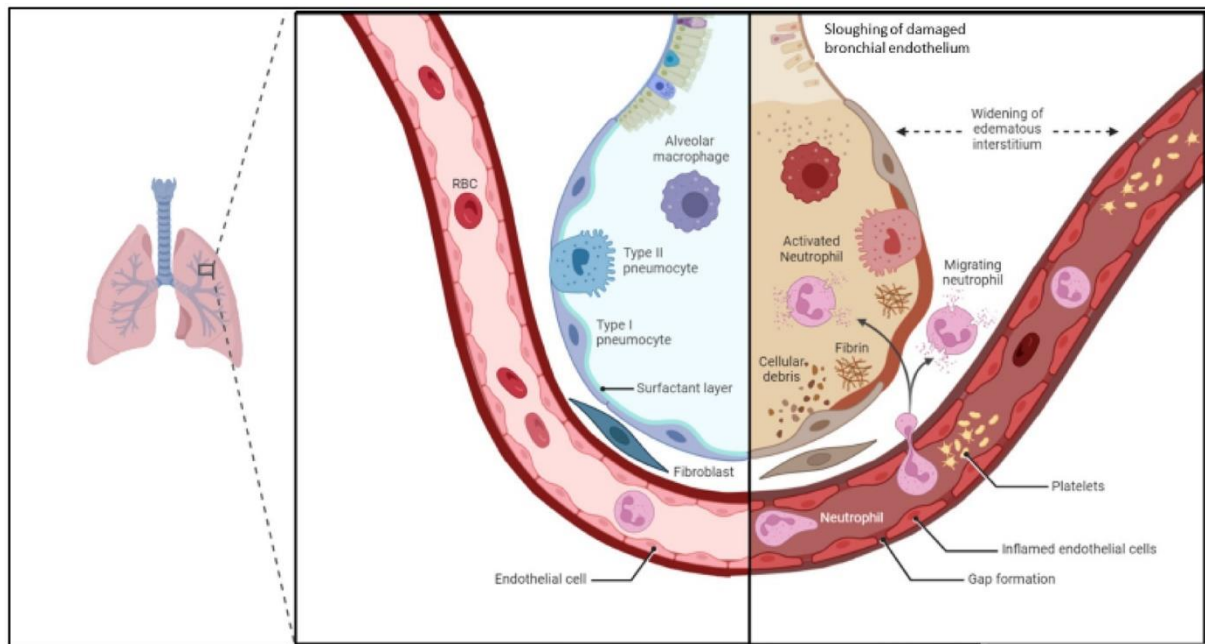


Figure 10 : Mécanismes clés contribuant à la progression d'ALI et d'ARDS (Cusack et al, 2023).

I.1.2.3.B. Hypertension pulmonaire

L'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) est une maladie vasculaire pulmonaire rare et grave, caractérisée par l'augmentation de la résistance des artères pulmonaires, aboutissant à une insuffisance cardiaque droite. L'HTAP est définie par une augmentation de la moyenne de la pression artérielle au repos supérieure à 20mmHg. Un remodelage de l'intima est observé avec une augmentation de l'épaisseur qui serait lié à la prolifération désorganisée des cellules endothéliales. La média est également augmentée chez les patients atteints d'hypertension de manière significative ainsi que l'adventice. Une inflammation est retrouvée suite à une accumulation de macrophages, de monocytes et de cellules dendritiques au niveau de l'adventice (Fig11) (Tuder 2017) (Beckmann et al. 2022).

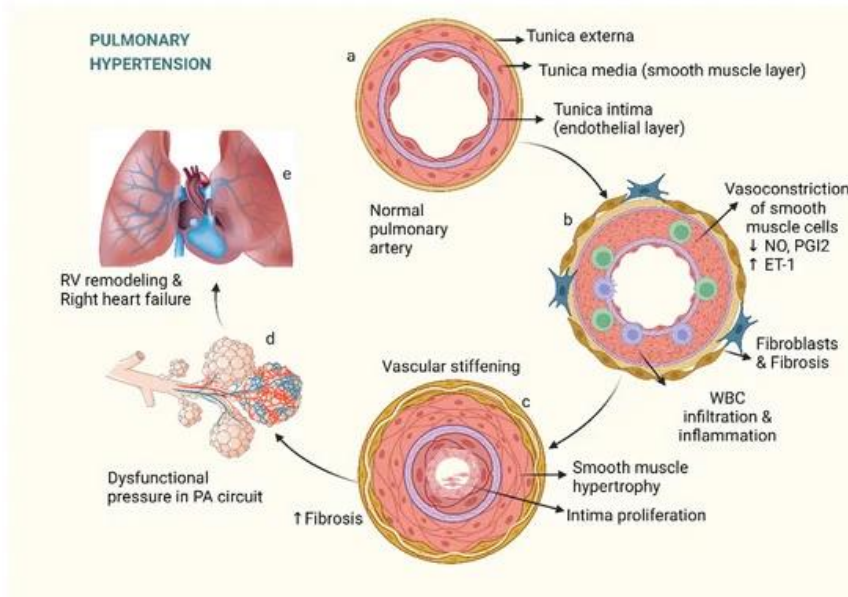


Figure 11 : Dérégulation des vasoconstricteurs conduisant au remodelage vasculaire avec une hypertrophie de la média, la prolifération des cellules endothéliales, l'augmentation des cytokines inflammatoires induisant une prolifération des fibroblastes et in fine à la modification de la pression et l'apparition de l'hypertension pulmonaire (Beckmann et al. 2022).

I.1.2.3.C. La fibrose pulmonaire idiopathique (FPI)

La FPI est induite par plusieurs facteurs d'ordre génétique et épigénétique, mais aussi par le vieillissement, les infections et les facteurs environnementaux, tout ceci conduisant à une perte importante de la capacité respiratoire. Elle se caractérise par une remodelisation dysfonctionnelle du parenchyme liée à l'activité excessive des myofibroblastes déposant la matrice extracellulaire ou collagène (la fibrose) et une dérégulation de l'inflammation (Y. Zhang et Wang 2023). Elle engendre un dysfonctionnement des cellules endothéliales en activant les voies profibrotiques, et en favorisant la transition mésenchymateuse des cellules endothéliales (Martin et al. s. d.). L'intégrité de la barrière est par conséquent grandement affectée, conduisant à une augmentation de la perméabilité, à la perte partielle des capillaires, à une augmentation locale de l'angiogenèse et de la présence de cellules endothéliales dans le parenchyme du poumon. La présence de stimuli fibrotiques induit la reprogrammation des cellules endothéliales induisant la formation d'œdèmes, ce qui contribue à l'inflammation. La perfusion au travers des vaisseaux est diminuée, induisant de l'hypoxie qui exacerbe la pathologie, laquelle se trouve favorisée par l'inflammation et les dommages à l'épithélium (Fig12) (Bian et al. 2023) (Borek et al. 2023).

I.1.2.3.D. Bronchopneumopathie chronique obstructive (Chronic obstructive pulmonary disease (COPD))

C'est une maladie inflammatoire caractérisée par une destruction du parenchyme, une obstruction des voies respiratoires et une production excessive de mucus. Un dysfonctionnement de l'endothélium est notamment remarqué par une réduction d'expression d'agents vasodilatateurs, un épaississement de l'intima avec une prolifération excessive et peu différenciée de cellules musculaires lisses et de protéines

de la matrice extracellulaire expliquant l'obstruction des voies respiratoires (Fig 12) (Borek et al. 2023). Les patients sont souvent atteints d'hypertension pulmonaire (Polverino, Celli et Owen 2018).

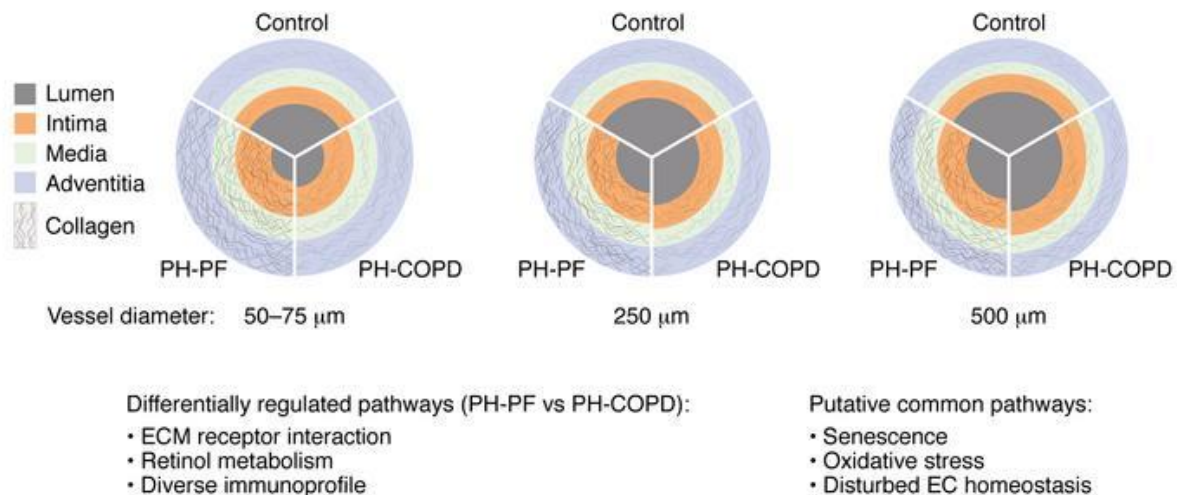


Figure 12: Remodelage vasculaire dans les poumons chez les patients atteints de fibrose pulmonaire associée à de l'hypertension (PH-PF) et COPD avec de l'hypertension (Borek et al. 2023).

I.1.3. L'angiogenèse

I.1.3.1. Les différents mécanismes de formation des vaisseaux

I.1.3.1.A. L'angiogenèse par bourgeonnement

En condition physiologique, les cellules endothéliales sont à l'état de quiescence. Toutefois, en réponse à un stress, à une blessure ou à l'hypoxie, les cellules endothéliales vont orchestrer tout un processus appelé angiogenèse impliquant la formation de nouveaux vaisseaux sous l'action de facteurs pro-angiogéniques comme le vascular growth factor (VEGF). L'angiogenèse est un processus finement régulé dont la première étape consiste en la dégradation partielle de la matrice extracellulaire (ECM) par l'action des métalloprotéases. À ce stade, les cellules endothéliales perdent le contact avec l'ECM et sont exposées aux collagènes interstitiels et à de nombreux facteurs pro-angiogéniques, ce qui entraîne l'activation de multiples voies de signalisation associées au bourgeonnement et à la réorganisation du cytosquelette. Les cellules endothéliales prolifèrent et migrent vers leur destination périvasculaire, processus au cours duquel elles vont former des tubes. Deux types de cellules endothéliales se distinguent au cours du bourgeonnement : les « tip cells » sont considérées comme les cellules migratoires qui vont suivre par chimiotactisme le gradient de VEGF pour former les vaisseaux tandis que les « stalk cells » sont les cellules qui vont suivre les tip cells (Gerhardt et al. 2003). La sélection des

cellules tip et stalk est régulée via VEGF et la voie Delta-like-4(Dll4)/Notch. En réponse à VEGF, les cellules « tip » produisent Dll4, (platelet derived growth factor subunit B) PDGF-B et vascular growth factor receptor VEGFR2, VEGFR3 (Lugano, Ramachandran et Dimberg 2020 ; Tammela et al. 2008). Le rôle de VEGF ici est d'inhiber la voie de signalisation Notch et ainsi favoriser le bourgeonnement, les branchements, et la formation de filopodes chez les cellules tip (Jakobsson et al. 2010). La sécrétion de Dll4 par les cellules « tip » active la voie Notch dans les cellules voisines empêchant la différenciation de ces dernières en cellules « tip » (Hellström et al. 2007). Dll4 joue aussi le rôle de régulateur négatif de l'angiogenèse empêchant des bourgeonnements excessifs (Lobov et al. 2007). La neuropiline, un récepteur ayant la capacité de fixer les molécules de la famille des sémaphorines, amplifie également l'action des cellules « tip » via l'activation des voies de signalisation de VEGFR2 et VEGFR3. La neuropiline peut fixer VEGF et servir de présentateur de VEGF au récepteur VEGFR2 (Fantin et al. 2013). En ce qui concerne les cellules « stalk », elles suivent les cellules « tip », ont la charge de la formation du lumen et des connexions des bourgeonnements. Elles ont plus une capacité de prolifération que de migration, comparées aux cellules « tip ». Les bourgeonnements entrent en contact et forment une jonction entre eux définie comme l'anastomose. Cette jonction peut être située entre deux bourgeonnements ou bien entre un bourgeonnement et un vaisseau préexistant (Lugano, Ramachandran et Dimberg 2020). À ce stade, les péricytes sont recrutés par le facteur PDGF-B tandis que l'angiopoïétine 1 et le TGF- β stabilisent les nouveaux vaisseaux (Fig13)(Fig14) (Krüger-Genge et al. 2019) (Betsholtz 2018).

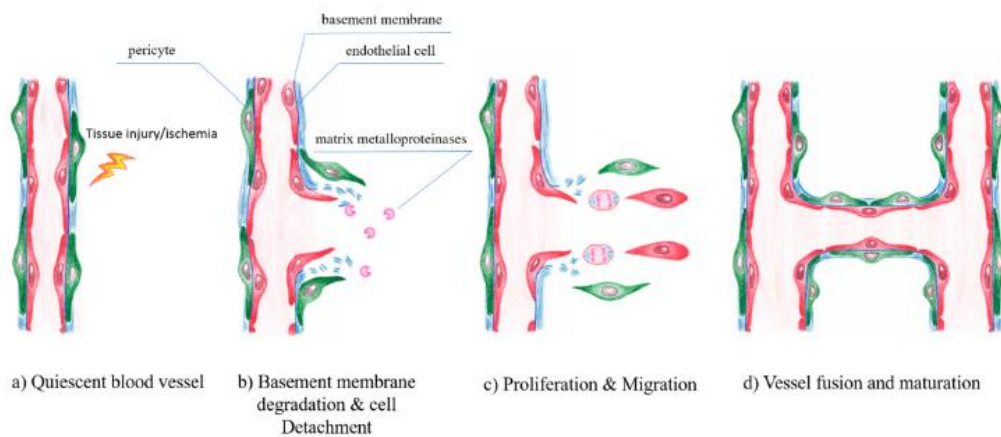


Figure 13: Les différentes étapes de l'angiogenèse par bourgeonnement (Krüger-Genge et al. 2019).

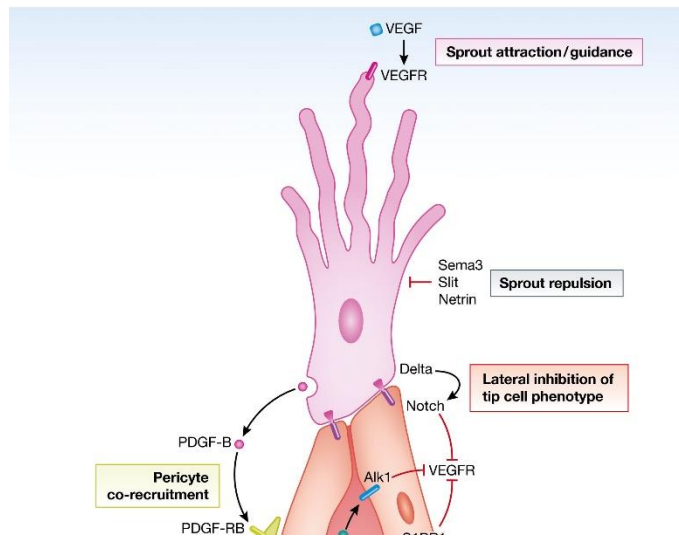


Figure 14 : Mécanismes moléculaires contribuant à l'activation des cellules « tip », l'élongation des cellules « stalk » et le recrutement des péricytes (Betsholtz, 2018).

I.1.3.1.B. L'angiogenèse par intussusception

Un autre moyen de néo-angiogenèse décrit dans la littérature est l'intussusception qui donne naissance à de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux existants par un mécanisme d'invagination. Il ne nécessite pas une forte prolifération des cellules ni de dégradation de l'ECM. Le VEGF, le PDGF et les forces hémodynamiques sont les facteurs majeurs contribuant à ce processus (Ahmadi et Rezaie 2020; Wilting et al. 1996, 121) qui est défini par la formation d'un pilier intraluminal dans le vaisseau. Les cellules endothéliales sont restructurées et forment un trou au centre de ce pilier. Ce pilier est ensuite occupé par des péricytes et des fibroblastes qui synthétisent de l'ECM. Toutes ces étapes conduisent à la séparation du vaisseau en deux nouveaux vaisseaux de plus petit diamètre (Fig15) (Ahmadi et Rezaie 2020). Ce type de processus a été décrit dans plusieurs cas de cancers comme le mélanome et le cancer colorectal (Patan, Munn, et Jain 1996; Ribatti et al. 2005)

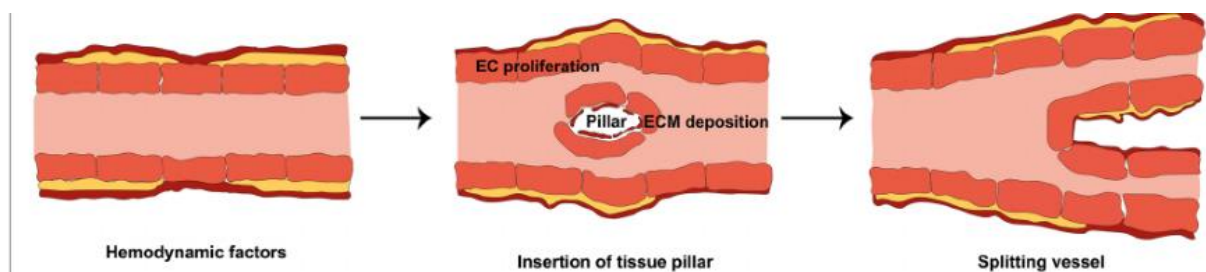


Figure 15 : L'intussusception ou la formation de 2 vaisseaux à partir d'un vaisseau existant (Ahmadi et Rezaie 2020)

I.1.3.1.C. La vasculogénèse

Durant le développement, de nouveaux vaisseaux sont formés à partir des cellules progénitrices endothéliales qui se différencient et s'associent. Ce processus appelé la vasculogénèse, mobilise les angioblastes qui se différencient en précurseurs des cellules endothéliales. Ces derniers vont migrer vers le mésoderme paraxial, s'assembler, proliférer et se différencier pour former un plexus avec le tube endocardial (Fig16) (Lugano, Ramachandran, et Dimberg 2020). Ces étapes donnent lieu à la formation de l'aorte dorsale et des veines cardinales. Il a été démontré qu'après irradiation, c'était la vasculogénèse et non l'angiogénèse qui se produisait dans le cas de glioblastome (Kioi et al. 2010). Dans ce contexte-ci, le recrutement des progéniteurs ou des cellules hématopoïétiques de la moelle osseuse participent à la formation de nouveaux vaisseaux et contribuent au développement de la croissance tumorale. Les progéniteurs pourraient être ainsi utilisés comme des marqueurs prédictifs de cancer (Ahn et al. 2010).

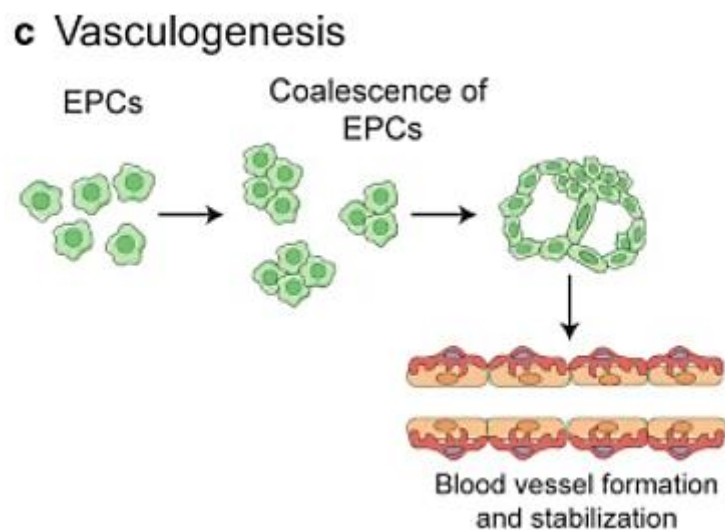


Figure 16: La vasculogénèse pendant le développement (Lugano, Ramachandran, et Dimberg 2020)

I.1.3.2. VEGF, acteur central de l'angiogénèse

I.1.3.2.A. La famille de VEGF

Le vascular growth factor ou VEGF est l'un des facteurs clés de l'angiogénèse comme il a pu être constaté dans l'intussusception et l'angiogénèse par bourgeonnement. L'idée d'une protéine favorisant la formation des vaisseaux sanguins avait été émise dans les années 1935-1945. Il faudra attendre 1983 pour qu'elle soit identifiée en tant que Vascular Permeability Factor, et 1989 avant qu'elle soit séquencée et isolée en tant que VEGF, une heparin-binding protein de 45kDa par Dr Ferrara (Ferrara et Adamis 2016). Cette approche fut cruciale pour l'évolution de la connaissance du rôle de VEGF et de l'angiogénèse en elle-même. VEGF ou VEGF-A fait partie d'une famille de protéines incluant VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E et placental growth factor impliquées dans plusieurs fonctions. VEGF-C et VEGF-D sont principalement responsables de la lymphangiogénèse (Alitalo, Tammela, et Petrova 2005)

tandis que VEGF-A joue un rôle dominant dans l'angiogenèse. Récemment VEGF-B a été décrit comme un inhibiteur de l'angiogenèse via l'inhibition de la voie du fibroblast growth factor 2 et son récepteur (FGF2/FGFR1). En terme mécanistique, VEGF-B se lie à FGFR1 formant un complexe avec VEGFR1 provoquant la diminution drastique de l'angiogenèse et la croissance tumorale (Lee et al. 2023). De plus, VEGF-E a également été décrit comme un homologue de la famille de VEGF dans le génome de parapoxvirus Orf virus et est aussi engagé dans l'angiogenèse et l'inflammation au niveau de la peau issue de l'infection par le virus. Il contrôle l'angiogenèse via la voie de signalisation de VEGFR2 (Meyer et al. 1999).

I.1.3.2.B. VEGF ou VEGF-A

Chez l'adulte, VEGF induit la prolifération, la migration, le bourgeonnement et la formation des tubes par les cellules endothéliales. Il est également un facteur de survie des cellules endothéliales associé à la VE-cadhérine tout comme il est fortement impliqué dans la croissance tumorale. Durant le développement des embryons de souris, le gène *Vegfa* a été identifié comme le premier exprimé dans la partie antérieure de l'embryon où il induit la migration des cellules porteuses de son récepteur. VEGF est une glycoprotéine de 165 acides aminés présentant un poids moléculaire de 45kDa en condition non dénaturante et de 23 kDa en condition dénaturante (Pérez-Gutiérrez et Ferrara 2023). VEGF a plusieurs isoformes liées à différentes excisions de l'exon 6 et 7 : VEGF121, 165, 189 et 206 donnant lieu à des protéines avec un nombre d'acides aminés différents: 121, 165, 189 et 206 respectivement. VEGFA 165 est la forme la plus exprimée dans les tissus sains et dans les tumeurs tandis que les formes VEGFA 145 et 183 sont moins communes. Ce qui distingue les isoformes, est leur capacité à se lier à l'héparine. VEGF 121 a une faible affinité pour cette dernière contrairement à VEGF 189 et VEGF 206 qui contiennent chacun deux domaines de liaison à l'héparine (codé dans l'exon 6 et 7) et sont ainsi séquestrés dans l'ECM. Pour le cas de VEGF 165, il possède un seul domaine de liaison codé dans l'exon 7, ce qui le rend à la fois diffusible et séquestré dans l'ECM (Houck et al. 1992). Certaines protéases comme la plasmine et la métalloprotéase MMP3 peuvent rendre VEGF165 diffusible en agissant sur la partie COOH terminale enchâssée dans l'ECM (Apte, Chen, et Ferrara 2019). D'autres isoformes particulières ont été décrites pour VEGF comme VEGF165b qui aurait une activité inhibitrice et est fortement dérégulé dans les tumeurs rénales (Bates et al. 2002). En effet, une surexpression induite de VEGF165b dans les tumeurs de la prostate, du colon et des mélanomes retardent leur croissance (Harper et Bates 2008). L'autre isoforme particulier est VEGF-Ax qui a d'abord été décrit comme un isoforme possédant une extension de 22 acides aminés dans sa partie terminale COOH par rapport à VEGF165 avec une capacité anti-angiogénique. Son inhibition conduit à une augmentation de la prolifération, de la migration et de la formation de tubes (Eswarappa et al. 2014). Toutefois, deux ans plus tard, une autre équipe contredit les résultats et décrit cet isoforme avec une capacité pro-angiogénique, mitogénique bien que son activité soit moins efficace que celle de VEGF165 par son impossibilité à se lier à la neuropiline 1 (Xin et al. 2016).

I.1.3.2.C. Les récepteurs de VEGF

La famille des VEGF se lie aussi bien à ses récepteurs (VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3) présents à la surface des cellules endothéliales ainsi qu'à des co-récepteurs (neuropilline 1 et neuropilline 2) (Fig17). (Pérez-Gutiérrez et Ferrara 2023).

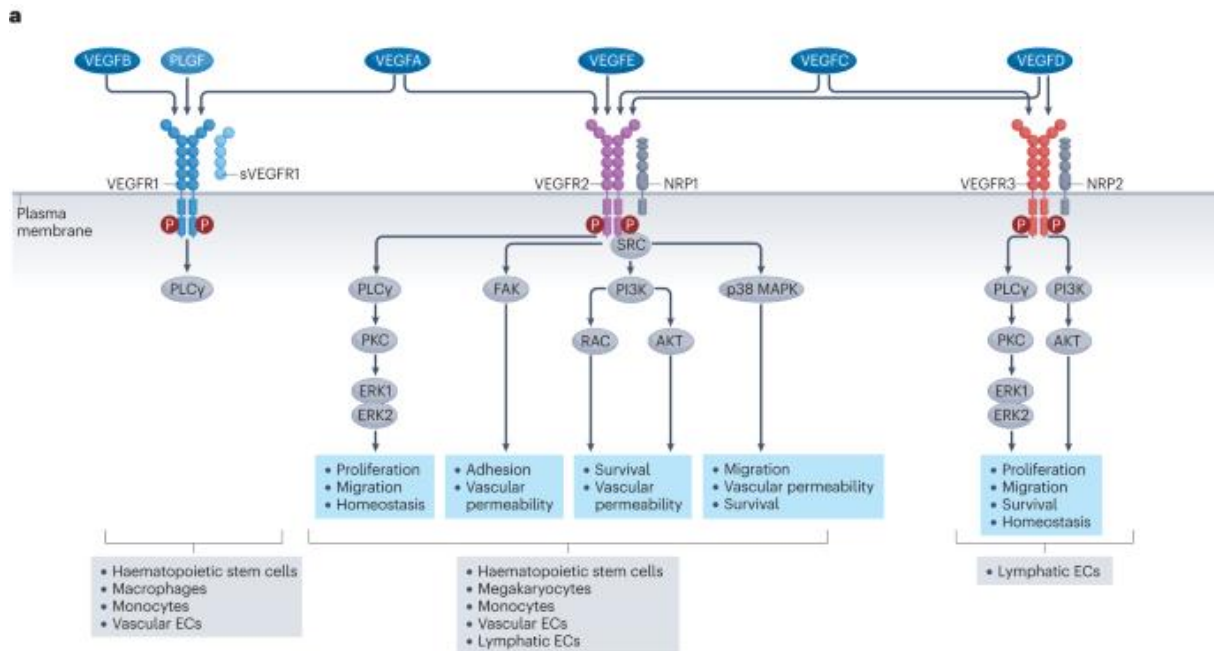


Figure 17: VEGF-VEGFR interaction et voies de signalisation (Pérez-Gutiérrez et Ferrara 2023)

- **VEGFR1 :**

VEGFR1 est également connu sous le nom de FLT1 et présente un domaine à sept boucles immunoglobulines dans la partie extracellulaire, un domaine transmembranaire et un domaine cytoplasmique. Il existe une forme clivée de VEGFR1 non ancrée à la membrane qui sera sous forme soluble. Cette forme de VEGFR1 joue le rôle de guide dans l'élongation des vaisseaux au cours de la morphogénèse en contrôlant le gradient de VEGF-A. Il a également été décrit comme un leurre de part sa capacité à attirer VEGF-A mais son absence de partie intracellulaire empêche toute activation de voie de signalisation et lui confère des propriétés anti-angiogéniques. Elle est présente dans le placenta où une surexpression de VEGFR1 soluble est détectée chez les femmes enceintes atteintes de pré-éclampsie (Fig17) (Maynard et al. 2003). Cette forme soluble a également été retrouvée chez les patients atteints de maladie chronique du rein où la microvasculature rénale des glomérules est très sensible à la variation de VEGF-A. De plus, une faible expression de la forme soluble de VEGFR1 est observée chez les patients atteints de la dégénération maculaire liée à l'âge associée à une neovascularisation choroïdienne (Failla, Carbo, et Morea 2018).

VEGFR1 est essentiellement exprimé dans les cellules endothéliales mais aussi sur les cellules souches hématopoïétiques, les macrophages, les monocytes et les cellules tumorales (Pérez-Gutiérrez et Ferrara 2023). Bien que VEGFR1 présente une forte affinité pour VEGF, il n'a pourtant pas une forte activité signalétique du fait de son absence de phosphorylation sur tyrosine après stimulation. De ce fait, VEGFR1 est plutôt défini comme un récepteur leurre qui, au lieu d'induire l'angiogenèse et la prolifération, va contrôler négativement l'activité de VEGF. En effet, il a été proposé que VEGFA soit séquestré par VEGFR1, le rendant moins disponible pour son autre récepteur VEGFR2 (Park et al. 1994). Chez des patientes atteints de cancer du sein, la concentration de VEGFR1 était proportionnelle aux taux de survie (Lebok et al. 2016).

- **VEGFR2 :**

VEGFR2, connu comme KDR ou FLK1 chez la souris a un domaine extracellulaire à sept boucles d'immunoglobulines, un domaine transmembranaire (TMD), un domaine juxtamembrane (JMD), et un domaine cytoplasmique à activité tyrosine kinase. Dans ce domaine, il y a un site de liaison à l'ATP (TKD1), un domaine insert kinase (KID), un domaine phosphotransférase (TKD2) et un domaine C-ter flexible (CTD) (Fig18)(X. Wang et al. 2020).

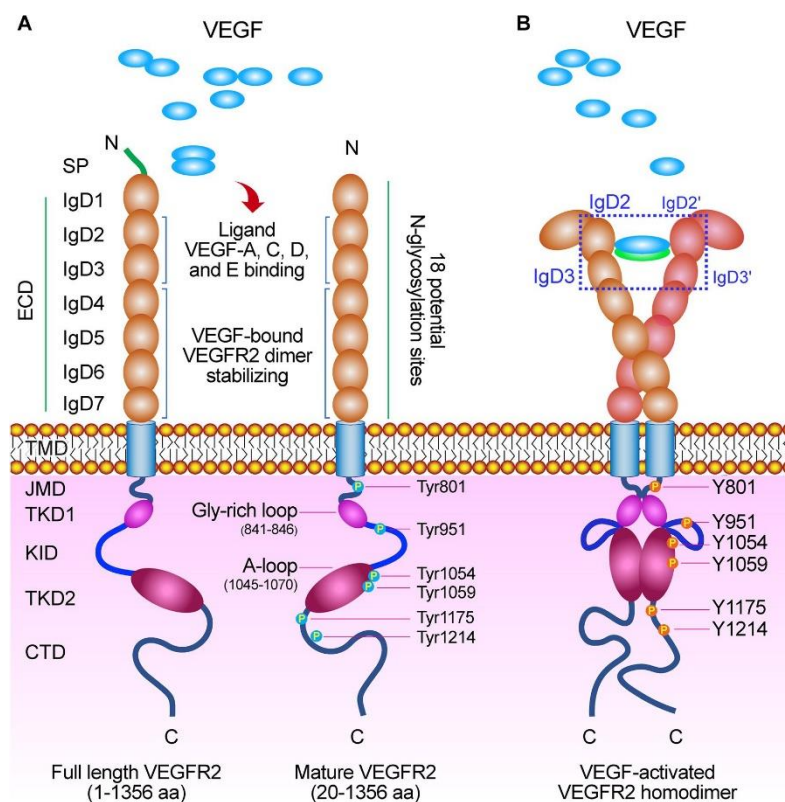


Figure 18: Structure et mécanisme d'activation de VEGFR2
(Wang et al. 2020)

VEGFR2 est majoritairement exprimé dans les cellules endothéliales vasculaires et lymphatiques ainsi que dans les cellules hématopoïétiques. VEGFR2 est une protéine d'un poids moléculaire apparent de 200-230kDa qui a la capacité de lier VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E mais plus particulièrement VEGF-A

(Fig17) (Pérez-Gutiérrez et Ferrara 2023). La liaison d'un ligand de la famille de VEGF induit l'activation de VEGFR2. En effet, VEGF se lie à l'homodimère au niveau du domaine immunoglobine 2 et 3 entraînant l'autophosphorylation sur tyrosine dans son domaine kinase et sa dimérisation essentielle pour avoir une liaison forte avec VEGF (Fig18) (X. Wang et al. 2020). La phosphorylation des sites Y1054 et Y1059 est requise pour atteindre l'activation maximale de VEGFR2. VEGF peut en plus se lier à la neuropilline 1 (NRP-1) pour accentuer son affinité au récepteur (Soker et al. 1998).

Ce récepteur est l'acteur clé dans la perméabilité, l'angiogenèse et la prolifération cellulaire. L'activation de VEGFR2 conduit à la régulation de différentes voies de signalisation (Fig19) (Zhu et Zhou 2015) :

-Les voies de ERK/MAPKs qui vont être impliquées principalement dans la migration et la prolifération des cellules endothéliales. L'activation de ces voies nécessite la phosphorylation du site Y1175 de VEGFR2 (chez la souris Y1173) qui recrute Src homology-2 domain containing protein B (SHB). En effet, une mutation sur cette tyrosine induit un profond défaut dans la formation des vaisseaux et dans l'angiogenèse induisant la mort *in utero* au jour 8.5-9.5 (Sakurai et al. 2005).

-La tyrosine kinase d'adhésions focales (focal adhesion kinase: FAK) via la phosphorylation de Y1175 (Y1173 chez les souris) mobilise SHB qui à son tour active FAK impliquée dans l'adhésion des cellules et leur migration.

-La voie phospholipase C isoformes gamma (PLC gamma) via la phosphorylation du site Y1175, recrute les voies de signalisation dépendante du calcium qui sont plus impliquées dans la prolifération cellulaire, la réplication de l'ADN et la perméabilité.

-La voie Phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/ protéine kinase B (Akt) via la phosphorylation du site Y951 (949 chez les souris) conduit au recrutement de la protéine adaptatrice T cell-specific adaptor (Tsad) et à l'activation de proto-oncogène tyrosine-protéine kinase Src (Src). Src active PI3K/Akt et contribue à la perméabilité cellulaire et à la survie (X. Wang et al. 2020).

-La motilité est également régulée par le site Y1214 phosphorylé induisant la liaison à SH2/SH3 adaptor protein neuronal CDK (NCK) et l'activation de la voie p38/ Mitogen-activated protein kinases (MAPKs).

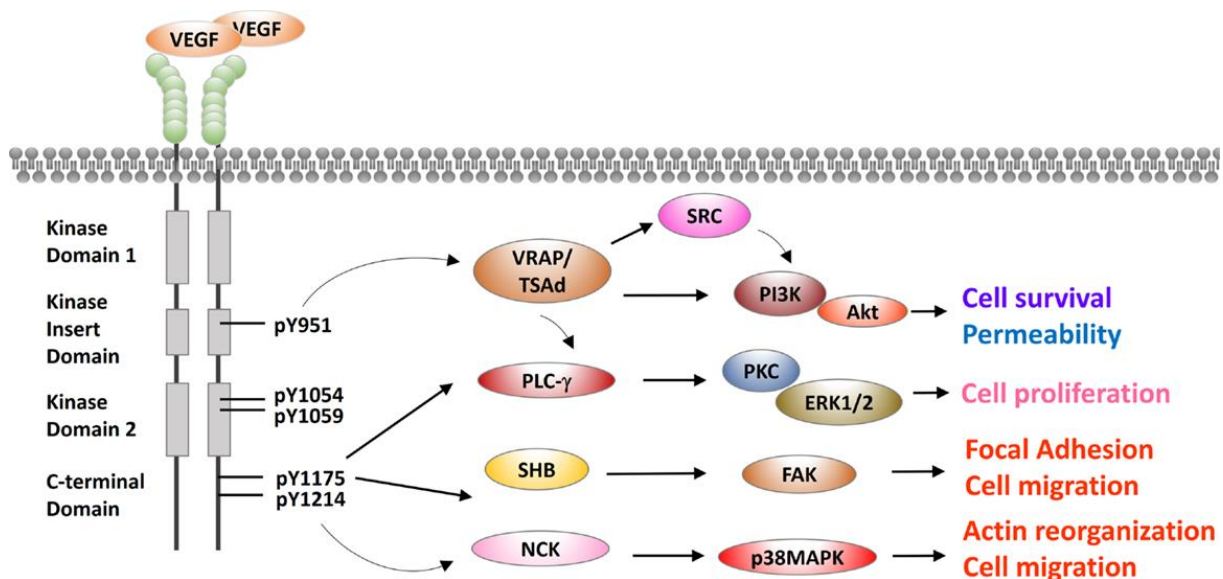


Figure 19 : Les cascades de signalisation de VEGFR2 (Zhu et Zhou 2015)

- **VEGFR3 :**

VEGFR3 est quant à lui largement impliqué dans la lymphangiogenèse (Fig17). Il a une forte affinité pour VEGF-C et VEGF-D. Chez l'adulte, VEGFR3 est majoritairement exprimé dans les cellules endothéliales lymphatiques. L'activation de VEGFR3 promeut la prolifération, la migration à travers l'activation d'une cascade de signalisation comprenant Akt et PI3K (Fig17)(Pérez-Gutiérrez et Ferrara 2023). Dans le cas de tumeur, il est associé à la lymphangiogenèse tumorale et au développement des métastases (Tacconi et al. 2019).

I.2. Les cellules endothéliales et leur hétérogénéité

L'endothélium vasculaire, décrit pour la première fois en 1865, est composé d'une mono couche de cellules endothéliales qui tapisse la face interne de tout le système vasculaire. Cette mono-couche représente à elle-seule une surface de 3000 à 6000 m² (Gimbrone 1987). Les cellules endothéliales sont ancrées à la lame basale et la quantité est estimée à plus de 10 trillions de cellules chez l'adulte. Les cellules endothéliales doivent maintenir l'homéostasie des vaisseaux sanguins en participant à la régulation de l'intégrité de la barrière endothéliale, du transfert de protéines, d'ions et d'eau. Elles contribuent également à la stabilisation du flux sanguin par la sécrétion de facteurs contrôlant la vasoconstriction et la vasodilatation. Leur champ d'action atteint les cellules avoisinantes comme les cellules musculaires lisses et les leucocytes (Galley et Webster 2004a).

A l'âge adulte, les cellules endothéliales sont à l'état de quiescence caractérisé par l'absence de prolifération, de migration et de signaux stimulants. Les cellules endothéliales ont en effet une activité de

prolifération très faible voire absentes, sauf dans le foie et la rate où il a été démontré que le taux de prolifération des cellules avoisinait les 1% (Kalucka et al. 2020). De plus, la demi-vie des cellules, estimée par incorporation au Carbone 14, s'est révélée autour de 6 ans pour les cellules endothéliales cardiaques montrant leur très faible capacité proliférative (Bergmann et al. 2015). Bien qu'elles soient dites quiescentes, elles sont cependant très actives avec la possibilité d'engager diverses voies de signalisation comme celles de régulations endocrines, autocrines et paracrines pour répondre aux signaux environnants, afin de remplir toutes les fonctions nécessaires au maintien de l'homéostasie des vaisseaux (Ricard et al. 2021).

I.2.1. La structure des cellules endothéliales

Les cellules endothéliales proviennent des hémangioblastes et des angioblastes issus du mésoderme. Au cours du développement, elles se différencient en cellules endothéliales selon les signaux perçus activant des facteurs de transcriptions (Foxc, Foxo, Mef2c, Etv2 par exemple) et des voies de signalisation spécifiques (PI3K-Akt, mTOR, Notch) nécessaires au contrôle du devenir de la cellule (Fig20) (Tsuji-Tamura et Ogawa 2018). Les hémangioblastes peuvent se différencier en cellules endothéliales ou en cellules hématopoïétiques.

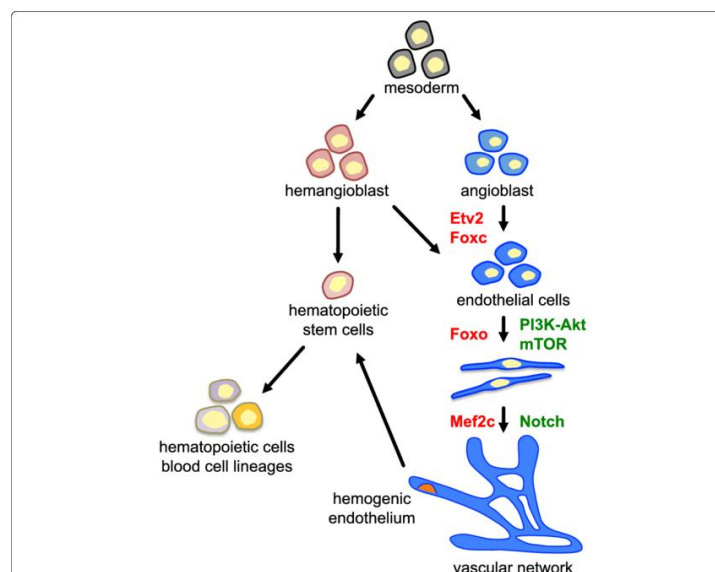


Figure 20: Formation des cellules endothéliales (Tsuji-Tamura et Ogawa 2018)

Afin d'accomplir ces différentes fonctions, la cellule endothéliale possède une structure qui lui est propre. Sa forme peut varier en fonction de l'organe et du lit vasculaire mais elles sont généralement fines avec une épaisseur comprise entre 0,1 et 10 μm et une longueur comprise entre 30 et 50 μm (Krüger-Genge et al. 2019). Elles sont polarisées ce qui signifie que leur membrane apicale est orientée vers le sang et en contact direct avec les cellules sanguines. La surface basale quant à elle est séparée du tissu, des péricytes et des cellules musculaires lisses par une couche de la matrice extracellulaire tandis que sa surface apicale contient une couche de protéines appelée glycocalyx (Fig21)(Sluiter et al. 2021).

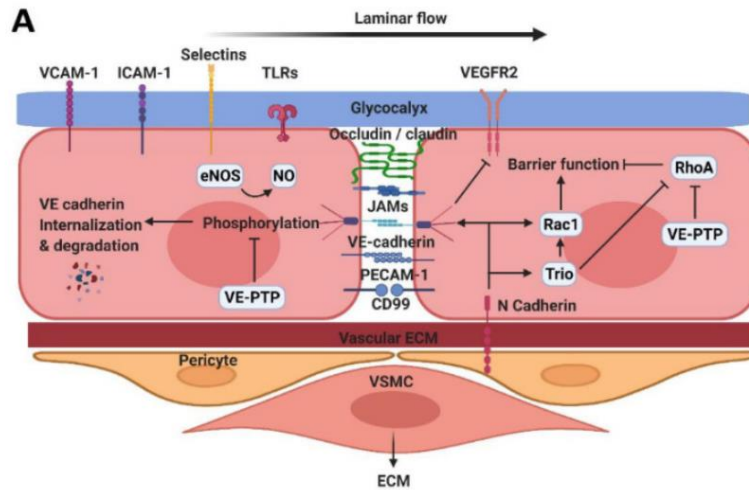


Figure 21: Structure de la cellule endothéliale (Sluiter et al. 2021)

Légende :

VSMC : cellules musculaires lisses (Vascular Smooth Muscle cells),

ECM : matrice extracellulaire

Elles s'orientent en fonction du flux sanguin pour minimiser la résistance (Fig22)(Sfriso et al. 2018).

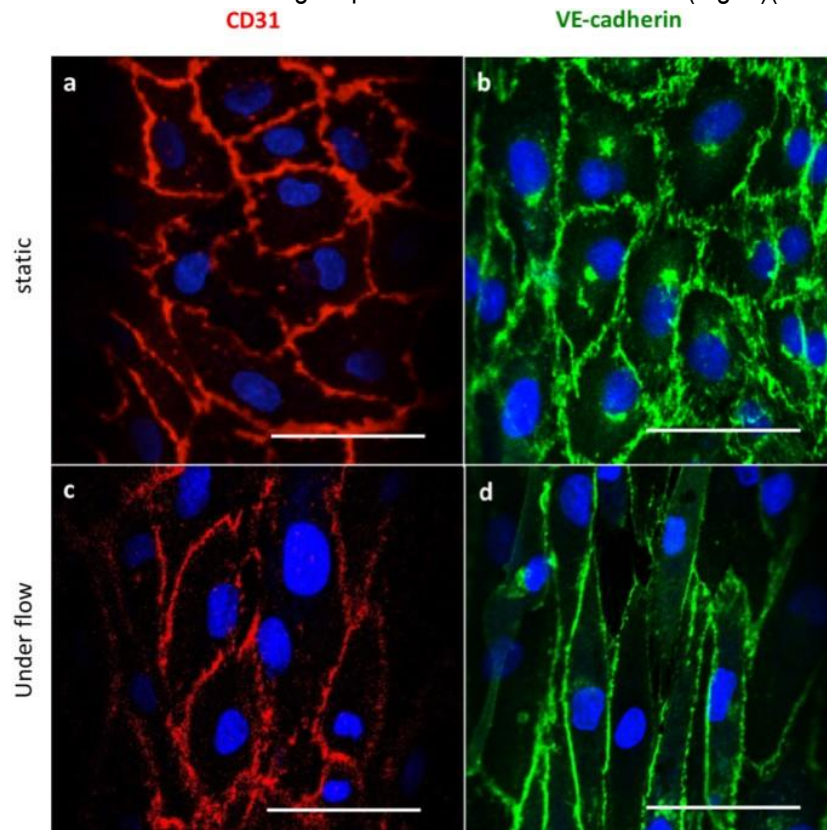


Figure 22: Immunofluorescence de la VE-cadhérine et de CD31 dans des cellules endothéliales d'aorte de porc en condition sans flux (a,b) et avec flux (c,d). (Sfriso et al. 2018)

In vitro, les cellules endothéliales ont un phénotype de type pavé(Fig23) (Lau et al. 2021).

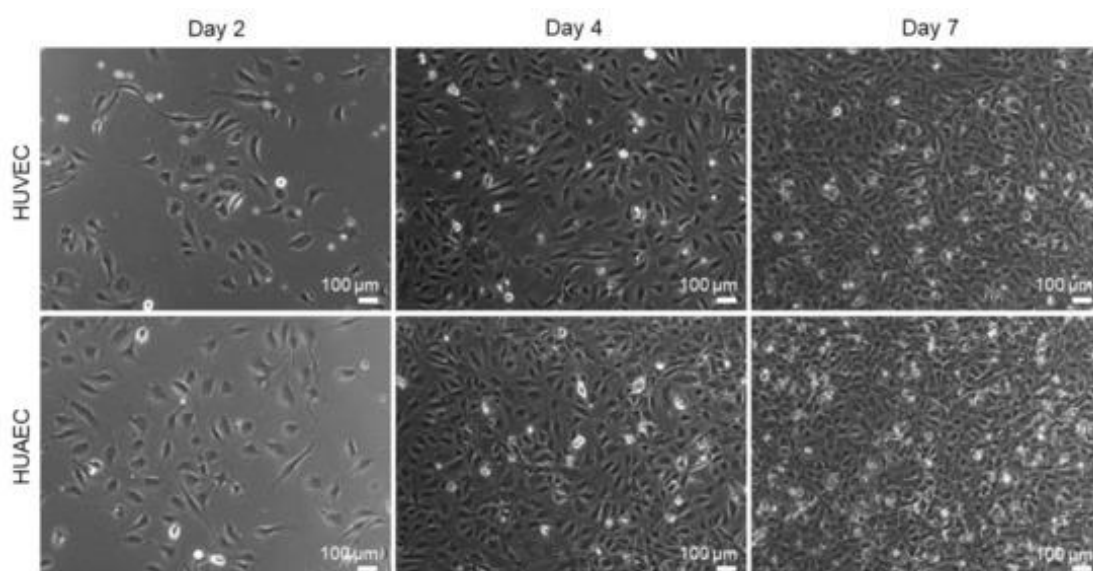


Figure 23: Images en microscopie à contraste de phase de cellules endothéliales de veine de cordon ombilical humain (HUVECs) ou d'artère (HUAEC)ensemencées à 15 000 cellules par puits et cultivées pendant 2, 4 et 7 jours. Grossissement 10x (Lau et al. 2021).

I.2.1.1. Le glycocalyx

La surface apicale des cellules endothéliales possède une couche de protéines appelée glycocalyx qui est synthétisée par les cellules. Ce sont des protéoglycanes à longues chaînes de glycosaminoglycanes (GAG), des glycoprotéines et d'autres molécules liées à la coagulation telle que l'antithrombine III, la superoxyde dismutase et l'acide hyaluronique. Sa composition peut varier en fonction des fluctuations de la pression sanguine (Krüger-Genge et al. 2019) ou en fonction du lit vasculaire dont l'épaisseur peut aller de 0,5 μm pour les capillaires à 4,5 μm dans les grosses artères (Villalba, Baby et Yuan 2021). Ce glycocalyx va former une barrière entre le sang et l'endothélium en empêchant le passage de molécules de poids moléculaire supérieur à 70 kDa, des plaquettes et des cellules sanguines (Fig24) (Krüger-Genge et al. 2019 ; Reitsma et al. 2007).

De plus, ce glycocalyx régule l'adhésion des molécules grâce à la grande concentration de charges anioniques portée par la chaîne GAG et favorise ainsi l'adsorption des molécules chargées positivement. Le glycocalyx est aussi capable d'agir comme un mécano-senseur permettant aux cellules endothéliales de capter les stress mécaniques. En effet, le flux sanguin exerce des forces mécaniques sur les cellules endothéliales perçues par le glycocalyx qui peut induire la production d'oxyde nitrique, un modulateur du tonus vasculaire (Villalba, Baby et Yuan 2021). De plus, le changement de conformation du glycocalyx peut à l'inverse influencer aussi le tonus vasculaire car une diminution de flux suite à la diminution de la production d'oxyde nitrique a été observée après la dégradation de l'acide hyaluronique GAG (Mochizuki et al. 2003)

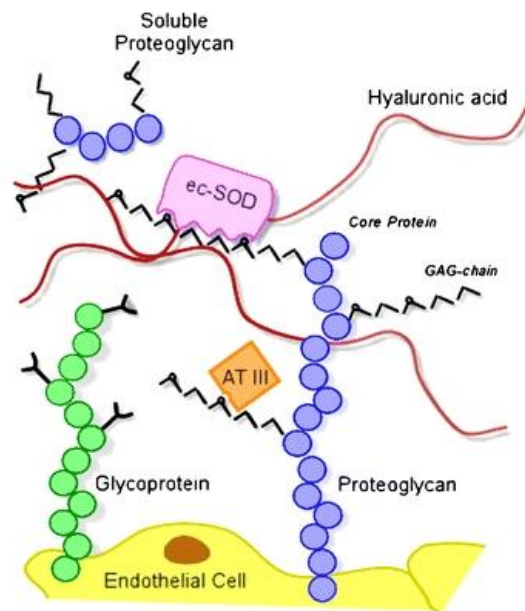


Figure 24: Schéma représentant la structure du glycocalyx et sa composition. (Krüger-Genge et al. 2019; Reitsma et al. 2007)

AT III : antithrombine III

GAG-chain : glycosaminoglycan

Ec-SOD : extracellulaires superoxyde dismutase

I.2.2. L'hétérogénéité des cellules endothéliales

Pour répondre aux besoins de chaque organe, les cellules endothéliales sont très plastiques et forment des endothéliums très hétérogènes. Bien que les cellules endothéliales soient décrites comme des cellules plates, elles présentent en réalité des différences phénotypiques selon leur localisation. Elles sont par exemple légèrement plus cubiques au niveau des veinules et leur épaisseur peut varier entre 0.1 μm dans les capillaires et 1 μm au niveau de l'aorte (Aird 2007). En comparant les cellules de l'aorte et les cellules de l'artère pulmonaire, il a été distingué que les premières étaient plus étroites et longues tandis que les deuxièmes étaient plus courtes mais plus larges. Au sein d'un même organe, on peut apercevoir des différences notables comme dans le poumon où les cellules endothéliales artérielles ont une forme rectangulaire, contrairement aux cellules veineuses qui sont plus rondes (Kibria et al. 1980).

L'un des exemples d'hétérogénéité est les hautes veinules endothéliales (High Endothelial Venules, HEV) qui sont des veinules post-capillaires, dont les cellules endothéliales sont caractérisées par leur aspect cubique et bombé, entourées d'une épaisse couche de membrane basale contrairement à la morphologie des autres cellules endothéliales. Elles sont exclusivement présentes dans les organes lymphoïdes secondaires à l'exception de la rate. Les HEV jouent un rôle essentiel dans la migration des lymphocytes et ainsi dans la surveillance immunitaire face aux bactéries et aux virus mais également face aux cellules cancéreuses. Elles autorisent l'entrée des cellules naïves et des lymphocytes T mémoires dans les organes lymphoïdes, lieu de rencontre avec les antigènes et ainsi initier la réponse immunitaire (Ruddle 2023). Une combinaison de l'adressine exprimé par HEV et des cytokines comme CCL21 facilitent la capture et l'ancrage des cellules naïves sur les HEV et promeut leur extravasation. Les HEV apparaissent également dans de nombreux organes atteints de maladies inflammatoires comme les maladies autoimmunes pancréatiques, les maladies inflammatoires de la peau (Hussain et al. 2022). Dans ces cas-ci les HEV vont contribuer aux recrutements anormaux des lymphocytes (Girard et Springer 1995). Les HEV ont également été retrouvées dans les cancers et joueraient un rôle important dans l'entrée des lymphocytes dans les tumeurs et ainsi contribuer à un processus anti-tumoral. En effet, l'analyse des tumeurs du sein ont montré une corrélation entre la densité des HEV, l'augmentation de l'infiltration des lymphocytes et l'amélioration du pronostic (Hussain et al. 2022) (Milutinovic et Gallimore 2023). Les analyses transcriptomiques ont d'ailleurs mis en évidence une hétérogénéité des HEV entre les organes lymphoïdes, au sein de même des organes (par l'expression de molécules facilitant la migration de certains types de lymphocytes) et entre les conditions d'homéostasie, inflammatoires et cancéreuses. Nous pouvons prendre en exemple une stimulation inflammatoire où l'expression des gènes inflammatoires se retrouvent transitoirement augmentée, associée à une baisse transitoire de l'expression des gènes retrouvés dans les HEV dits matures. Le changement éphémère de phénotype permet aux HEV d'acquérir un double phénotype permettant le recrutement de cellules naïves et des lymphocytes activés (Veerman et al. 2019).

Les jonctions entre les cellules endothéliales vont également varier selon leur lit vasculaire en fonction des besoins des organes et des flux sanguins. Ainsi les artères, exposé à un fort stress et un fort flux, ont un réseau de jonctions serrées très développé contrairement aux veinules. Par exemple, on trouve dans le cerveau des vaisseaux composés majoritairement de jonctions serrées pour le protéger contre les fluctuations sanguines et les modifications de composition du sang (Aird 2007). La diversification de la

composition des jonctions va grandement affecter le rôle des cellules endothéliales aussi bien au niveau de la perméabilité que de l'extravasation des leucocytes.

I.2.3 Les fonctions des cellules endothéliales

I.2.3.1. Perméabilité

Pour le transport des cellules, ions, solutés et protéines, l'endothélium va être plus ou moins perméable en fonction des besoins des organes. L'endothélium des capillaires est non fenestré et continu où le passage des molécules est plus finement régulé pour le bon fonctionnement des organes, comme c'est le cas pour le poumon, le cerveau, la peau et le cœur. L'endothélium fenestré continu est retrouvé dans des organes où la filtration et le transport transendothélial sont cruciaux, notamment pour les organes endocriniens et les reins. La fenestration sont des pores transcellulaires d'un diamètre autour de 70 μm . Enfin, les endothéliums discontinus sinusoidaux avec de larges fenestrations (supérieur à 100 μm) sont retrouvés dans le foie (Aird 2007).

L'inflammation engendre une modification de la perméabilité induisant le passage de nombreuses molécules pro-inflammatoires jusqu'aux passages de cellules. La réponse aux agents pro-inflammatoires est différente selon le type de vaisseaux. La stimulation du tumor necrosis factor alpha (TNF- α) chez les souris montre une réponse inflammatoire plus importante au niveau des veines caves inférieures, contrairement aux aortes, avec une augmentation de la perméabilité, de l'adhésion et l'extravasation des leucocytes (Eriksson et al. 2005). Tout comme dans les modèles de rat diabétique, la perméabilité fut d'abord observée au niveau des artérioles avant les capillaires (Barber et Antonetti 2003).

I.2.3.2. La diapédèse des leucocytes

L'interaction entre les leucocytes et les cellules endothéliales est largement remarquée au niveau des veinules post-capillaires dans la peau, les muscles squelettiques, le mésentère mais certaines études ont montré qu'elle pouvait exister en moindre mesure dans les veines, les capillaires et les artérioles (Aird 2007; Eriksson et al. 2005). Les étapes de l'extravasation des leucocytes se retrouvent modifiées en fonction du lit vasculaire. Contrairement au dogme établi sur la diapédèse des leucocytes, les leucocytes du foie migrent en premier lieu dans les sinusoides via un mécanisme indépendant des sélectines mais des molécules d'adhésion intercellulaire (intercellular adhesion molecule (ICAM)) (Aird 2007). Dans le cas du poumon, les leucocytes doivent traverser deux barrières: l'endothélium et l'épithélium. Les leucocytes adhèrent à l'endothélium au niveau des capillaires indépendamment de l'étape de roulement et seront plus dépendants de ICAM-1 que de P et E-selectine. Plus particulièrement dans le poumon exposé à l'hypoxie, l'expression de P-selectine était augmentée seulement dans les artérioles tandis que l'expression de ICAM-1 était quant à elle augmentée dans les capillaires induisant la séquestration des leucocytes (Fig25) (Aird 2007; Nishio et al. 1998).

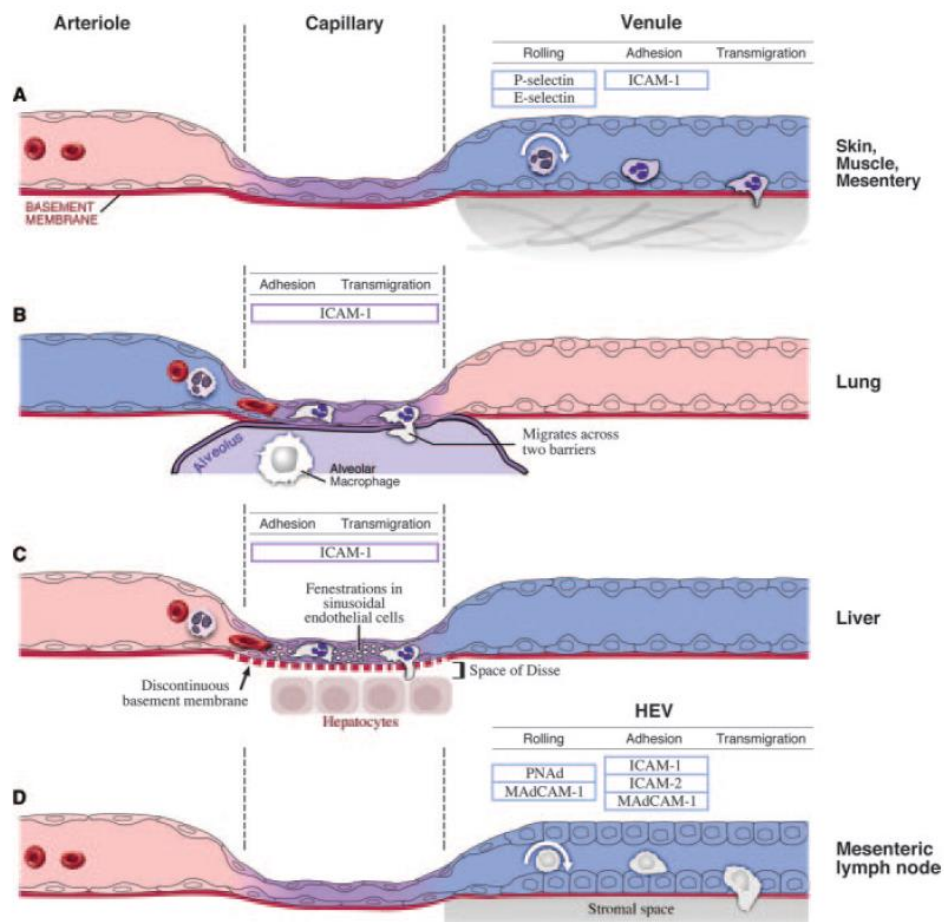


Figure 25 : Endothelium et la diapédèse des leucocytes. (Aird et al, 2007)

I.2.3.3. La thrombose

Bien que les cellules endothéliales soient en contact proche avec les plaquettes sanguines, une fine régulation est mise en place dans le système vasculaire d'un organe sain pour éviter toute étape de coagulation. La moindre dérégulation peut en effet entraîner des changements pro-inflammatoires et pro-coagulants. Les plaquettes sanguines circulent dans le sang à l'état de repos. Les cellules endothéliales ont un effet régulateur de ce bon fonctionnement plaquettaire par la sécrétion de divers facteurs qui empêchent leur agrégation, leur adhérence au tissu endothélial et leur activation. L'agrégation plaquettaire dépend aussi de l'adénosine triphosphate (ATP), l'adénosine diphosphate (ADP) ou monophosphate (AMP) qui sont secrétées à faible concentration par les cellules endothéliales en condition physiologique. Cependant, en cas de stress ou de blessure, leur concentration s'accroît fortement, favorisant l'agrégation des plaquettes. Pour contrer cela, l'ecto-nucléotidase (E-NTPDase1) exprimée par les cellules endothéliales convertit l'ATP ou l'ADP en AMP ce qui engendre le phénomène d'anti-agrégation (Krüger-Genge et al. 2019; Pearson, Carleton, et Gordon 1980). Les cellules endothéliales synthétisent ces protéines anti-coagulantes en réponse à des signaux externes comme la thrombine, ou bradykinine, épinéphrine... (Krüger-Genge et al. 2019). D'autres molécules exprimées sur les cellules endothéliales vont également avoir un effet anti-thrombine comme heparin-like molécules (Hep) associées à l'antithrombine III (ATIII), ou bien des facteurs inhibiteurs (tissue factor pathway inhibitor : TFPI) de protéines impliquées dans la coagulation comme tissue factor activation of the coagulation (TF VII, VIIIa). Enfin, la thrombomoduline (TM) elle aussi dégrade les facteurs Va et VIIIa via l'activation de la protéine C inhibant la coagulation (Fig26) (Neubauer et Zieger 2022).

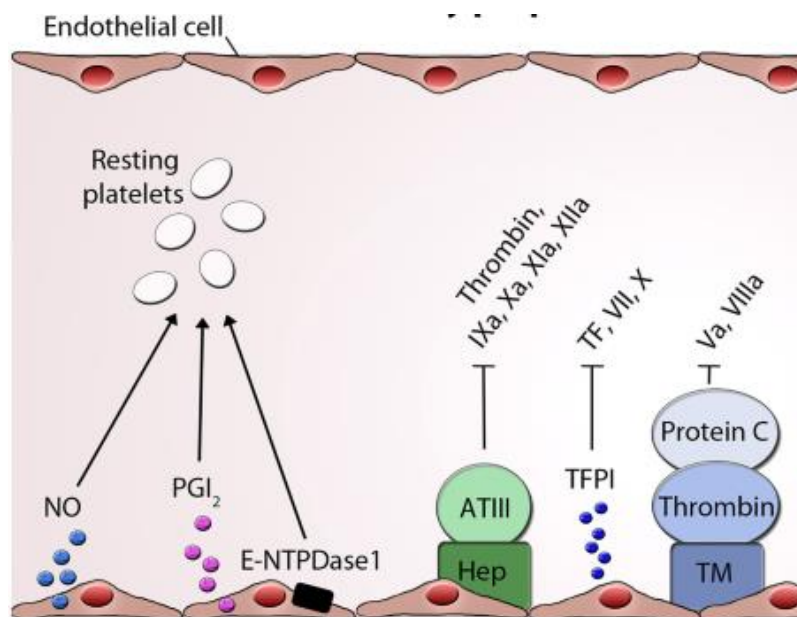


Figure 26 : Facteurs des cellules endothéliales inhibiteurs de la coagulation (Neubauer et Zieger 2022).

Dans le cas de l'inflammation, un déséquilibre entre les facteurs pro et anti-coagulants s'installe. La délétion de TM dans les cellules endothéliales induit une hyperperméabilité suite à la stimulation par un facteur de coagulation : la thrombine. Le dysfonctionnement de la barrière est associé à une augmentation

de la phosphorylation de la VE-cadhérine conduisant à une perte des jonctions d'adhérence, de l'adhésion des plaquettes, du processus inflammatoire via la sécrétion d'angiopoïétin-2 lié à la vasoconstriction et de l'adhésion des leucocytes (Giri et al. 2021).

La concentration de facteurs pro et anti-coagulant va dépendre du lit vasculaire dans lequel ils se trouvent. En effet, certains facteurs sont différemment exprimés: c'est le cas de la thrombomoduline qui est en forte concentration dans tous les vaisseaux des organes exceptés le cerveau. De manière surprenante, une diminution de la thrombomoduline augmente la déposition de fibrine dans le poumon, le cœur, la rate et le foie mais pas dans le cerveau ni le rein. L'effet de la modification de la concentration des facteurs pro et anti-coagulants est organo-dépendante (Aird 2007).

I.2.3.4. Le tonus vasculaire

I.2.3.4.A. La régulation de la vasomotricité

La monocouche de cellules endothéliales par sa localisation stratégique peut sentir, intégrer et traduire les signaux environnementaux (variations de la température, des molécules de type bradykinine, ATP, acétylcholine...) pour initier des modulations dynamiques sur l'activité contractile des cellules musculaires lisses (Fig27)(Krüger-Genge et al. 2019). L'un des facteurs est le flux sanguin qui peut être perçu par les mécano-senseurs des cellules endothéliales. Selon l'importance du flux, les frictions du sang circulant contre la paroi vont donner lieu à des forces de cisaillement plus ou moins intenses en fonction d'un flux laminaire ou d'un flux oscillant. Le premier va faciliter l'élongation des cellules endothéliales en direction du flux, en stimulant l'expression de gènes anti-inflammatoires, anti-thrombotiques et anti-proliférations afin de stabiliser la vasculature (Krüger-Genge et al. 2019). Tandis que le flux oscillant ou multi-directionnel va plutôt engendrer une réaction inflammatoire et perturber l'homéostasie. La VE-cadhérine, une protéine fortement impliquée dans les jonctions endothéliales, et le VEGFR2 ont été décrits comme faisant partie des mécano-senseurs du flux. Une étude a démontré que la perte de la VE-cadhérine réduisait le taux d'alignement des cellules sous un flux laminaire et plus particulièrement provoquait la perte de son domaine transmembranaire. Dans ce cas, le domaine transmembranaire de la VE-cadhérine joue le rôle d'un adaptateur pour faciliter l'activation de VEGFR2 et VEGFR3. VEGFR2 va alors induire la signalisation de PI3K qui promeut l'adhésion des intégrines et médie l'alignement des cellules endothéliales selon le flux laminaire. La stimulation de PI3K est également importante pour la

vasorelaxation via l'action de l'oxyde nitrique synthase (NOS) comme nous le verrons par la suite. VEGFR3 va également contribuer à l'alignement des cellules (Coon et al. 2015).

Vasodilatation et vasoconstriction sont régulées par le changement de concentration en calcium dans la partie cytoplasmique de la cellule endothéliale qui en retour active diverses voies de signalisations. Un exemple de canal à cations Transient receptor potential cation channel member 4 (TRPV4) qui induit la vasodilatation des vaisseaux par relargage de calcium issu du réticulum endoplasmique (Heathcote et al. 2019; Medina-Leyte et al. 2021).

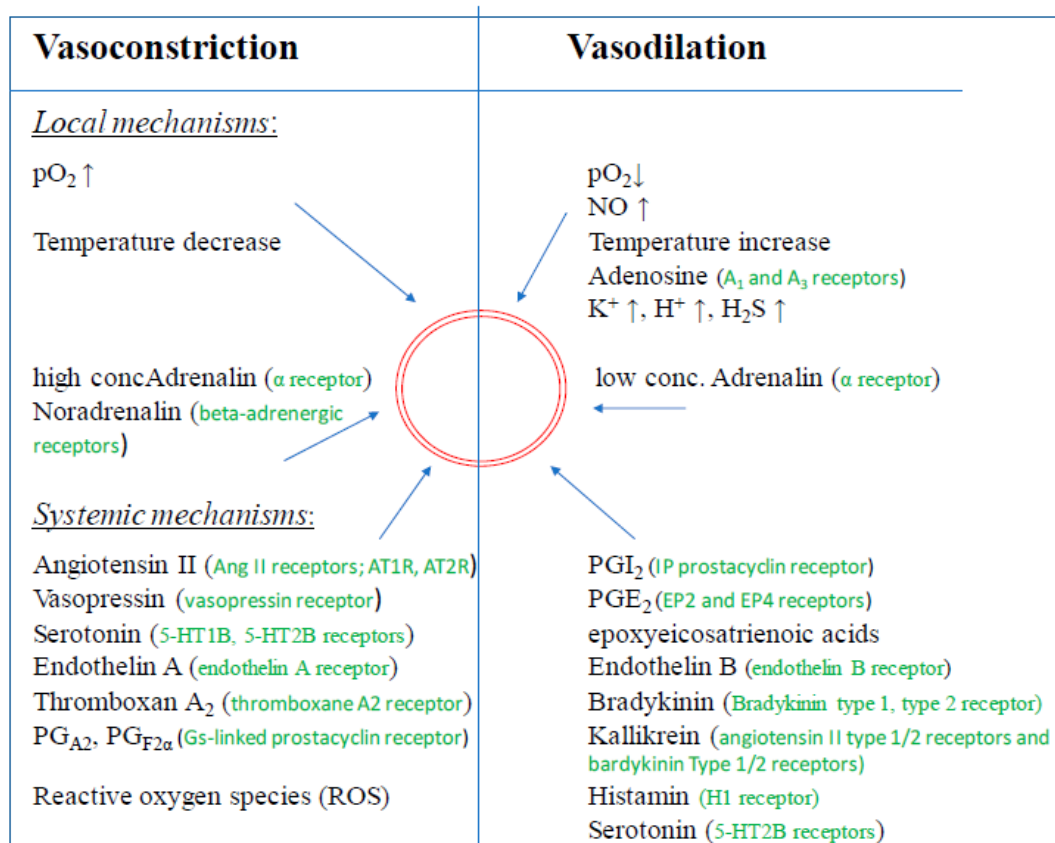


Figure 27: facteurs induisant la vasoconstriction ou la vasodilatation (Krüger-Genge et al. 2019)

1.2.3.4.A.1 La régulation de la vasodilatation

De nombreux facteurs activent des voies de signalisation qui vont mener à la vasodilatation des vaisseaux : endothéline B, bradykinine, histamine, sérotonine entre autres, ou bien à la suite d'une augmentation de la température. La vasodilatation peut se produire en réponse à une augmentation de la pression sanguine provoquant ainsi une augmentation des forces de cisaillement. Les cellules endothéliales synthétisent alors de nombreux facteurs de vasodilatation comme l'oxyde nitrique NO et des facteurs hyperpolarisants (Endothelium hyperpolarization factor ; EDHF) qui vont conduire à une relaxation des cellules musculaires lisses. EDHF, NO et PGI₂ ont la capacité d'hyperpolariser les cellules musculaires lisses afin d'induire la relaxation de ces cellules, mais NO et prostacycline PGI₂ peuvent l'induire sur une

courte période contrairement à EDHF (Féléto et Vanhoutte 2006 ; Sandoo et al. 2010). Nous nous intéresserons ici aux deux acteurs en lien avec la VE-cadhérine : oxyde nitrique (NO) et prostacycline.

Oxyde nitrique (NO) :

L'un des acteurs majeurs de la vasodilatation est le NO qui est relâché en réponse à une stimulation par les effecteurs suivants : angiotensine II, acétylcholine, histamine, ou également sous une augmentation du flux (Z. Xiao, Zhang et Diamond 1997). Stimulé par les cytokines comme GTP-cyclohydrolase, l'oxyde nitrique synthase NOS de type 2 et de type 3 exprimé par les cellules endothéliales, convertit la L-arginine en NO. Le relargage de NO affecte les cellules musculaires lisses et engendre une cascade de signalisation conduisant à une diminution de la phosphorylation des chaînes légères de myosines, de la tension des cellules et donc de la vasodilatation (Fig28) (Galley et Webster 2004b). Il assure également un tonus basal en condition physiologique où une inhibition de NOS augmente la pression sanguine (Krüger-Genge et al. 2019).

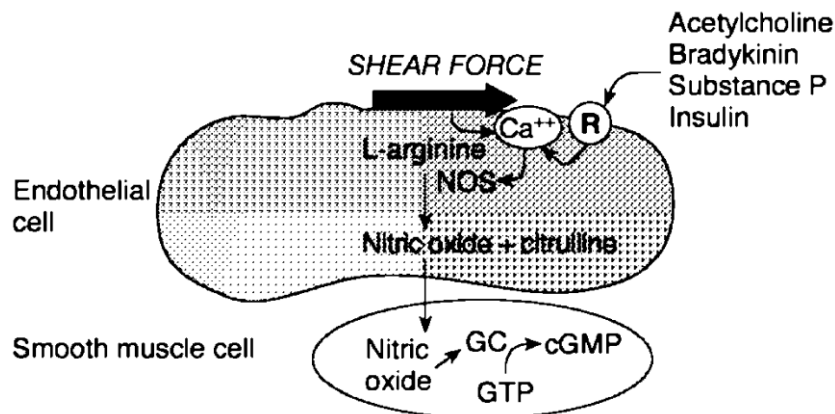


Figure 28: Formation de l'oxyde nitrique NO et régulation sur les cellules musculaires lisses (Galley et Webster 2004b)

- Prostacycline :

La prostacycline (PGI₂) est un autre acteur important de la vasorelaxation qui est, tout comme NO, actif dans les conditions physiologiques. La PGI₂ est synthétisée à partir de la conversion de l'acide arachidonique en prostaglandine H₂ sous l'action de l'enzyme cyclooxygénase. La prostaglandine H₂ est alors convertie en PGI₂ par la prostacycline synthase (Sandoo et al. 2010). La production de PGI₂ peut également être induite par TRPV4 tout comme TRPV4 peut aussi induire la production de NO et d'EDHF (Liangliang Liu et al. 2021). Dans une récente étude, il a été démontré que chez des souris atteintes de syndrome de détresse respiratoire (ARDS) l'agoniste de PGI₂ (Selexipag) induisait une diminution de la perméabilité associée à une augmentation de VE-cadhérine (H. Chen et al. 2022).

I.2.3.4.A.2. La régulation de la vasoconstriction

A l'inverse de la vasodilatation, la vasoconstriction va être stimulée par une diminution de la température et d'autres signaux tels que la sérotonine, l'adrénaline, ou encore la caféine (Krüger-Genge et al. 2019) Parmi les vasoconstricteurs de la cellule endothéliale, on peut citer l'angiotensine II, le thromboxane A2, l'endothéline 1, la PGE(2) et les espèces réactives de l'oxygène (ROS).

- **L'endothéline1 (ET-1) :**

L'endothéline-1 (ET-1) est un puissant vasoconstricteur qui agit via deux récepteurs, ETA et ETB. La liaison avec ETA sur les cellules musculaires lisses provoque une augmentation de la concentration du calcium résultant en la contraction des cellules musculaires lisses tandis que la liaison avec ETB sur les cellules endothéliales promeut la vasodilatation des cellules musculaires lisses par induction de la production de NO. ETB sur les cellules musculaires lisses peut également permettre la vasoconstriction mais le rôle principal de ETB reste la vasodilatation (Fig29)(Trow et Taichman 2009). En conditions physiologiques, le flux sanguin favorise les facteurs impliqués dans la vasodilatation par l'activation de NOS et ET-1 sera retrouvé faiblement exprimé dans les cellules endothéliales, tandis que dans un flux pathologique se produira une vasoconstriction par une augmentation de la sécrétion de ET-1 et une altération de VE-cadhérine (M. Li et al. 2009). La surexpression de ET-1 est associée à des pathologies comme les pneumonies virales et bactériennes, la malaria ou la maladie de Chagas, car elle favorise la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, la vasoconstriction, l'agrégation des plaquettes et l'adhésion des leucocytes (Freeman et al. 2014).

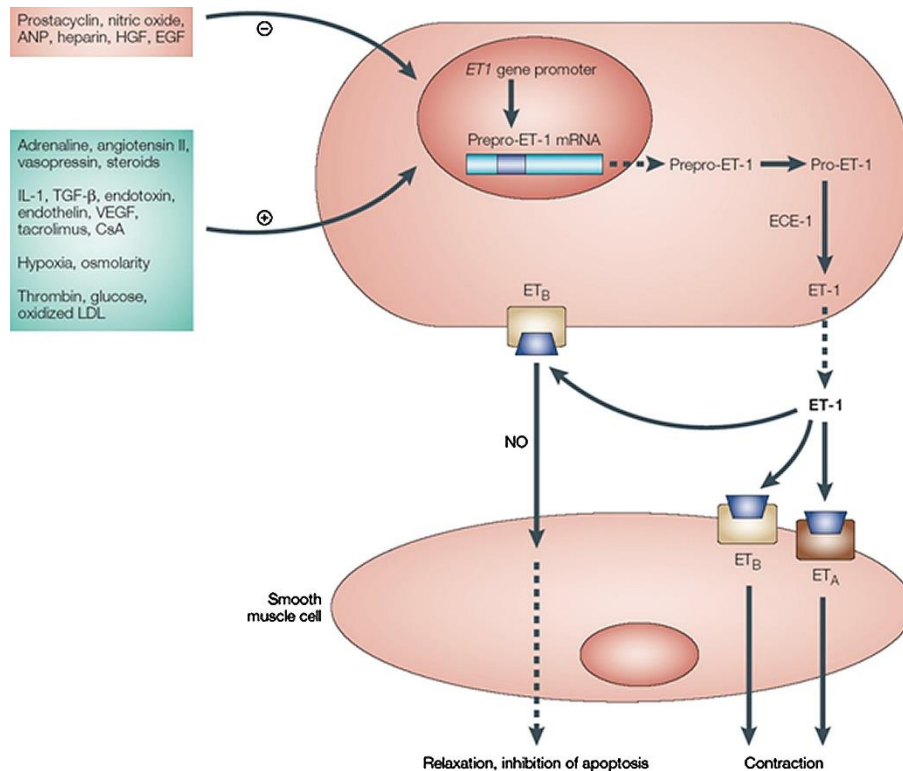


Figure 29 : Régulation de la vasoconstriction et la vasodilatation par l'endothéline-1. (Trow et al, 2009)

- **L'angiotensine II :**

L'angiotensine II joue un rôle fondamental dans le maintien de la pression artérielle via la volémie plasmatique et est également utilisée pour induire l'hypertension dans les études sur les animaux (J. Cao et al. 2011). L'angiotensine II agit sur ses cellules cibles par l'intermédiaire de récepteurs à sept domaines transmembranaires dont il existe deux types, AT1 et AT2. Une exposition chronique à l'angiotensine II se fixant à AT1 est responsable de nombreuses pathologies, de l'hypertension, l'athérosclérose, la maladie chronique du rein jusqu'à l'arrêt cardiaque. Elle conduit plus particulièrement à un dysfonctionnement des cellules endothéliales, à la formation de fibrose, l'apparition d'inflammation et de stress oxydatif alors que la fixation de l'angiotensine II sur AT2 aura un effet protecteur (Fig30)(Ni et al. 2020) (Vukelic et Griendling 2014). Dans le cas des cellules endothéliales, l'angiotensine II induit un remodelage vasculaire avec une augmentation de la perméabilité, une altération dans les jonctions par une diminution de l'expression de la zonula-occludens ZO-1 et de la VE-cadhérine (Longbin Liu et al. 2018).

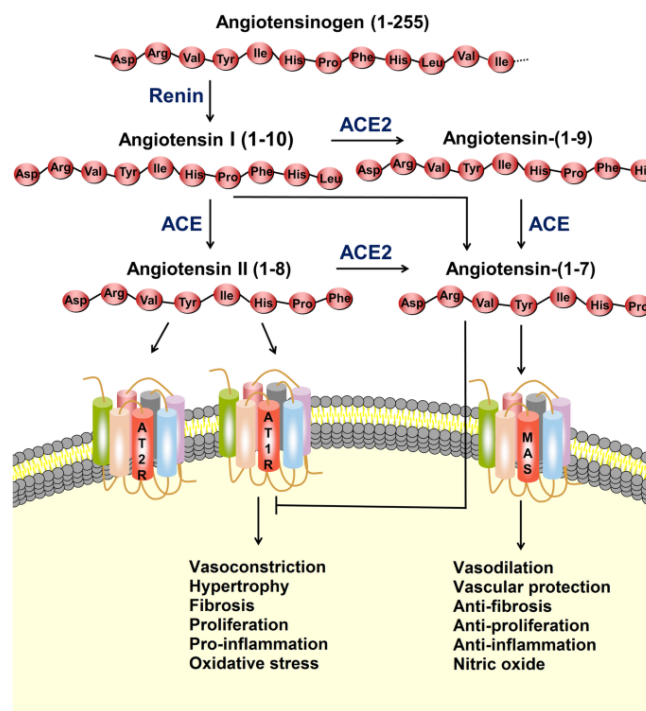


Figure 30: Le système rénine-angiotensine (Ni et al, 2020)

I.2.3.4.B. L'hétérogénéité du tonus vasculaire

L'hétérogénéité de l'endothélium peut s'expliquer par l'effet de l'environnement sur les cellules endothéliales. En effet, selon le lit vasculaire, elles sont exposées à des forces biomécaniques différentes entre les artères qui subissent une forte pression sanguine contrairement aux veinules. Elles n'ont pas la même exposition aux signaux environnementaux comme les cytokines, les facteurs de croissance et les hormones dépendant des cellules avoisinantes. Tous ces différents paramètres vont profondément impacter le phénotype et le fonctionnement de la cellule endothéliale. Par exemple, les capillaires du cœur sont exposés à des forces issues de la contraction du cœur et à des facteurs provenant des

cardiomyocytes alors que l'endothélium du foie va être modifié temporellement en fonction de la période pré ou postprandiale (Aird 2007).

Les cellules endothéliales font face à différentes forces selon leur lit vasculaire et les mécano-senseurs ne vont pas activer les mêmes cascades de signalisation. Les cellules exposées à une forte force de cisaillement induisent l'expression de gènes typiques des artères : éphrine B2 , neuropiline 1 et jonction gap alpha 5, contrairement aux faibles forces de cisaillement stress qui induisent une faible expression de prospero homeobox 1 (PROX1) (C.-Y. Chen et al. 2012) (Buschmann et al. 2010). Durant le développement, le flux va également contribuer fortement à la différenciation des cellules endothéliales et à leur remodelage en artères (Buschmann et al. 2010). La différence du flux allant du pulsatile des artères au flux constant des veines impacte grandement l'expression des gènes endothéliaux. Par exemple, un flux perturbé engendre l'activation de facteur des transcriptions comme forkhead box protein 2 (FOXC2) pour initier la morphogenèse de valve (Sabine et al. 2015).

I.2.4. Le programme transcriptionnel des cellules endothéliales

La programmation génétique est cruciale pour la différenciation des progéniteurs en cellules endothéliales mais également pour la spécialisation des cellules endothéliales selon leur localisation (Potente et Mäkinen 2017). De nombreux facteurs de transcription vont accomplir cette fonction. Par exemple SOX17 va induire la spécialisation des cellules endothéliales dans les artères. Sa délétion entraîne une perte de la formation des artères (Corada et al. 2013) tandis que le nuclear receptor subfamily 2 group F member 2 (NR2F2) est lui exprimé dans les veines. De plus, le Dr Raffi et son équipe ont démontré que les cellules endothéliales expriment un nombre de facteurs de transcription bien défini qui est propre à chaque organe. Il a notamment mis en évidence le rôle de la famille de facteur de transcription ETS comme régulateur de la diversité des cellules endothéliales dans les différents lits vasculaires. Par exemple, l'expression du facteur SFPI1 est retrouvée plus largement augmentée dans la moelle épinière et le foie que dans les autres organes (Nolan et al. 2013).

Depuis de nombreuses équipes ont voulu décrypter l'hétérogénéité des cellules endothéliales et leur signature transcriptomique spécifique à chaque organe (Jambusaria et al. 2020). Par exemple les cellules endothéliales de poumon exprimaient largement c-type lectin domain containing 7a (Clec7a), mucin 1 (Muc1), resistin like alpha (Retnla) tandis que le cerveau exprimait alpha two polypeptide (Atp1a2), basigin (Bsg), apolipoprotein e (Apoe). Par conséquent, les RNA-seq ont permis d'identifier l'expression de gènes unique à chaque organe, (ici le poumon, le cerveau et le cœur) et ainsi de déterminer des voies de signalisation, des transporteurs et des marqueurs de surface de cellules spécifique à chaque organe étudié. Tout cette étude conduit à suggérer que même les fonctions des cellules endothéliales dépendent de leur localisation et vont activer un certain nombre de gènes. Par exemple la fonction angiocrine des cellules endothéliales du poumon et celles du foie n'aura pas la même combinaison de gènes activées (Nolan et al. 2013).

Cette plasticité des cellules endothéliales se retrouve au sein même d'un organe où par exemple l'expression des gènes est complètement différente selon leur localisation dans le cerveau (Bryant et al. 2023) et le poumon. En effet, les séquençages des ARN de cellules uniques (scRNA-seq) ont permis de mettre en évidence l'hétérogénéité des cellules endothéliales pulmonaires et de mieux caractériser leur signature génétique et leur différentes fonctions en réponse à des pathologies comme l'hypertension

artérielle pulmonaire (Rodor et al. 2022) (L. He et al. 2018). Il a été ainsi suggéré que les capillaires alvéolaires formaient en réalité une mosaïque composée de deux populations. Les aérocytes sont particulièrement spécialisés dans l'échange gazeux et la transmigration des leucocytes. Ils sont uniques aux poumons, sont plutôt larges avec des extensions ramifiées entourées de pores leur donnant un aspect de fromage Suisse. La seconde population quant à elle, est représentée par les cellules endothéliales de capillaires dits généraux qui sont plus spécialisés dans le tonus vasculaire et seront impliqués dans le remodelage en cas de blessure de par leur capacité à proliférer. Elles sont plus petites avec peu de pores (Gillich et al. 2020). Dans le cas de l'hypertension artérielle par exemple, les auteurs ont suggéré qu'une sous-population de cellules endothéliales des capillaires expriment des facteurs pro-angiogéniques et une autre assurerait plutôt dans la fonction de réponse du système immunitaire (Rodor et al. 2022). Une autre étude s'est notamment intéressée à l'hétérogénéité endothéliale en réponse à une blessure aigüe du poumon. Les auteurs ont identifié différentes populations cellulaires: des cellules macrovasculaires comme composant les veines et les artères, des cellules microvasculaires pour les capillaires et une troisième catégorie qui est appelée « Car4-high » retrouvée en périphérie du poumon à l'état physiologique. Ces cellules expriment fortement comme son nom l'indique carbonic anhydrase 4 (Car4), une enzyme membranaire jouant un rôle dans le transport de dioxyde de carbone. Dans le cas pathologique, cette population de cellules est spécifiquement retrouvée dans les régions de régénération entourant la blessure (Niethamer et al. 2020). Toutes ces données sont un nouveau point de vue sur l'hétérogénéité des cellules endothéliales et leur rôle à chacune en réponse à des pathologies.

Par conséquent, chaque cellule endothéliale a une signature génétique propre en condition physiologique et que cette diversité était maintenue en condition inflammatoire comme nous avons pu le voir. Tout comme l'étude de Jambusaria a mis en évidence la réponse distincte des cellules endothéliales selon les organes en réponse à des stimuli inflammatoires où à nouveau on voit différents sets de gènes activés en fonction des organes (Jambusaria et al. 2020).

CHAPITRE II :

Les jonctions endothéliales

Les jonctions intercellulaires régulent l'adhésion et la communication entre les cellules endothéliales et les cellules avoisinantes ainsi que la perméabilité et la diapédèse des leucocytes. Plusieurs molécules caractérisent les jonctions d'adhérence, les jonctions serrées et les jonctions gaps (Fig31)(Medina-Leyte et al. 2021). La composition et l'expression des jonctions endothéliales sont dépendantes des organes selon l'importance de la perméabilité dans la fonction physiologique de l'organe. C'est le cas par exemple du cerveau où les jonctions serrées sont très développées car le contrôle de la perméabilité entre le sang et le système nerveux est essentiel et celles-ci vont éviter le passage de molécules indésirables (Redzic 2011). Au sein même d'un vaisseau, des modifications de composition sont visibles. Dans le cas de l'endothélium artériel qui ne tolère pas une grande perméabilité, il se trouve pourvu d'un réseau développé de jonctions serrées contrairement aux capillaires post-veinules dont la fonction la plus spécifique est l'extravasation des protéines du plasma et des leucocytes (Bazzoni et Dejana 2004).

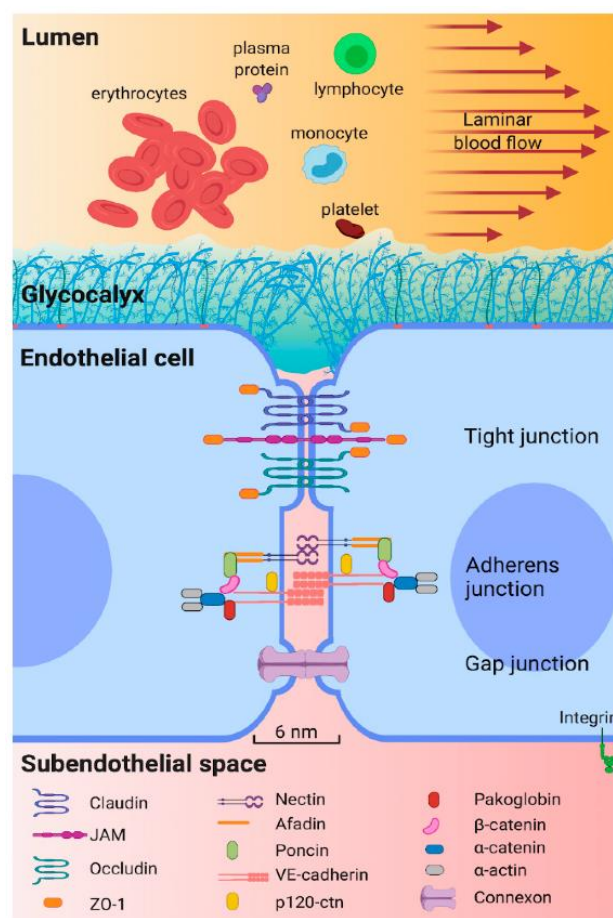


Figure 31: Les différents types de jonctions inter- endothéliales : les jonctions serrées, les jonctions d'adhérence et les jonctions gaps (Medina-Leyte et al. 2021).

II.1. Les jonctions gap

Les jonctions gap sont constituées de canaux transmembranaires inter-cellulaires, les connexines, qui permettent la diffusion de manière passive des ions et des molécules de petite taille (<1 kDa). Les connexines sous forme d'hexamères forment un héli-canal, le connexon, qui se trouve dans la membrane et s'associe à un autre héli-canal de la cellule adjacente (Fig32) (Okamoto et Suzuki 2017).

Par ce type de jonctions, les cellules endothéliales peuvent ainsi communiquer avec les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses, les leucocytes et les plaquettes.

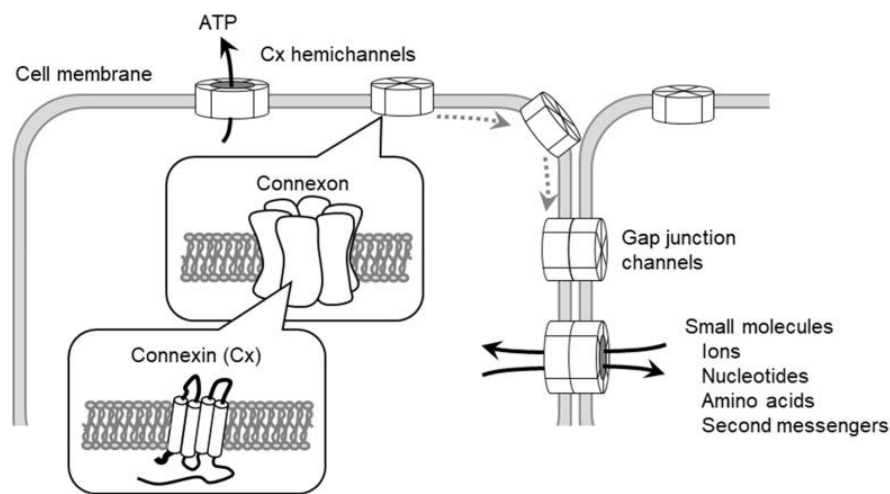


Figure 32: Les connexines des jonctions gaps (Okamoto et Suzuki 2017)

L'altération de cette jonction participe à la progression de pathologies comme l'hypertension et l'athérosclérose. En effet, les cytokines pro-inflammatoires réduisent l'expression des connexines 37 et 40 mais pas de 43 étonnamment. De plus, la délétion de la connexine 40 favorise le développement de l'athérosclérose en amplifiant l'adhésion des monocytes et leur transmigration (Chadjichristos et al. 2010). L'absence d'expression de connexine 37 chez les souris convertit le phénotype des artères vers un phénotype inflammatoire conduisant au développement des plaques de l'athérosclérose (Derouette et al. 2009). Enfin, les jonctions gap peuvent moduler le tonus vasculaire via la régulation de l'oxyde nitrique. En effet des souris déficientes en connexine 40 représentent un modèle pour étudier les altérations dans la vasorelaxation médié par l'oxyde nitrique (Alonso et al. 2010).

II.2. Les jonctions serrées

Les jonctions serrées sont des jonctions inter-cellulaires qui ont pour objectif de réguler la perméabilité paracellulaire et maintenir la polarité de la cellule (Bazzoni et Dejana 2004). Elles régulent le transport d'ions, de solutés, et bloquent la pénétration de grosses molécules. Elles comprennent des protéines homophiliques d'adhésion cellule-cellule : claudines, occludines, molécules d'adhésion des jonctions (junctional adhesion molecule (JAM)) et protéines de signalisation (Cerutti et Ridley 2017). Les jonctions serrées interagissent avec des protéines adaptatrices comme zonula occludens (ZO) et ont une action sur le cytosquelette d'actine (Bazzoni et Dejana 2004) (Fig33 et 34). Nous allons maintenant voir les différents constituants des jonctions serrées.

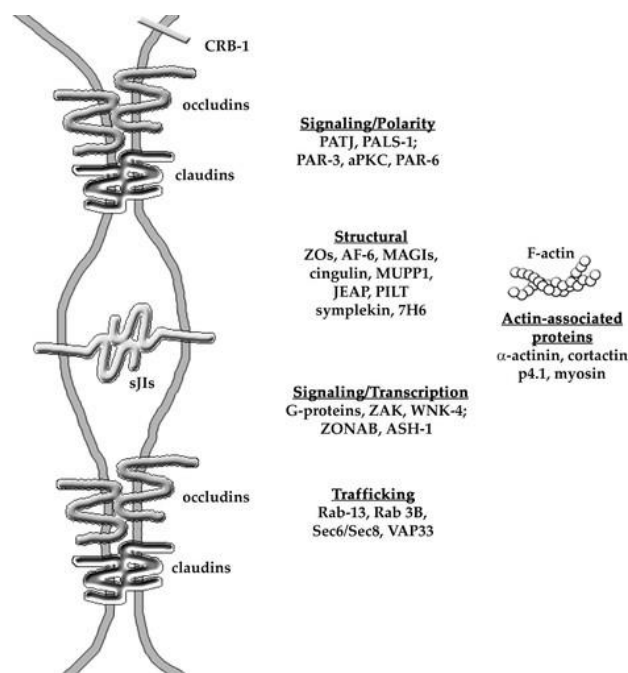


Figure 33: Représentation des jonctions serrées (Bazzoni et Dejana 2004).

- **L'occludine :**

L'occludine est la protéine majeure de ce type de jonctions. Cette protéine présente dans sa structure deux boucles extracellulaires et 4 domaines transmembranaires. Elle est un composant clé dans la régulation de la perméabilité, notamment via la régulation de l'assemblage de l'actine au niveau cytoplasmique (Kuwabara et al. 2001). La perméabilité dans un organe donné peut en être modifiée car il a été constaté que la présence d'un taux élevé d'occludine par exemple dans le cerveau, est corrélé à une distribution continue chez les cellules endothéliales (Hirase et al. 1997). Les extrémités N-ter et C-ter de l'occludine sont présentes dans le cytoplasme (Furuse et al. 1993). La partie N-ter est impliquée dans sa fonction d'adhésion tandis que la partie C-ter est sujette au phosphorylation sur tyrosine et sur sérine et est impliquée dans la perméabilité (Rahimi 2017).

- **La famille des JAM :**

Les protéines membranaires JAM sont importantes dans la régulation de l'adhésion intercellulaire et l'intégrité de la barrière. Elles sont composées de 3 membres JAM (A, B,C), ESAM et de coxsackie and adenovirus receptor (CAR)(Cerutti et Ridley 2017). Leur rôle est de contrôler l'interaction cellule-cellule mais aussi la migration trans-endothéliale des leucocytes (TER). Elles apportent notamment une aide aux protéines des jonctions serrées dans le contrôle de la perméabilité (Luissint, Nusrat, et Parkos 2014).

Les protéines JAM sont des glycoprotéines appartenant à la famille des « Immunoglobulin-like domains » et sont composées d'une région extracellulaire, d'une transmembranaire et d'une petite région intracellulaire. La partie cytoplasmique des JAM possède un domaine post synaptic density protein (PSD95), Drosophila disc large tumor suppressor (DlgA), and zonula occludens-1 protein (ZO)domain (PDZ) qui recrute ZO ou afadine et connecte les JAM au cytosquelette d'actine (Rahimi 2017). JAM-A est exprimé dans les cellules endothéliales et épithéliales de nombreux organes comme le cerveau, le rein, le cœur, le pancréas et le foie. JAM-A est également retrouvé dans les cellules circulantes comme les plaquettes, les monocytes, les lymphocytes et les neutrophiles tandis que JAM-B et JAM-C sont exprimés par les cellules endothéliales et principalement dans les veinules et les vaisseaux lymphatiques. (Weber, Fraemohs, et Dejana 2007).

- JAM-A est un facteur important dans la régulation de la migration des cellules endothéliales et des cellules immunitaires jusqu'à l'organisation des jonctions et du cytosquelette. Une perte de JAM-A amène la désorganisation de ZO et de la claudine-5 et in fine celle des jonctions et du cytosquelette en faveur de la formation de fibres de stress (Tornavaca et al. 2015). De plus, la suppression de l'expression de JAM-A a été suggérée comme facteur favorisant la migration cellulaire et la néovascularisation (Ku et al. 2017). Des études ont montré l'implication des protéines JAM dans la migration des cellules du système immunitaire notamment via la délétion de JAM-A ou JAM-C bloquant la filtration des monocytes (Martin-Padura et al. 1998) (Johnson-Léger et al. 2002). Plus récemment, JAM-C a été trouvé lié à l'angiogenèse pathologique. En effet, l'inhibition de JAM-C par un anticorps neutralisant a montré la possibilité de la néovascularisation dans la rétine de souris soumises à l'hypoxie. Ces résultats ont été confirmés dans la vascularisation tumorale (Weber, Fraemohs et Dejana 2007). En ce qui concerne JAM-B, cette protéine est notamment reconnue pour être responsable de l'adhésion des leucocytes et leur extravasation (Ludwig et al. 2009).
- Endothelial cell selective adhesion molecule (ESAM) : cette protéine est exprimée uniquement dans les cellules endothéliales, les plaquettes et les mégacaryocytes. De manière étonnante, un dysfonctionnement de ESAM n'induit pas de défaut dans l'angiogenèse au cours du développement, mais chez les adultes elle induit une diminution de la néovascularisation et de l'angiogenèse tumorale (Duong et Vestweber 2020). ESAM est essentielle pour l'intégrité de la barrière car son invalidation génique conduit à une perméabilité dans le poumon qui n'a pourtant pas été observée dans d'autres organes. Cet effet est d'autant plus exacerbé par l'absence de la Vascular Endothelial cadhérine (VE-cadhérine) (Duong et al. 2020) (Duong et Vestweber 2020).
- CAR (coxsackie and adenovirus receptor): Cette protéine réduit le passage des macromolécules, des ions, inhibe la formation des jonctions serrées et favorise l'entrée des virus (Cohen et al. 2001). CAR a la possibilité d'agir comme un modulateur de la mécanotransduction des stress liés au flux. L'étude de Chung a suggéré que l'expression de CAR était augmentée sous un flux

perturbé et que sa délétion permettait au contraire d'inverser les effets néfastes du flux en limitant l'expression de gènes pro- inflammatoires et également la phosphorylation de Platelet endothelial cell adhesion molecule (PECAM-1) qui joue pourtant un rôle crucial dans la réponse au stress lié au flux (Chung et al. 2019).

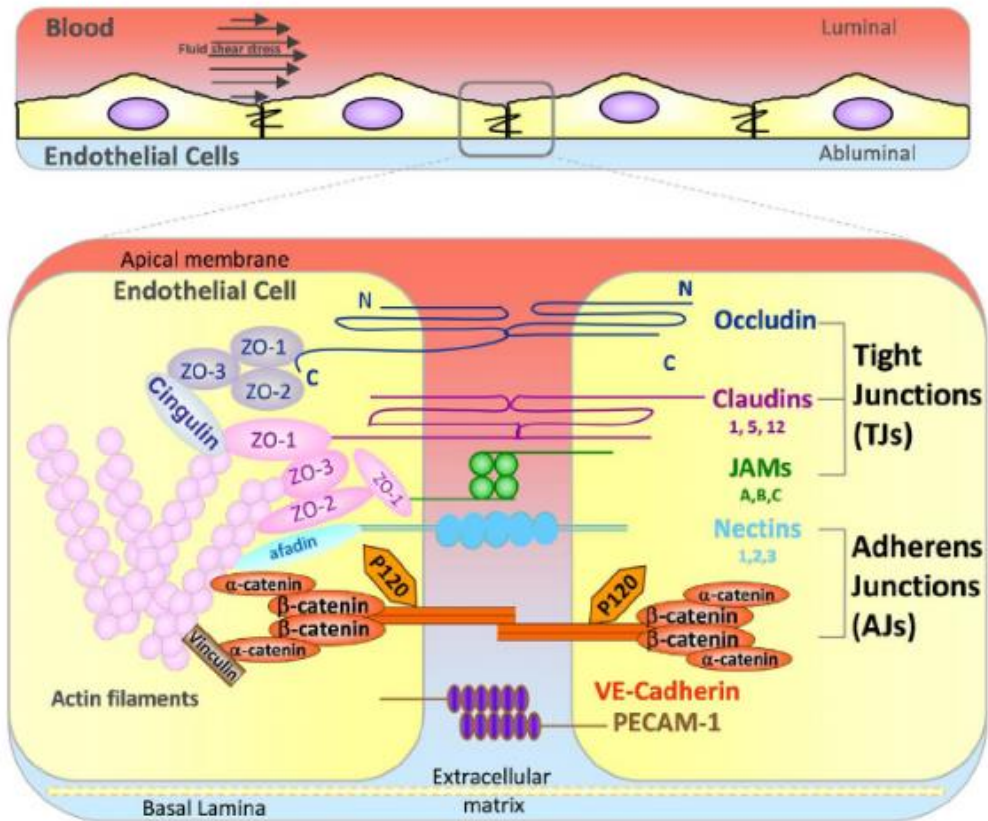


Figure 34: Schéma des jonctions endothéliales serrées et des jonctions d'adhérence (Bazzoni et Dejana 2004)

II.3. Les jonctions d'adhérence

Les jonctions d'adhérence contribuent à maintenir les cellules entre elles (Fig34) par les molécules d'adhésion qui les composent, et parmi elles, les cadhérines et le complexe nectine-afadine. Il est très intéressant de remarquer que les jonctions d'adhérence régulent l'expression des protéines impliquées dans les jonctions serrées et leur organisation. Taddei et al ont notamment démontré que les jonctions d'adhérence se formaient au cours du développement avant les jonctions serrées, et que la régulation de l'expression de la claudine 5 se faisait par la protéine d'adhésion VE-cadhérine (Taddei et al. 2008)

- Le complexe nectine-afadine :

La nectine est une molécule d'adhésion de type immunoglobuline homophile indépendante de calcium Ca^{2+} , et l'afadine est une protéine de liaison aux filaments d'actine qui relie la région cytoplasmique de la nectine au cytosquelette d'actine. La trans-interaction de la nectine et l'interaction de la nectine avec l'afadine sont nécessaires à leur colocalisation avec les AJS. Ils peuvent aussi bien interagir avec ZO1 qu'avec JAM des jonctions serrées (Fukuhara et al. 2002). Il a également été démontré par le knockdown

de la protéine nommée drébine que cela engendrait un effet délétère sur la liaison entre les cellules endothéliales dû à la déstabilisation de la nectine, d'où son importance dans l'intégrité de la cellule endothéliale (Rehm et Linder 2017).

- Les cadhérines de l'endothélium vasculaire :

Elles sont localisées dans tout le système vasculaire et lymphatique. Ce sont des protéines transmembranaires qui sont capables de s'organiser en multimères afin de créer des interactions homophiliques intercellulaires (Bazzoni et Dejana 2004) (Angst, Marcozzi, et Magee 2001). Parmi ces cadhérines on retrouve Vascular endothelial cadherin (VE-cadhérine) qui est exprimée au sein des cellules endothéliales, bien que d'autres cadhérines soient aussi exprimées, comme la N-cadhérine – ou cadhérine neurale et la T-cadhérine. La N-cadhérine est très exprimée dans les cellules endothéliales mais sa localisation n'est pas strictement limitée aux jonctions d'adhérence. En effet, elle est répartie sur l'ensemble de la membrane (Bazzoni et Dejana 2004) (Navarro, Ruco et Dejana 1998). Son rôle est plutôt axé sur l'interaction des cellules endothéliales et des cellules avoisinantes comme les péricytes, les astrocytes et les cellules musculaires lisses (Navarro, Ruco et Dejana 1998). La N-cadhérine aurait également un rôle dans l'angiogenèse en activant un facteur de migration des cellules endothéliales : fibroblast growth factor (FGF) (Derycke et al. 2006). Le rôle de VE-cadhérine sera amplement détaillé dans le chapitre suivant.

Chapitre III :

La VE-cadhérine et ses fonctions

III.1. Structure de la VE-cadhérine.

La VE-cadhérine est un marqueur spécifique des cellules endothéliales dont le rôle dans l'angiogenèse a été démontré par son invalidation génique, laquelle a montré que les embryons déficients mouraient par défaut d'angiogenèse (Gory-Fauré et al. 1999). Par ailleurs l'utilisation in vivo d'anticorps bloquants a permis de cibler avec succès l'angiogenèse tumorale. D'autres travaux ont également pu montrer son rôle majeur dans le contrôle de la perméabilité et de l'extravasation des leucocytes (Vestweber 2008) (Arif et al. 2021a). La structure de cette protéine a été décrite par analyse cristallographique montrant la capacité à former des dimères (Angst, Marcozzi et Magee 2001 ; Brasch et al. 2011) (Fig35).

Elle est composée d'une partie extracellulaire qui va servir à l'interaction avec d'autres VE-cadhérines et assurer une fonction de stabilisation des jonctions entre deux cellules endothéliales. Cette partie est divisée en 5 ectodomains qui forment une structure en forme de tige maintenue grâce au calcium. L'ectodomaine 1 contient un site de reconnaissance pour l'adhésion cellulaire (CAR) primordial pour l'établissement des jonctions. Le domaine intracellulaire interagit avec de nombreuses molécules dont les caténines : alpha-caténine (α -caténine), beta-caténine (β -caténine) et gamma caténine (plakoglobine), p120-catenin (p120), et quelques partenaires de la signalisation cellulaire telle que la Vascular endothelial phosphatase (VE-PTP) (Fig35) (Vincent et al. 2004) (Gavard 2014).

La phosphorylation sur tyrosine de résidus de son domaine cytoplasmique sont importants car ce sont des interactants particulier avec p120 et β -caténine (tyrosine 658 et 731). P120 forme un complexe avec plakoglobine- α -caténine tandis que β -caténine se lie à α -caténine. Ces interactions conduisent à l'association de la vimentine et de l'actine qui sont cruciales pour le maintien de la jonction endothéliale (Fig35)(Nan et al. 2023) (Vincent et al. 2004). La VE-cadhérine est localisée au niveau des jonctions lorsqu'elle est dans un état déphosphorylé sous l'action des VE-PTP.(Nan et al. 2023) En condition d'angiogenèse pathologique, la cellule endothéliale acquiert à nouveau un caractère de migration lié à la phosphorylation des sites Y658 et Y731 induisant la délocalisation des protéines partenaires p120 et β -caténine.(Potter, Barbero, et Cheresch 2005) respectivement. Nous verrons par la suite que ces protéines vont jouer un rôle primordial dans la régulation de la VE-cadhérine et dans le fonctionnement des cellules endothéliales.

VE-cadhérine

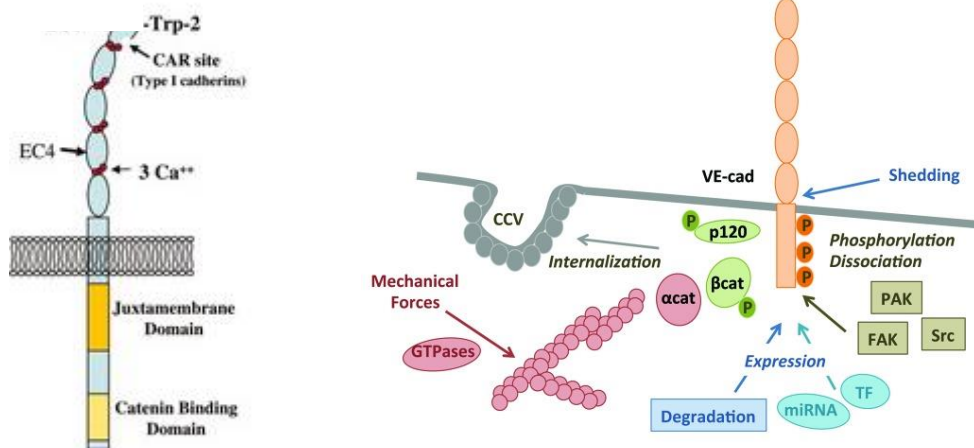


Figure 35 : Représentation de la structure de la VE-cadhérine et de ses partenaires (Vincent et al 2004) (Gavard 2014)

III.2. Les partenaires de la VE-cadhérine

La régulation de la VE-cadhérine est assurée par plusieurs partenaires dont la liste non exhaustive met en évidence la complexité des jonctions adhérentes. Nous en détaillerons les plus importants impliqués dans la relation structure-fonction de la VE-cadhérine ;

- **La β -caténine :**

La β -caténine est une protéine d'environ 90 kDa faisant partie de la famille Armadillo caractérisée par la présence d'un motif de 42 acides aminés répétés, connue pour interagir avec un grand nombre de protéines comme les facteurs régulateurs, des facteurs épigénétiques et de transcription. Quand elle n'est plus en interaction avec la cadhérine, lorsque la VE-cadhérine est phosphorylée sur la tyrosine Y731, elle se délocalise dans le noyau pour réguler un grand nombre de gènes grâce à son association avec T cell factor/lymphoid enhancer factor family (LEF/TCF). Une perte ou une surexpression de cette protéine est largement associée à de nombreuses pathologies comme le cancer colorectal, gastrique, du poumon, utérin, de la prostate, ainsi que la fibrose pulmonaire (Katoh 2018). La β -caténine est également connue pour faire le lien entre le carboxy-terminal catenin binding domain (CBD) de la partie cytoplasmique de la VE-cadhérine et l' α -caténine permettant de coordonner le remodelage de l'actine et favoriser l'adhésion cellulaire (Kobielak et Fuchs 2004). La déplétion en β -caténine affaiblit la stabilisation des jonctions ainsi que le maintien de la VE-cadhérine à la membrane dans les cellules HUVECs (Noda et al. 2010). Le complexe β -caténine/VE-cadhérine participe à l'inhibition de contact de la voie de VEGF. En effet les cellules endothéliales confluentes exprimant fortement la VE-cadhérine aux jonctions sont insensibles à la stimulation par VEGF et ne prolifèrent plus. L'expression de la VE-cadhérine dépourvue de β -caténine ne peut plus inactiver VEGFR2, donc la prolifération est exacerbée (Lampugnani et al. 2003).

- **P120 :**

P120 est un autre partenaire de la VE-cadhérine qui se lie au niveau juxtamembranaire, plus particulièrement sur le site Y658 lorsqu'il est déphosphorylé, et dont la fonction est de contrôler le

cytosquelette d'actine par la régulation de l'activité de la famille Rho GTPases (Reynolds 2007). La délétion de P120 par siRNA résulte en une perte de la VE-cadhérine à la membrane, une rupture des fibres de stress (Noda et al. 2010) et son internalisation. L'interaction p120-VE-cadhérine empêche son endocytose et contribue à la stabilisation de la VE-cadhérine à la membrane (K. Xiao et al. 2005). P120 tout comme la β -caténine contribue à l'intégrité de l'endothélium, en réduisant la perméabilité et en induisant le recrutement de la plakoglobine à VE-cadhérine (Herron et al. 2011).

- **Plakoglobine :**

Plakoglobine fait partie de la famille Armadillo qui fait le lien entre l' α -caténine et la partie cytoplasmique de la VE-cadhérine et le cytosquelette d'actine. La plakoglobine se lie à une région distale de la partie cytoplasmique au niveau de CBD tout comme β -caténine. Plakoglobine et β -caténine sont considérées structurellement homologues (Vincent et al. 2004). Elle est requise pour le maintien des jonctions via son association avec la VE-cadhérine et VE-PTP (Nottebaum et al. 2008). L'inhibition de VE-PTP favorise la dissociation du complexe VE-cadhérine-plakoglobine. L'induction de la phosphorylation de plakoglobine et non de la β -caténine conduit à une diminution du contact intercellulaire et amplifie l'extravasation des leucocytes (Nottebaum et al. 2008).

- **Alpha caténine, partenaire dans la réorganisation du cytosquelette d'actine**

La VE-cadhérine étant liée à la β -caténine et la plakoglobine qui interagissent avec l' α -caténine, cela permet la régulation de la motilité et de la forme de la cellule via son interaction avec le cytosquelette d'actine. Il a longtemps été considéré que l' α -caténine se liait simultanément à la VE-cadhérine et au cytosquelette d'actine mais de nombreuses études ont critiqué ce postulat. Dans sa forme monomérique, l' α -caténine ne peut se lier à l'actine mais va se lier à la β -caténine contrairement à sa forme dimérique (Yamada et al. 2005). Plusieurs recherches ont émis l'idée que l'alpha-caténine se lie au complexe VE-cadhérine/caténine via des protéines d'interaction comme epithelial protein lost in neoplasm (EPLIN) (Chervin-Pétinot et al. 2012) (Nieset et al. 1997) et la vinculine (Weiss et al. 1998).

- **Kinases:**

Certaines protéine kinases, en particulier tyrosine kinases sont importantes pour la régulation de la stabilité de l'endothélium vasculaire.

Src proto-oncogene, non récepteur tyrosine kinase

Src fait partie de la famille des protéine-tyrosine kinases (PTKSrc) découvertes initialement dans des tumeurs. Les protéines SRC sont des tyrosine kinases ancrées dans le feuillet interne de la membrane plasmique par une ancre myristoylée. Ces kinases de 52-62 kDa sont composées de 8 domaines bien distincts (Fig36). En partant de la partie N-ter, on retrouve le site myristoylé, le domaine Src homologie (SH4), un domaine unique, puis les domaines SH3, SH2, le domaine établissant le lien, le domaine catalytique (SH1) et le domaine de régulation. La région unique est spécifique pour les différentes PTKSrcs et régule l'interaction entre les Src et les autres protéines. Les domaines SH3 et SH2 sont des partenaires d'interaction avec des protéines impliquées dans la signalisation cellulaire. Le domaine SH2 est un interactant pour les résidus phosphorylés sur tyrosine. Le domaine kinase SH1 sera actif lorsque l'enzyme sera sous forme active car dépliée dans sa conformation par la phosphorylation des deux sites : Y416 localisé dans le domaine SH1 et Y527 dans le domaine de régulation (Hu, Place et Minshall 2008).

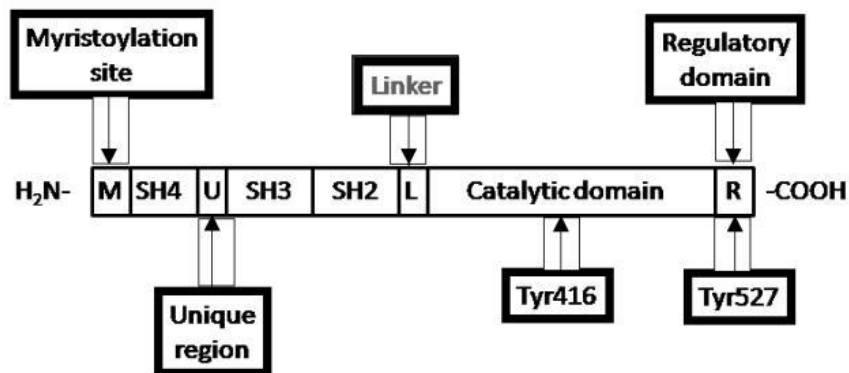


Figure 36: Structure de Src (Hu, Place, et Minshall 2008)

En effet, l'état inactif de Src est maintenu grâce à la phosphorylation de Y527 dans une conformation fermée par des interactions inhibitrices entre le domaine SH3 et SH2. La déphosphorylation de Y527 par protéine tyrosine phosphatase 1B (PTP1B), protéine-tyrosine phosphatase (Shp1/2) ou la liaison d'une protéine externe au domaine SH2 ou SH3, résulte en l'ouverture de la kinase et l'activation de Src. Cette configuration conduit à l'autophosphorylation de Y416 qui est primordiale pour atteindre l'activité maximale de Src. La configuration fermée ou ouverte est contrôlée par C-terminal Src kinase (Csk) qui phosphoryle Y527 (Fig37) (Ortiz et al. 2021).

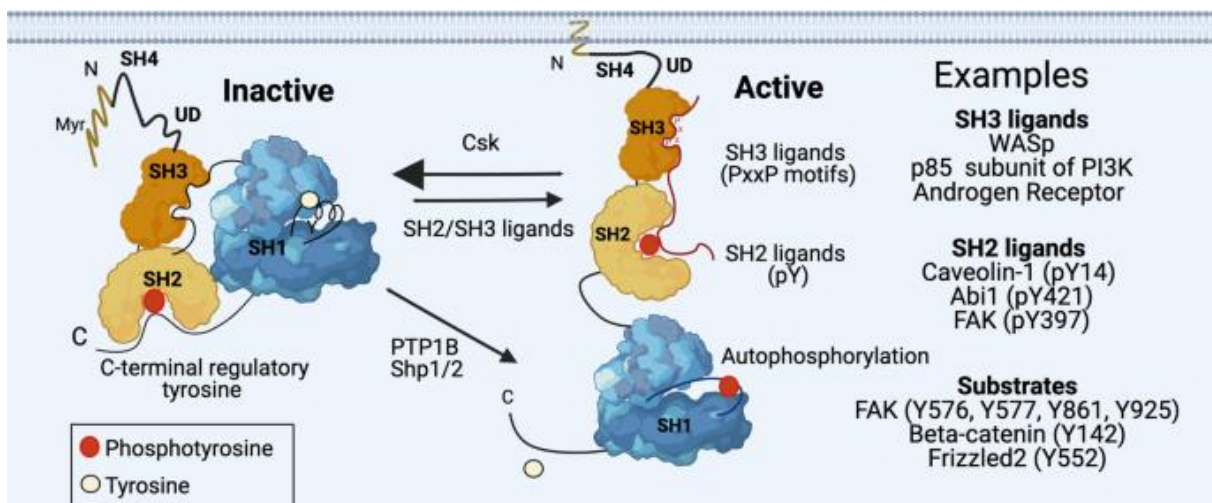


Figure 37: Changement de configuration et d'activité de Src (Ortiz et al. 2021)

Src joue un rôle important dans l'angiogenèse, la migration cellulaire et la perméabilité. Le blocage de Src stabilise la barrière endothéliale et supprime l'extravasation des cellules tumorales *in vivo* (Weis et al. 2004). En réponse à VEGF, la phosphorylation de VEGFR2 sur Y949 recrute T-cell specific adaptor (Tsad) et active Src (Gordon et al. 2016 ; Sun et al. 2012). Src a la capacité de se fixer à la VE-cadhérine par son domaine C-terminal kinase SH2 et d'induire la phosphorylation sur le site Y685 (Wallez et al. 2007). L'inhibition de Src empêche la migration cellulaire et l'induction de la perméabilité par l'absence de la phosphorylation sur Y685 de la VE-cadhérine sous stimulation par VEGF. Il est important de noter que Src a été retrouvée associée à la VE-cadhérine dans les tissus angiogéniques mais également dans les tissus quiescents (Lambeng et al. 2005). De plus, il a été suggéré que Src pouvait également phosphoryler Y658 et Y731 car un knockdown de Src conduisait à une baisse de la phosphorylation de ces deux sites, beaucoup moins importante toutefois que celle de Y685. Y685 reste la cible privilégiée de Src (Jin et al. 2022).

D'autres facteurs vont induire l'activation de Src et promouvoir son effet conduisant à l'hyperperméabilité sous l'action de VEGF mais aussi Tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) (Nwariaku et al. 2002). Le dysfonctionnement de la barrière endothéliale peut également être dû à l'activation de la PTK des adhérences focales (FAK) impliquée dans la formation des fibres de stress, l'interaction avec les intégrines, l'adhésion des cellules aux substrats et la migration (Guo et al. 2020).

C-terminal Src kinase (Csk)

Csk est un régulateur négatif de la famille de Src kinase. Sa fonction est principalement associée à l'inhibition de la prolifération des cellules endothéliales par l'interaction directe de son domaine SH2 avec le site Y685-VEcadhérine phosphorylé (Baumeister et al. 2005). L'inhibition de Csk résulte en une augmentation de la phosphorylation sur Y416 sur Src synonyme d'état actif, et à l'augmentation de la phosphorylation de Y685 VE-cadhérine, cible de Src (X. Zhang et al. 2023).

Proto-oncogene tyrosine kinase (Yes)

En plus de Src, les cellules endothéliales expriment fortement la PTK Yes, qui fait partie de la famille des SFKs. Dans cette récente étude, il a été apporté une nouvelle idée sur la phosphorylation de la VE-cadhérine. En effet, la PTK Yes aurait une plus grande capacité à phosphoryler les 3 sites tyrosines de la VE-cadhérine, Y685, Y731 et Y658, que Src, car son inhibition conduirait à une chute drastique de la phosphorylation de ces derniers. La délétion de Yes conduit à une perte de la migration, de l'extravasation des leucocytes, à une augmentation de la perméabilité *in vivo*, et est requise dans l'endocytose, contrairement à Src. Mais, de manière étonnante, Yes n'affecte pas le bourgeonnement, la prolifération ou l'apoptose. De plus, Yes inhibée ne modifie pas l'apparence des jonctions contrairement à l'inhibition de Src (Jin et al. 2022).

- **Les tyrosine phosphatases**

SHP2

La tyrosine phosphatase (SHP2) contient deux domaines SH2 du côté N-terminal suivi d'un domaine phosphatase du côté C-terminal avec deux sites tyrosines. Elle est associée à la VE-cadhérine via la β -caténine. Sous la stimulation de la thrombine, il a été montré que SHP2 induisait la déphosphorylation de

VE-cadhérine et de β -caténine. Une déplétion de SHP2 empêchait la déphosphorylation de ces 2 protéines. De plus, une délétion de SHP2 par siRNA est responsable du ralentissement de re-fermeture des jonctions endothéliales et d'une diminution de la motilité de la VE-cadhérine vers la membrane après la stimulation avec la thrombine. Par conséquent, cette étude nous montre l'importance de SHP2 dans la restauration de la barrière endothéliale (Timmerman et al. 2012).

Vascular endothelial protein tyrosine phosphatase (VE-PTP)

VE-PTP est une enzyme membranaire spécifique à la cellule endothéliale. Elle peut se lier au récepteur de l'angiopoïétine Tie2 et inhiber son activité. Ce dernier est par ailleurs impliqué dans l'angiogenèse, la survie cellulaire et la prolifération (Y. Li et al. 2023). L'association de VE-PTP avec VE-cadhérine est essentielle pour le maintien de l'intégrité de la barrière endothéliale notamment par le contrôle de l'état de phosphorylation de VE-cadhérine par VE-PTP. Cette phosphatase est cruciale dans le remodelage vasculaire, et une mutation sur ce gène est létale.

DEP-1

Density-enhanced phosphatase (DEP-1) est une phosphatase surexprimée et localisée aux jonctions endothéliales lorsque les cellules sont confluentes. Elle n'est pas physiquement liée à la VE-cadhérine. La délétion de cette phosphatase restaure la phosphorylation et l'activité de VEGFR2. Il a été suggéré qu'en réponse à VEGF, les cellules confluentes réduisaient l'action de VEGFR2 par inhibition de contact (VE-cadhérine) et par l'action de la phosphatase DEP-1 (Lampugnani et al. 2003).

- **Rho-GEF Trio**

Les GTPases de la famille Rho contrôlent l'organisation du cytosquelette d'actine. Les facteurs d'échanges nucléotidiques (GEF) (guanine nucleotide exchange factors) activent les GTPases en accélérant l'échange du GDP pour le GTP. Trio est une protéine de la famille des Rho-GEF comprenant 3 domaines catalytiques, 2 domaines GEF et un domaine sérine/thréonine kinase, identifié comme nouveau composant des jonctions d'adhérence par sa capacité à se lier de manière transitoire directement à la partie cytoplasmique de la VE-cadhérine pendant la formation ou la reformation des jonctions. La VE-cadhérine recrute Trio, active Rac1 et stabilise les jonctions au cours de leur néoformation. Sa délétion est synonyme d'une perte d'intégrité liée à l'absence de régulation du cytosquelette d'actine (Timmerman et al. 2015).

- **G-protéine alpha13**

G-protéine alpha13 fait partie de la famille des protéines G hétérodimères qui transmet les signaux des récepteurs couplés à la protéine G vers d'autres effecteurs en aval. Il a été démontré que G-alpha13 pouvait former un complexe avec VE-cadhérine et activer Src en présence de facteurs d'inflammation. Src phosphoryle Y658 de la VE-cadhérine conduisant à la dissociation de p120 et l'internalisation de la VE-cadhérine. Donc, G alpha13, est impliquée dans l'intégrité des jonctions et la perméabilité (Gong et al. 2014).

- **Yes associated protein (YAP)**

YAP est connu comme un régulateur co-transcriptionnel. Giampietro et son équipe ont démontré que YAP s'associe aux jonctions adhérentes via l' α -caténine dans les jonctions stabilisées, alors que dans les cellules clairsemées YAP est principalement localisé dans les noyaux et est transcriptionnellement actif et contribuera ainsi à l'activation de certains gènes (Giampietro et al. 2015). Ces données indiquent que YAP est particulièrement associé à l'angiogenèse et l'organisation des jonctions.

De plus, YAP et le régulateur de transcription tafazzin (TAZ) sont décrits dans la littérature comme régulateurs de l'activité transcriptionnelle, de la prolifération cellulaire, de l'apoptose, de la migration et de la contraction de l'actomyosine. Dans une étude de Neto et al, les auteurs ont démontré l'expression abondante de ces deux protéines dans la formation des vaisseaux et les ont aussi localisées au niveau des jonctions d'adhérence dans la rétine de souris. YAP et TAZ sont démontrés comme des régulateurs de la migration cellulaire et du réarrangement cellulaire. La délétion de ces 2 protéines révèle un défaut drastique dans le développement des vaisseaux associé à un défaut d'anastomose et à la présence d'hémorragies au niveau des bourgeonnements, qui est expliquée par la rupture de l'intégrité des jonctions. Le knockdown de YAP et TAZ réduit fortement le taux de turn-over de la VE-cadhérine qui est alors plus mobile à la membrane, ce qui conduit à la modification morphologique des jonctions (Neto et al. s. d.).

Au final, la VE-cadhérine, du fait de ses partenaires protéiques, joue un rôle central dans l'intégrité des cellules endothéliales en conditions physiologiques comme pathologiques, telles que la perméabilité, l'angiogenèse, la migration, la prolifération et la diapédèse des leucocytes. Toute l'importance de la VE-cadhérine dans ces fonctions sera détaillée dans la partie suivante

III.3. Les fonctions de la cellule endothéliale et l'implication de la VE-cadhérine.

La complexité de la cellule endothéliale révèle l'importance de son implication dans l'homéostasie des vaisseaux sanguins. L'endothélium n'est pas juste une barrière entre les tissus et le sang qui laisse passer certaines molécules. Ses fonctions sont multiples, allant du contrôle du tonus vasculaire et de la pression sanguine jusqu'à la coagulation, la fibrinolyse, l'adhésion et l'agrégation des plaquettes. L'endothélium joue également un rôle fondamental dans la régulation du système immunitaire, de l'inflammation et de l'angiogenèse. Au cours de cette partie, nous allons discuter de ces différentes fonctions et mettre en évidence l'importance de la VE-cadhérine.

III.3.1. L'angiogenèse

La dissociation des jonctions d'adhérence est indispensable pour l'établissement des bourgeonnements au cours de l'angiogenèse. Un remodelage dynamique de la VE-cadhérine est crucial pour la motilité et

le réarrangement des cellules endothéliales. Le rôle important de la VE-cadhérine dans l'angiogenèse a été montré par le knock-out de son gène qui conduit à la létalité de l'embryon avec un fort défaut d'angiogenèse. Elle est donc essentielle au développement, la formation et la maturation des nouveaux vaisseaux (Gory-Fauré, 1999). Par ailleurs, en 2006, Gavard et al ont montré que l'activation de VEGFR2 entraîne l'endocytose de la VE-cadhérine, réduisant ainsi l'adhésion intercellulaire. En effet, Src est activé suite à la dimérisation de VEGFR2, résultant en la phosphorylation de guanine nucleotide exchange factor VAV2. Ce dernier active une cascade de signalisation incluant l'activité d'une petite GTPase Rac régulant p21-activated kinase, qui phosphoryle la sérine 665 de la VE-cadhérine. La phosphorylation de cette sérine recrute la β -arrestine2, initiant l'endocytose (Fig38) (Gavard et Gutkind 2006).

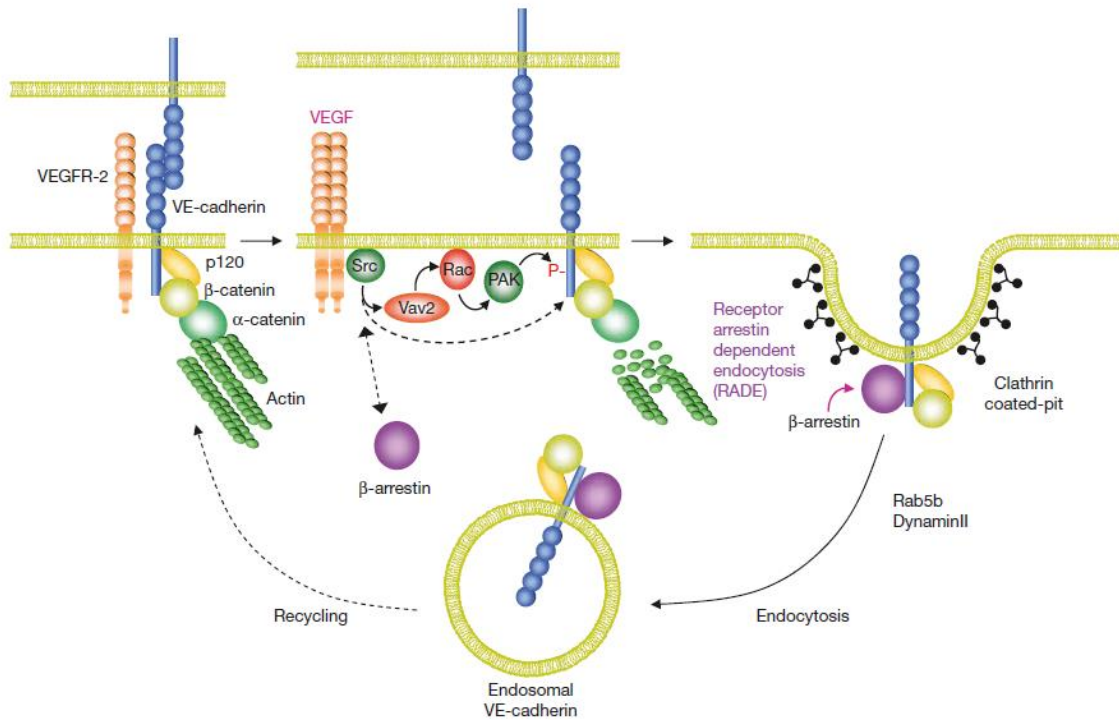


Figure 38: Mécanisme d'endocytose de la VE-cadhérine (Gavard et Gutkind 2006)

Démonstré par Gaengel en 2012, la VE-cadhérine est diminuée au niveau de la membrane sous l'action de VEGF (Gaengel et al. 2012). En effet, la VE-cadhérine a un caractère anti-angiogénique et une diminution de la VE-cadhérine amplifie les bourgeonnements au niveau de la rétine des souris (Gaengel et al. 2012). Toutes ces études montrent l'importance de la régulation de la VE-cadhérine au cours de l'angiogenèse. L'importance du remodelage dynamique de la VE-cadhérine dans le bourgeonnement a également été mise en évidence grâce à Notch/VEGFR qui régule le turnover de VE-cadhérine au niveau des jonctions pour favoriser le réarrangement cellulaire et le mouvement des cellules endothéliales au cours du bourgeonnement (Bentley et al. 2014).

III.3.2. L'angiogenèse pathologique et la VE-cadhérine

L'angiogenèse pathologique implique un déséquilibre entre les facteurs pro et anti-angiogéniques et est observée dans les tumeurs dont les vaisseaux sont mal formés, au débit très lent et perméables. Ces phénomènes peuvent être expliqués par des stimuli comme l'hypoxie, l'inflammation, et l'expression de gènes oncogéniques. Il a été démontré, au sein des gliomes, la forte expression de la VE-cadhérine et sa phosphorylation sur le site Y685. Cette phosphorylation engendrée par la stimulation de VEGF induit le clivage de la partie extracellulaire de la VE-cadhérine en une protéine soluble de 90 kDa par les métalloprotéases provenant des cellules de gliome. Cette VE-cadhérine soluble a été suggérée comme pouvant être un biomarqueur de résistance aux traitements (Vilgrain et al. 2013).

Dans le cas des tumeurs, en plus de la mauvaise formation des vaisseaux, des pseudo-vaisseaux peuvent se former : le mimétisme vasculogénique (vasculogenic mimicry (VM)). La VM est la capacité des cellules cancéreuses à s'incorporer dans des vaisseaux afin d'apporter les nutriments et l'oxygène nécessaires à la croissance tumorale. Ces cellules expriment la VE-cadhérine dans le cas de tumeurs très agressives. Une inhibition de VE-cadhérine affecte le développement du réseau vasculaire dans le cas de mélanome (Hendrix et al. 2001).

De nombreuses pathologies sont caractérisées par la différenciation des cellules endothéliales en cellules mésenchymales. Les cellules endothéliales peuvent changer de forme en raison de leur plasticité et ainsi acquérir un phénotype de cellules mésenchymales et perdre leurs marqueurs endothéliaux. Dans le cas des gliomes, cet état des cellules favorise la migration des cellules endothéliales associées à la tumeur et la dégradation de la VE-cadhérine et donc provoquer une augmentation de la perméabilité et la présence de vaisseaux anormaux (Dudley et Griffioen 2023).

III.3.3. La régulation du trafic des leucocytes et le rôle de la VE-cadhérine.

L'endothélium vasculaire est la clé de la réponse immunitaire car il contrôle la capacité des leucocytes à passer de la circulation générale aux tissus. Les cellules endothéliales assurent le ralentissement des leucocytes jusqu'à leur arrêt et leur migration au travers l'endothélium. Chaque étape est finement régulée par des protéines bien spécifiques. Les sélectines garantissent la capture des leucocytes circulants et leur roulement sur la partie apicale de l'endothélium avec l'aide d'autres chémoattractants comme le complément C5a. L'expression de l'intracellulaire adhesion molecule 1 (ICAM1) et de la molécule d'adhésion cellulaire vasculaire (Vascular cell adhesion molecule (VCAM1)), par exemple, autorise une forte adhésion des leucocytes sur les cellules endothéliales avant leur passage dans la barrière : la diapédèse. Ce processus complexe comprend l'arrêt du roulement des leucocytes, l'ouverture des jonctions, la migration des cellules dans la barrière, l'empêchement de fuite du plasma jusqu'à

l'interdiction de la transmigration réverse, et pour finir la fermeture des jonctions (Fig39) (Vestweber 2015).

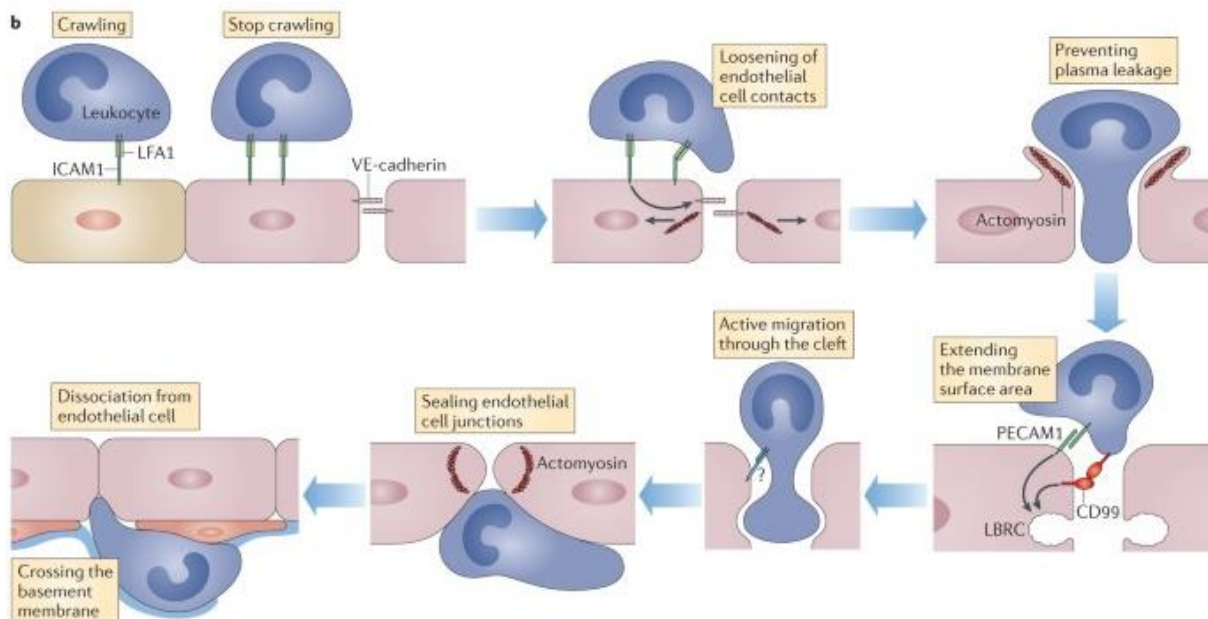


Figure 39: La diapédèse des leucocytes requiert plusieurs étapes régulées par la cellule endothéliale et les leucocytes (Vestweber 2015)

L'une des étapes clé de la diapédèse est l'ouverture des jonctions adhérentes qui nécessite des modifications structurales de la VE-cadhérine. La stimulation par le VEGFA ou l'adhésion des leucocytes sur les cellules endothéliales occasionnent la dissociation rapide de ces partenaires et déstabilisent les contacts intercellulaires et donc l'ouverture des jonctions. La dissociation de VE-PTP de la VE-cadhérine est accompagnée de la phosphorylation de la VE-cadhérine et de la plakoglobine. La plakoglobine est notamment connue pour contribuer à aider VE-PTP dans le maintien de la VE-cadhérine à la membrane et sa phosphorylation inhibe son action et favorise la transmigration des leucocytes (Nottebaum et al. 2008).

En plus de la VE-PTP, l'état de phosphorylation de la VE-cadhérine déclenche aussi la diapédèse. Il a été trouvé que l'adhésion des leucocytes par ICAM1 et VCAM1 induit la phosphorylation de la VE-cadhérine sur tyrosine (Y) l'action de deux tyrosines kinases Src et Protein-tyrosine kinase 2-beta (Pyk2) phosphorylant les sites Y658 et Y731 de la VE-cadhérine. L'inhibition de l'activité d'une de ces tyrosines kinases ou la surexpression de mutant non phosphorylable sur tyrosine résultent en une diminution de la transmigration des cellules (Allingham, van Buul, et Burridge 2007). Toutefois, d'autres études ont montré que seule la phosphorylation de la Y685 VE-cadhérine était impliquée dans la maintenance de l'intégrité uniquement et non dans la transmigration des leucocytes. Un mutant inhibant la phosphorylation diminuait la perméabilité mais n'avait pas d'impact sur la transmigration. De manière inattendue, il a été observé qu'en réalité c'était le site Y731 de la VE-cadhérine qui était véritablement responsable de la diapédèse et plus particulièrement sa déphosphorylation (Wessel et al. 2014a). Ce site Y731 est retrouvé constitutivement phosphorylé à l'état basal et les leucocytes induisent la déphosphorylation favorisant la transmigration par l'intervention de PECAM1. Les leucocytes stimulent PECAM1, menant à sa dissociation d'avec SPH2 requise pour la déphosphorylation de VE-cadhérine et de son endocytose, et ainsi conduire à l'ouverture des jonctions. Il semble donc que la phosphorylation du site Y731 de la VE-

cadhérine soit cruciale dans la diapédèse. De plus, cette phosphorylation n'est possible qu'avec la mobilisation du calcium qui va induire une contraction via la myosine II et ainsi rendre le site Y731 accessible à SHP2 (Arif et al. 2021b) (Fig40). Ces études nous font remarquer que chaque tyrosine de la VE-cadhérine remplit un rôle bien spécifique dans l'intégrité de la barrière et dans la transmigration des cellules immunitaires.

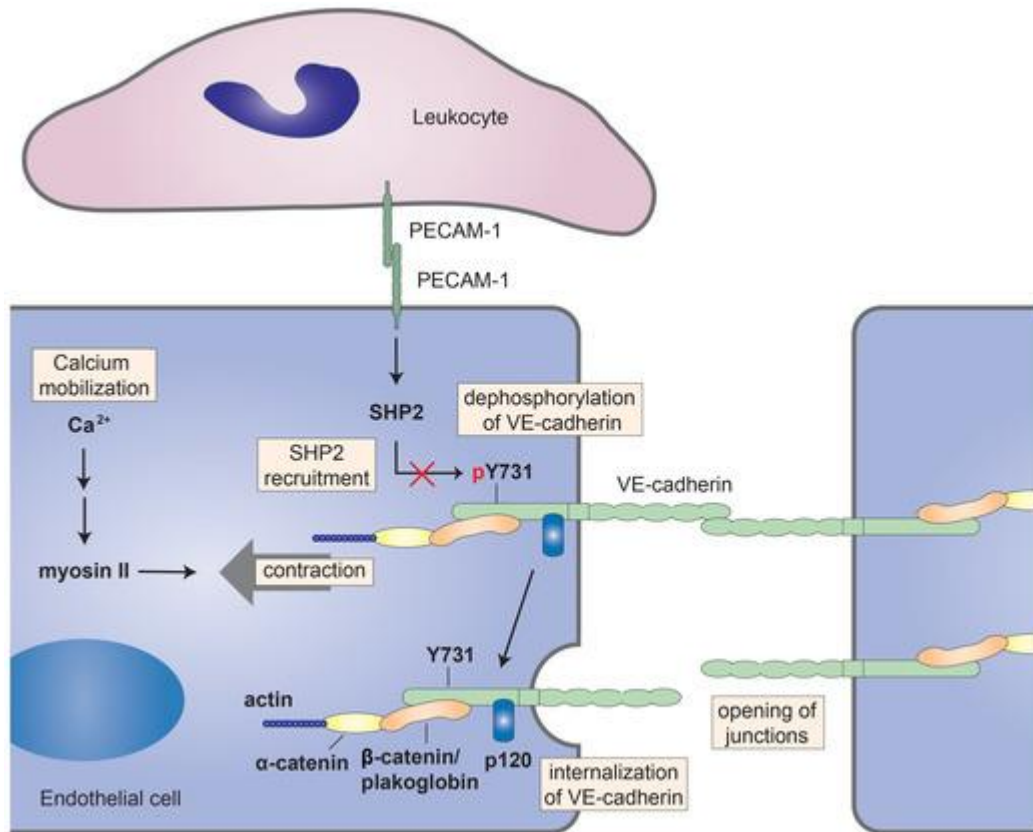


Figure 40: Mécanisme permettant l'ouverture des jonctions pour l'extravasation des leucocytes (Arif et al. 2021b)

III.3.4. La perméabilité

III.3.4.1. L'induction de la perméabilité

Les jonctions d'adhérence jouent un rôle fondamental dans l'intégrité de l'endothélium vasculaire. La perméabilité est un processus essentiel en condition physiologique pour permettre le passage des nutriments, d'ions et de l'oxygène au niveau des différents tissus. Le passage de ces substances se fait majoritairement par diffusion passive comme nous l'avons vu précédemment, mais peut aussi se faire par la voie transcellulaire et la voie paracellulaire.

Une dérégulation de la perméabilité est souvent associée à de nombreuses pathologies allant de processus cancéreux à l'hypertension artérielle. La première preuve montrant le rôle de la VE-cadhérine dans le contrôle de la perméabilité remonte à 1999, quand l'équipe d'Elisabetta Dejana a montré que des vaisseaux exposés à des hauts stress mécaniques, comme c'est le cas dans le poumon et dans le cœur,

présentaient un fort marquage avec un anticorps anti-VE-cadhérine. En revanche, l'injection de l'anticorps appelé BV13 *in vivo* chez la souris avait la capacité d'augmenter la perméabilité (Corada et al. 1999; Lampugnani, Dejana, et Giampietro 2018).

Le complexe VE-PTP, VE-cadhérine joue également un rôle central dans la régulation de la perméabilité. Le maintien de ce complexe dans la peau et le poumon inhibe fortement la perméabilité sous stimulation par VEGF ou LPS (Broermann et al. 2011). Il a également été démontré que l'inactivation de VE-PTP dans les embryons de souris conduisait à une suractivation de VEGFR2 et une forte augmentation de la phosphorylation de VE-cadhérine altérant la polarisation des cellules et l'intégrité vasculaire. Donc, VE-PTP a une action indirecte sur VE-cadhérine via le biais de VEGFR2 (Hayashi et al. 2013). Dans un contexte physiologique où l'endothélium est quiescent, VE-PTP stabilise VE-cadhérine à la jonction et limite la perméabilité en inhibant RhoGEF GEF-1 qui est impliqué dans la régulation de l'activité de RhoA et des tensions le long des jonctions. En effet, VE-PTP maintient VE-cadhérine à la membrane en réduisant son taux d'internalisation et une surexpression de VE-PTP dans les cellules qui en sont démunies restaure la dynamique de la VE-cadhérine et la diminution de l'activité de GEF-1 (Juettner et al. 2019).

Dans le cas des glioblastomes, un cancer très agressif dont le taux de survie est très faible, la néovascularisation en est profondément affectée. La vasculature est incomplète, tortueuse, avec une augmentation de la perméabilité corrélée à la sévérité de la tumeur. Il a été démontré pour la première fois par l'équipe d'Isabelle Vilgrain, que les gliomes présentaient la forme phosphorylée sur site 685 de la VE-cadhérine en plus de sa forte expression dans les tissus. Ils ont ainsi suggéré que Src induisait la phosphorylation sur Y685 de la VE-cadhérine uniquement (Wallez et al. 2007) en réponse à la stimulation par VEGF. Une autre étude a approfondi le mécanisme autour de cette phosphorylation en suggérant que la phosphorylation VEGFR2 sur la tyrosine Y951 facilite le recrutement de Tsad qui en retour conduit à l'activation de Src par phosphorylation sur son site Y418, ce qui fait que Src phosphoryle en continu le site Y685 sans rétrocontrôle négatif (Sun et al. 2012). Par la suite, il a été montré que cette phosphorylation conduisait au clivage de la partie extracellulaire de la VE-cadhérine sous stimulation de VEGF *in vitro*. Le fragment soluble de l'ordre de 90 kDa était détecté dans le milieu conditionné des cellules stimulées par VEGF mais également dans un milieu conditionné contenant des métalloprotéases issues de glioblastome suggérant que ces dernières pouvaient cliver la VE-cadhérine phosphorylée (Vilgrain et al. 2013). La VE-cadhérine soluble pouvait être un biomarqueur, puisqu'elle a été retrouvée dans le sang de patients porteurs de la pathologie.

Étant donné l'importance de ce site de phosphorylation, une souris porteuse de la mutation sur ce site a été générée afin d'étudier les effets de Y685 VE-cadhérine. Pour cela, la tyrosine Y685 a été remplacée par une phénylalanine empêchant la phosphorylation de la VE-cadhérine sur ce site. L'étude a été ciblée sur l'utérus et les ovaires de souris, organes angiogéniques sous contrôle hormonal. Dans ce cas, il a été démontré que la mutation n'avait pas d'impact sur la viabilité ni sur la fertilité des souris. Toutefois, il a été observé la formation d'œdèmes au niveau des ovaires et une accumulation de fibres de collagène autour des vaisseaux. De plus, une hyperperméabilité a été observée dans les souris porteuses de la mutation dans la peau à l'état basal et sous stimulation au VEGF (Sidibé et al. 2014).

En 2014, F. Wessel a démontré qu'en réponse à des agents inflammatoires comme VEGF ou l'histamine, seule l'augmentation de la perméabilité était observée avec la phosphorylation de Y685. La phosphorylation du site Y731 ne l'affectait pas et était uniquement liée à l'extravasation des leucocytes (Wessel et al. 2014b). De manière étonnante, lorsque l'on suit l'activité temporelle de Src, on constate que le premier effet de Src est la phosphorylation de Y731 de la VE-cadhérine qui conduit à l'accumulation de VE-cadhérine à la membrane et ainsi amplifie le maintien de la barrière endothéliale. Mais si l'activation

de Src est prolongée, elle phosphoryle le site Y685 et pourra ainsi modifier l'intégrité de l'endothélium (Fig41) (Klomp et al. 2019) (Sidibé et Imhof 2014).

La perméabilité peut aussi être influencée par le flux. Il a été démontré qu'en conditions physiologiques, les sites Y685 et Y658 de la VE-cadhérine sont phosphorylés dans les veines et non dans les artères, du fait de la différence des forces de cisaillement. Dans cette étude, les auteurs ont montré que l'état de phosphorylation de la VE-cadhérine pouvait contribuer au dynamisme des jonctions mais que l'ajout de facteurs inflammatoires était nécessaire à l'augmentation de la perméabilité. Ainsi, sous stimulation par la bradykinine, la perméabilité est augmentée via la phosphorylation de Y685 et Y658 de la VE-cadhérine par Src, induisant son internalisation. Les mêmes effets ont été observés en réponse à l'histamine (Orsenigo et al. 2012). Des travaux très récents ont montré que la régulation de l'activité de Yes dans l'endothélium vasculaire dépend du type de vaisseau et du type d'écoulement laminaire. Pour les cellules soumises à un faible stress en raison d'un flux lent (veines et capillaires), Yes induit la phosphorylation de la VE-cadhérine, contrairement aux cellules soumises à un stress élevé. D'autre part, dans cette même étude, les auteurs ont démontré que Yes induisait l'internalisation de VE-cadhérine et que la délétion de Yes affectait l'intégrité de la barrière via l'augmentation de la perméabilité au niveau des veines et des capillaires. L'état de phosphorylation de la VE-cadhérine serait donc requis pour la plasticité des jonctions, la migration et le maintien de la barrière endothéliale (Jin et al. 2022).

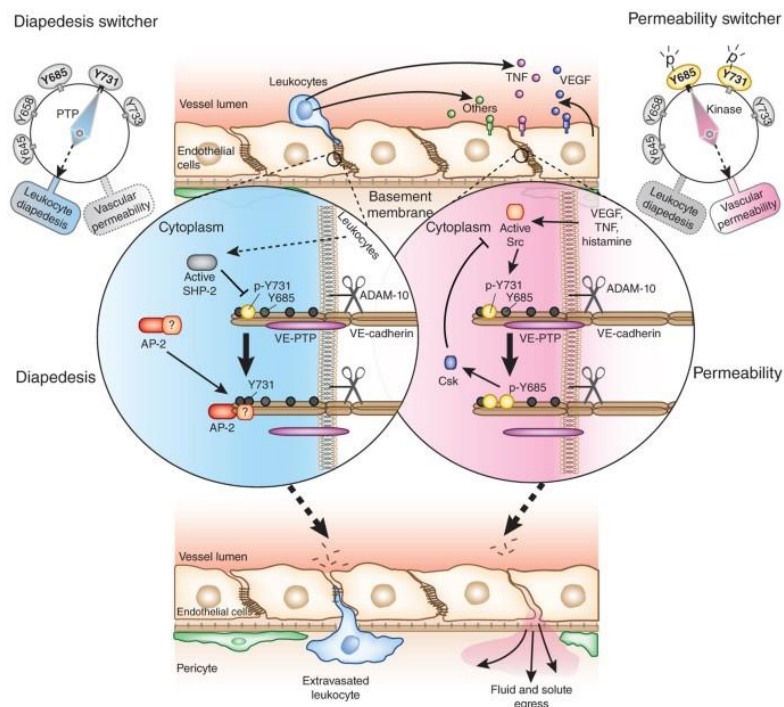


Figure 41: Mécanismes impliquant la VE-cadhérine dans la diapédèse et la perméabilité (Sidibé et Imhof 2014)

III.3.4.2. Stabilité de l'endothélium

Contrairement aux agents inflammatoires qui favorisent la perte d'intégrité de la barrière endothéliale, d'autres facteurs vont avoir un effet opposé et contribuer à son maintien. C'est le cas de l'angiopoiétine 1 (Ang-1) et Sphingosine-1-phosphate (S1P).

- **L'angiopoiétine-1 et la perméabilité**

L'angiopoiétine-1 (Ang-1) active le récepteur à activité tyrosine kinase Tie2 et inhibe la signalisation VEGF/VEGFR2 dans le but de maintenir la barrière endothéliale (Thurston et al. 2000). Dans le cas d'une vasculopathie diabétique, l'injection d' Ang-1 contribue au maintien des jonctions et à la diminution de la perméabilité grâce à la stabilisation de la VE-cadhérine à la membrane (J. Zhao et al. 2015). Le knockout de Ang-1 chez les souris a montré des vaisseaux malformés, des défauts de bourgeonnement et une forte perméabilité. Ce phénotype est également retrouvé avec un knockout de Tie2. Ang-1 joue un rôle dans le développement et la maturation des vaisseaux au cours du développement mais aussi sur les vaisseaux formés par son action inhibitrice de la perméabilité via la régulation des protéines des jonctions comme PECAM-1 et VE-cadhérine (Gamble et al. 2000).

- **Sphingosine-1-phosphate S1P**

Le sphingosine 1-phosphate (S1P) est un lipide régulant des fonctions biologiques variées et essentielles via son interaction avec des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) connus comme les récepteurs de S1P. Le S1P est présent en quantité importante dans le plasma (où sa concentration peut atteindre 1 μM) où il est lié à plus de 90 % aux lipoprotéines de haute densité (*high density lipoprotein* ou HDL) et à l'albumine, et minoritairement aux lipoprotéines de basse densité (*low density lipoprotein* ou LDL) et de très basse densité (*very low density lipoprotein* ou VLDL). Le flux sanguin délivre ce S1P dont la principale fonction est d'améliorer le maintien de l'endothélium vasculaire et d'avoir un puissant effet protecteur de l'intégrité vasculaire. La majorité des S1P circulant dans le plasma provient des cellules endothéliales et des érythrocytes via l'activité de sphingosine kinase (SPHK). Pour cela, S1P se lie à une famille de 5 récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés à la protéine G : S1PR1-5. Les récepteurs S1PR de 1 à 3 sont exprimés dans la cellule endothéliale. Par l'activation de ces récepteurs, S1P va contribuer à la diminution de la perméabilité et à la stabilisation des vaisseaux par le recrutement des cellules musculaires lisses et des péricytes (Hla, Venkataraman et Michaud 2008). En ce sens, Gaengel a notamment démontré que S1PR1 avait la capacité de contrecarrer l'effet de VEGF, en inhibant l'angiogenèse et stabilisant la VE-cadhérine à la membrane (Gaengel et al. 2012).

S1PR1 sera longuement discuté dans la revue au cours de laquelle nous verrons ses fonctions, ses mécanismes d'action et son lien avec la VE-cadhérine dans le maintien de l'intégrité.

Conclusion

L'endothélium est fondamental dans le bon fonctionnement des organes et sa dérégulation est à l'origine de nombreuses pathologies. Il est décrit comme très hétérogène et complexe car ses fonctions varient en fonction de l'organe. Il est donc très important de bien caractériser les cellules endothéliales du lit vasculaire afin de définir de nouvelles cibles thérapeutiques. La perte de l'intégrité de la barrière est un des symptômes majeurs de nombreuses pathologies comme nous l'avons vu dans le poumon. L'étude de la VE-cadhérine comme un des acteurs principaux de la jonction nous permettrait de mieux évaluer son rôle exact dans les mécanismes de régulation des jonctions et ainsi de pouvoir la définir comme un outil clinique pour évaluer la sévérité d'une pathologie ou identifier de nouvelles cibles thérapeutiques

CHAPITRE IV :

Objectifs de thèse

Une étude en 2018 a mis en évidence pour la première fois que la VE-cadhérine pouvait avoir la capacité de réguler l'expression de gènes endothéliaux en empêchant la translocation nucléaire de promoteurs ou d'inhibiteurs de la transcription de gènes. Par exemple, l'association de VE-cadhérine/ β -caténine séquestre Ezhr2 (enhancer of zeste homolog 2) bloque son action d'inhibition de la transcription du gène claudine-5 (Morini et al. 2018).

À la lecture des études qui démontrent l'importance du site Y685 de la VE-cadhérine sur la fonction de la cellule endothéliale, notamment dans le maintien des jonctions, il est crucial de comprendre le rôle exact de ce site dans les fonctions endothéliales afin d'en établir ses rôles potentiels dans la reprogrammation de la cellule endothéliale, afin de mieux cibler dans le cadre de nouvelles thérapies. Il a été émis l'hypothèse que la phosphorylation de la VE-cadhérine sur Y685 pouvait engendrer la délocalisation de la β -caténine, connue pour son activité de facteur de transcription, dans le noyau et conduire à la reprogrammation des gènes de la cellule endothéliale.

Objectifs de la thèse:

Mon objectif majeur a été :

- D'examiner l'effet de la mutation de la tyrosine Y685 sur la reprogrammation de la cellule endothéliale dans un organe hautement vascularisé et exprimant fortement la VE-cadhérine : le poumon ;
- D'identifier les gènes et les fonctions régulées par ce site et comment ils le sont ;
- De caractériser le rôle de cette mutation sur les fonctions des cellules endothéliales *in vitro* et *in vivo*.

Les objectifs corollaires à cette thèse ont été :

- D'établir un système 2D et 3D de co-culture afin de développer un outil clinique pour étudier l'effet de l'environnement sur la VE-cadhérine et l'efficacité de traitements utilisés en cancérologie.
- De définir le clivage de VE-cadhérine comme un biomarqueur pertinent dans l'étude de la pathologie du COVID long.

Les résultats de cette thèse seront présentés sous formes d'articles.

PARTIE 2

Contribution de la mutation sur la tyrosine 685 de la VE-cadhérine dans la reprogrammation de la cellule endothéliale du poumon

CHAPITRE I :

Analyse du profil transcriptomique et des voies de signalisations des cellules endothéliales microvasculaires des poumons de souris porteuse de la mutation Y685F VE-cadhérine.

I.1.Objectifs de l'étude

Par l'utilisation de la souris Y685F, notre objectif d'étude est de déterminer si la phosphorylation d'un site spécifique de la VE-cadhérine comme Y685 peut moduler la reprogrammation de la cellule endothéliale et plus précisément l'expression de ces gènes dans le poumon à l'état physiologique. Notre hypothèse de travail était que le site Y685 de la VE-cadhérine, par sa phosphorylation sur Y685 conduisait au clivage de la partie extracellulaire et donc à la dégradation rapide de la partie intracellulaire. La perte de cette dernière conduit à la dissociation de la VE-cadhérine d'avec ses partenaires dont la β -caténine connue pour son activité régulatrice de l'expression génique. La délocalisation dans le noyau de la β -caténine induirait la modulation des gènes endothéliaux, des caractéristiques propres de la cellule jusqu'au phénotype du poumon.

Les résultats du travail vont être soumis très prochainement Et les principaux résultats sont présentés ci-après.

I.2.Principaux résultats de l'étude

Nous avons comparé une souris sauvage (WT) avec une souris porteuse de la mutation Y685F (KI) en condition physiologique. Étant donné que la phosphorylation sur la Y685 de la VE-cadhérine déstabilise les jonctions, nous nous sommes intéressés à l'effet de l'absence de la phosphorylation de ce site au niveau des caractéristiques angiogéniques de la cellule endothéliale qui sont la migration, la prolifération et l'adhésion cellulaire. Pour cela, les cellules endothéliales ont été isolées à partir du poumon de souris dont la pureté de la fraction isolée a été vérifiée par Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS) et

immunofluorescence. La migration est l'un des critères essentiels de l'angiogenèse car elle permet la formation de nouveaux vaisseaux par le déplacement des cellules « tip » et le recrutement des cellules « stalk ». Le test de migration nous a montré un pourcentage d'ouverture de la blessure plus fort chez les cellules KI que chez WT, signe d'un défaut de migration. De même, le test des billes en gel de fibrine a permis d'étudier en détail les capacités de bourgeonnement des cellules grâce au logiciel « Angiogenesis analyzer ». Les résultats obtenus nous ont suggéré que la capacité de bourgeonnement de cellules KI était diminuée, et que les cellules endothéliales KI proliféraient moins mais qu'elles adhéraient plus au substrat. Ces études *in vitro* mettent en évidence que la capacité angiogénique des cellules KI est fortement impactée.

Toutes ces altérations *in vitro* nous permettent de suggérer que l'absence de phosphorylation de Y685 de la VE-cadhérine induit un remodelage des propriétés de la cellule endothéliale. Mais les mécanismes par lequel le site Y685 non phosphorylé de la VE-cadhérine reprogramme la cellule endothéliale restent inconnus. Le RNA-seq sur les cellules endothéliales isolées de souris KI a révélé le changement de 884 gènes dont 766 gènes étaient sous-régulés et 118 sur-régulés, dont les fonctions de l'angiogenèse et de l'adhésion cellulaire qui s'en retrouvaient fortement impactées. Parmi tous ces gènes, S1pr1, surexprimé, attira notre attention par son implication dans l'adhésion cellulaire et dans l'angiogenèse.

S1PR1 est le récepteur de S1P, un lysophospholipide circulant dans le sang et sécrété par les cellules endothéliales et les érythrocytes. Ce récepteur de 7 domaines transmembranaires et couplé à la protéine G. S1PR1 est exprimé fortement dans les cellules endothéliales, contrairement à S1PR2 et S1PR3. S1PR1 a largement été décrit dans la littérature comme un protecteur de l'intégrité de la barrière, notamment par le maintien de la VE-cadhérine au niveau des membranes et des α , β , γ -caténine au niveau des jonctions. Sa phosphorylation sur Y143 entraîne son endocytose vers le réticulum endoplasmique et une dérégulation des jonctions, de même que S1PR1 a également été largement décrit dans la littérature comme un récepteur anti-angiogénique par l'inhibition de la voie de signalisation de VEGFR2, réduisant la capacité de bourgeonnement au niveau de la rétine (Garnier et Vilgrain 2023).

Nous avons pu démontrer que Y685F avait la capacité de réguler des gènes endothéliaux mais par quel mécanisme, cela restait encore à déterminer. Dans notre hypothèse de travail, il a été émis que β -caténine pouvait remplir ce rôle. La co-immunoprécipitation de la VE-cadhérine avec la β -caténine a montré une diminution de l'interaction entre ces deux protéines. De manière intéressante, la β -caténine est retrouvée délocalisée dans le noyau des cellules endothéliales KI. Toujours dans la compréhension des mécanismes de régulation, nous avons étudié en détail le cas de S1PR1. Dans notre étude, la surexpression génique et protéique de S1PR1 a été vérifiée : il peut ainsi contribuer à la stabilisation des vaisseaux. Nous avons voulu établir le moyen par lequel Y685F pouvait moduler l'expression de S1PR1. L'immunoprécipitation de la chromatine, ChIP a suggéré que l'un des facteurs de transcription connu de S1PR1, forkhead box 1 (FOXF1), avait une plus forte capacité de liaison au promoteur de S1pr1 chez les KI. FOXF1 a été montré comme très abondant dans les capillaires de poumons adultes quiescents et comme maintenant la barrière. Et la délétion de FOXF1 est retrouvée dans le cas d'IPF associé à une augmentation de fibrose (Cai et al. 2016a). Ces résultats suggèrent que Y685F de la VE-cadhérine induit la reprogrammation génique par β -caténine et par FOXF1 pour S1pr1.

Étant donné que le site Y685 ne peut plus être phosphorylé, nous avons voulu déterminer si cette mutation pouvait engendrer des altérations sur l'état de phosphorylation sur d'autres sites tyrosine de la VE-cadhérine. De manière surprenante, seule la phosphorylation du site Y731 de la VE-cadhérine est augmentée chez les KI, expliquant ainsi la délocalisation de sa protéine de liaison β -caténine.

Les résultats *in vitro* mettent en évidence des cellules endothéliales aux propriétés anti-angiogéniques. Dans la littérature, il est bien établi que l'inhibition de VEGFR2 conduit à ce type de résultats, notamment par l'absence de phosphorylation de la VE-cadhérine sur Y685 par VEGFR2. Nous nous sommes ainsi intéressés à l'axe VEGFR2 et VE-cadhérine, et plus particulièrement si Y685F de la VE-cadhérine avait la capacité de réguler VEGFR2. Effectivement, l'expression génique et protéique de VEGFR2 a été retrouvée diminuée chez les KI. Ces données nous suggèrent que Y685F de la VE-cadhérine module VEGFR2 et contribue au maintien de l'intégrité.

Au vue des modifications *in vitro* et transcriptomique, nous nous sommes demandés si Y685 de la VE-cadhérine pouvait aussi avoir un effet sur les poumons *in vivo*. Les coupes histologiques de poumon nous ont montré que les souris KI exhibaient une barrière plus stable que chez WT avec une diminution du dépôt de collagène, synonyme de fibrose, autour des vaisseaux. Les études morphologiques ont également montré un remodelage des vaisseaux notamment avec une augmentation de leur épaisseur, une diminution de la lumière intra-vasculaire et un nombre inférieur de vaisseaux chez les KI. Le lavage broncho-alvéolaire consiste à obtenir une image de la composition de l'espace alvéolaire et ainsi avoir des indices sur l'état de perméabilité. Comparées au WT, la concentration des protéines ne présentent pas de différences majeures chez les KI, seules une cytokine a été retrouvée augmentée chez les KI : ostéopontine. Ces résultats *in vivo*, nous montrent que la mutation sur Y685 conduit à la stabilité de la barrière endothéliale.

Pour la première fois, il a été mis en évidence qu'un site de phosphorylation muté pouvait moduler l'expression des gènes impliqués dans l'angiogenèse et l'adhésion cellulaire. Nous avons également démontré que ce site contrôlait l'expression de S1PR1 via son facteur de transcription (FOXF1) permettant la stabilisation des vaisseaux et inhibant les propriétés angiogéniques de VEGFR2. Le dialogue entre VE-cadhérine et S1PR1 ainsi que les fonctions de S1PR1 seront amplement détaillées dans la revue : *Dialogue between VE-Cadherin and Sphingosine 1 Phosphate Receptor1 (S1PR1) for Protecting Endothelial Functions* ci-après l'article.

I.3. Article

Transcriptomic profiling and pathway analysis of mouse lung microvascular endothelial cells with Y685F VE-cadherin knock-in

Article bientôt en soumission

Transcriptomic profiling and pathway analysis of mouse lung microvascular endothelial cells with Y685F VE-cadherin knock-in

Olivia GARNIER¹, Florian JEANNERET², Aude DURAND³, Arnold FERTIN⁴, Donald MARTIN⁴, Sarah BERNDT⁵, Gilles CARPENTIER⁶, Christophe BATTAIL², Isabelle VILGRAIN¹

- 1) Univ. Grenoble Alpes, INSERM U13, CEA, Institute of Interdisciplinary Research of Grenoble (IRIG), Laboratory of Biosciences et Bioingénierie pour la santé (BGE)-Biomics, 38000 Grenoble, France .
- 2) Univ. Grenoble Alpes, INSERM U13, CEA, Institute of Interdisciplinary Research of Grenoble (IRIG), Laboratory of Biosciences et Bioingénierie pour la santé (BGE)-BIOMICS, 38000 Grenoble, France .
- 3) LETI-DTBS-LSMB CEA Grenoble
- 4) Univ. Grenoble Alpes, CNRS, TIMC-IMAG - UMR 5525, 38000 Grenoble, France.
- 5) School of Pharmaceutical Sciences, Université de Genève, Rue Michel Servet 1, 1211, Geneva, 4, Switzerland
- 6) Gly-CRRET Research Unit 4397, Université Paris-Est Créteil, 61 avenue du général de Gaulle, 94010, Créteil, France

Running title: VE-cadherin mutation drives S1PR1 expression

Key words: Gene expression, Endothelial cells, VE-cadherin, protein phosphorylations, tyrosine kinases, S1PR1 .

To whom correspondence should be addressed :

Dr Isabelle VILGRAIN

Univ. Grenoble Alpes, INSERM U13, CEA, Institute of Interdisciplinary Research of Grenoble (IRIG), Laboratory of Biosciences et Bioingénierie pour la Santé (BGE)-BIOMICS, 38054-Grenoble Cedex, France

E-mail : isabelle.vilgrain@cea.fr

ABSTRACT

We previously reported that endothelial cell (ECs) dysfunction occurs in disease processes involving angiogenesis. Endothelial plasticity involves tyrosine phosphorylation of the cadherin–catenin complex including VE-cadherin. To provide a systematic broad-based view of this mechanisms, in the present study, we report the comprehensive transcriptome profiling of Lung ECs from carrying the single point mutation Y685F VE-cadherin and unveil cellular dynamics and molecular features associated with cell-cell adhesion and angiogenesis. We identified a total of 884 differential expressed genes (DEGs) regulated by VE-cadherin knock-in on the basis of transcriptomic RNA sequencing (RNA-Seq). Gene ontology analysis revealed that upregulated DEGs were mainly enriched in cell-cell adhesion and angiogenesis which were found to be the most deregulated functions of lung EC culture. Among the top 30 DEGs, genes encoding for transmembrane receptors were up-regulated, whereas genes encoding for protein phosphatase or enzymes involved in anions transport, and lipid metabolism were downregulated. Among receptors, Sphingosine-1-phosphate-receptor 1 (S1pr1) was the highest mean expression among the samples. Analysis of gene interaction networks identified that S1pr1 strongly linked with Cdh5, Kdr and genes related to cell-cell adhesion and angiogenesis. Mechanistically, immunoprecipitation assay showed a significant decrease in the ratio mutant VE-cadherin/ β -catenin which was correlated with an increase in the nuclear ratio β -catenin/Histone H3. Using Chromatin immunoprecipitation assay (CHIPS), we found that the transcriptional activity of S1pr1 promoter was increased by the direct binding of the lung transcriptional regulator FOXF1. Of importance, VE-cadherin mutant was phosphorylated on Y⁷³¹ and located the membrane which showed less vascular remodeling with less fibrosis in lungs from mutated mice. Hence, our findings provide new insights in the role of a single tyrosine of VE-cadherin which would participate in an endothelial-specific transcription program important for tumor vessels and therapeutic targets.

Introduction

Endothelial cells (ECs) are lining the lumen of blood vessels and orchestrate important processes such as vasomotor tone, coagulation, permeability, tissue vascularization and immune response (1). The vascular network responds to the subsequent metabolic changes in a rhythmic pattern with the change in the physiology of several organs specially those which are subjected to hormonal control (2). While ECs remain quiescent throughout adulthood, the activation of endothelium occurs during patho/physiological conditions and lead to either endothelial activation or to angiogenesis (3). The process of angiogenesis is dynamically adjusted with several other growth factors and controlled by suitable regulators, such as vascular endothelial growth factor (VEGF) (4). Endothelial adherens junctions are adhesive intercellular contacts that are crucial for the maintenance and regulation of normal vascular function. Alterations in adherens junction assembly influence endothelial cell motility, vascular morphogenesis and permeability. The inability of ECs to fulfill their physiological functions is a key feature of multiple prevalent diseases including hypertension, atherosclerosis, diabetes and cancer. More precisely, we reported that endothelial cell dysfunction occurs in several cancers including renal cell carcinoma, glioblastoma and breast cancer (5-7).

VE-cadherin is an adhesive protein exclusively expressed in ECs whose extracellular domain has an important role in endothelial cell-cell adhesion, whereas the cytoplasmic tail interacts with the actin cytoskeleton via three proteins of the armadillo family, called β -catenin, plakoglobin, and p120 to ensure junctional strength (8). The cytoplasmic domain of VE-cadherin was shown to regulate endothelial protrusive activity *in vitro*, suggesting that this domain may play a prominent part in invasive processes (9). Tyrosine phosphorylation of the cadherin–catenin complex has been proposed as a mechanism that regulates the stability of cell–cell junctions (10). Interestingly, the cytoplasmic domain of VE-cadherin contains nine tyrosine that represent potential target sites for tyrosine kinases. VE-cadherin tyrosine phosphorylation has been reported in ECs under several conditions including stimulation by VEGF. The non-receptor tyrosine kinase of the Src family have an important role in these processes and Src was shown to be associated with VE-cadherin *in vivo* (11) and to induce phosphorylation at site Y685, which correspond to the consensus site (LY⁶⁸⁵ A QV) which fits the YxxV/I/L motif, known for Src family kinases (12,13). In attempt to determine whether human angiogenic tumor tissues have some phosphorylated VE-cadherin molecules in the capillary network, we have investigated glioblastoma because it is a highly vascularized tumor (14, 6). We found that the phosphorylation of the site of Y⁶⁸⁵ in VE-cadherin from human surgical tissues. Due to the importance of angiogenesis in cancer, it was crucial to determine the role of this tyrosine in VE-cadherin. For that purpose, we developed a knock-in mouse (KI) carrying a tyrosine-to phenylalanine point mutation of VE-cadherin Y⁶⁸⁵ (VE-Y⁶⁸⁵F) to study the phenotype of the homozygous mice (15,16). The single point

mutation on one amino acid is not lethal but the KI mice rather developed oedema in organs subjected to hormonal regulation such as ovary and uterus (16). These results as well as other group data suggested that the Y⁶⁸⁵ was responsible of increased permeability (17). Our ultrastructural analysis of endothelial junctions of Y⁶⁸⁵F-VE-cadherin ovary showed an increase in the gap between two adjacent ECs, suggesting that mutation Y⁶⁸⁵F may cause nanomodifications in the structure of endothelial junctions that may be involved in their destabilization (15). Because VE-cadherin is also linked to the actin cytoskeleton, the impact of the mutation might affect the binding of its intracytoplasmic partners including β -catenin which role in cell-cell adhesion control has been well documented (18). In addition, β -catenin can also translocate to the nucleus and acts as a transcriptional activator (19). Given that VE-cadherin is exclusively expressed in ECs, it was reasonable to hypothesize that a single mutation in the protein would affect the anchoring of its binding partners including β -catenin and thus modulate the endothelial gene expression. In this present study, we explored the potential involvement of the single point mutation Y⁶⁸⁵F in VE-cadherin protein in gene expression to get new insights in vascular remodeling and vessel stabilization. We have applied several complementary approaches including primary cell culture from 4-week-old mice, characterization of their angiogenic properties as well as their global transcriptomics profiles. Our results demonstrate that among multiple genes that were modified by the EC mutant, an upregulation of the gene S1PR1 was found which has a role in vessel stabilization. To investigate the molecular mechanisms driven by Y⁶⁸⁵F-VE-cadherin to regulate S1PR1 expression, we performed CHIP assay, immunoblotting and immunocytochemistry which unveils a novel pathway in ECs, depending on intracellular signals leading to vessel stabilization. Hence, our findings provide new insights in the role of a single tyrosine of VE-cadherin which would participate in an endothelial-specific transcription program important for tumor vessels and therapeutic targets.

MATERIAL AND METHODS

Animals.

Four-week-old male wild-type (WT) C57BL/6 mice and four-week-old male transgenic Y⁶⁸⁵F-VE-cadherin (KI) C57BL/6 mice were used for the experiments and were generated as previously described (15). Mice were maintained in a conventional animal facility, on a 12-hour light/12-hour dark cycle. Food and water were available ad libitum. All procedures were carried out in compliance with the principles and guidelines established by the National Institute of Medical Research (INSERM) and approved by the Institutional by the Institutional Ethical Committee for animal experimentation (Comité d'Ethique).

Reagents.

Reagents were purchased from several source: collagenase type I (10114532, Fisher Scientific), DMEM (4.5g/L Glucose) (11965092, Gibco), EGM-2 BulletKit (CC-3156 & CC-4176, Lonza). Pierce BCA dosage Assay kit (23225, ThermoFisher) was used for protein concentration of lung and isolated ECs extracts. Protein G Sepharose 4B fast flow (P3296, Sigma Aldrich) was used for the Co-immunoprecipitation and ChIP assay. For RNA extraction Nucleospin® RNA (740955.50, Machery-Nagel) was used. For cDNA synthesis, 5x iScript Reaction Mix (1708890, Biorad) was used. For qPCR, SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix (1725270, Biorad) was purchased. For PCR, EconoTaq Plus Green (30033, Lucigen) was purchased. Mouse Angiogenesis array kit was purchased at ARY015, R&D system for protein array. For Masson trichrome staining, a special kit (H15) and hematoxylin Gill (GHS332) and eosin (HT110232) were purchased at Sigma Aldrich.

Antibodies.

Commercially available antibodies were purchased from several sources: Antibodies used for the FACS: CD-31 (PE) antibodies were from Becton-Dickinson, CD45R (**53-0452-82**, Fisher scientific). For Miltenyi cell isolation: CD45 microbeads (130-052-301, Miltenyi), CD31 microbeads (130-097-418, Miltenyi) and MS Separate column (130-042-201, Miltenyi) were used. Anti-VE-cadherin antibody (AF1002) and anti FOXF1 antibody (AF4798) were purchased from R&D system). Anti S1PR1 antibody was from (SAB4500687, Sigma-Aldrich). Anti-VEGFR2 antibody (sc-6251), anti-VEGF antibody (sc-7269), anti-Src antibody (sc-18), anti-VE-cadherin antibody (sc-19) were from Santa-Cruz. Anti-pY¹¹⁷⁵-VEGFR2 antibody (D5B11), and anti β -catenin antibody (9562) were purchased from Cell signaling. Anti-pY⁴¹⁸-Src (LF-PA20465) was from Ab Frontier. Anti-pY⁶⁵⁸-VE-cadherin antibody (44-1144G), and anti-pY⁷³¹-VE-cadherin antibody (441145G) were from Invitrogen. Cy3 Donkey anti-Goat (705-166-147) secondary antibody was from Jackson.

Isolation of ECs.

Fluorescent activated cell sorter (FACS). 4 week-old male mice were sacrificed and the lungs were immediately placed in cold sterile PBS (Ca-/Mg-). The tissues were shredded using scalpel into small pieces then transferred into a previously autoclaved Erlenmeyer flask containing collagenase type 1. Collagenase type I was prepared in DMEM at (3mg/mL).The digestion last 45 minutes at 37°C and every 15 minutes. The digestion was stopped by adding an equal volume of DMEM (4.5 g/L Glucose) with 20% fetal bovine serum. The cells suspension obtained was passed through a 10 mL syringe with a 18G needle, then filtrated with the following filters: 100, 70 μ m and 40 μ m diameter. After centrifugation for 5 minutes at 1200 rpm, the pellet was suspended in DMEM for cell counting. The solution was centrifuged again 5 min at 1200 rpm to resuspend the cell pellet at a cell concentration of 10X10⁶ cells/mL in PBS(Ca+/Mg+) / BSA 2%. The cell suspension was distributed into separate falcon tubes for immunostaining: either with negative control, or with CD45-Alexa 488 antibody, or with CD31-PE antibody. Following an incubation for 1 hour at 4°C in the dark under stirring every 10 minutes, the cells were washed with PBS (Ca+/Mg+)/BSA 2% and centrifuged 5 min at 1200 rpm. 500 μ L of DMEM without serum was added in each tube, filtrate and cells were collected in

DMEM with 20% FBS. The stained cells were washed twice, resuspended in PBS and analysed in a FACScaliber flow cytometer (Becton Dickinson).

Miltenyi method. ECs were prepared from lungs from 4 week-old male mice according to the manufacturer's instructions. The cell suspension was then plated onto fibronectin-coated wells (300 000 cells per well) or cultured 5 days before experiments or used for RNA isolation.

RNA preparation. Nucleospin® RNA kit was used according to the manufacturer instructions. RNA was eluted with 40µL of autoclaved distilled water. The purity of RNA was checked and quantified with a NanoDrop spectrophotometer (Thermo Fisher, Massachusetts, USA).

Reverse transcription of RNA to cDNA. The RNA isolated from the ECs was processed using iScript cDNA Synthesis Kit following the manufacturer's instructions. The complete reaction mix was incubated in a thermal cycler in the following protocol: 5 minutes at 25°C, 20 minutes at 46°C and 1 minute at 95°C.

Quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR). SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix was used for cDNA amplification with different genes primers (see table S1) on the CFX96 Real-Time PCR Detection System using the following conditions: 95°C 30 seconds/ 95°C 5 seconds; 60 °C 15 seconds for 39 cycles, 95°C for 10 seconds, 65°C for 5 seconds and 65°C for 5 seconds.

Polymerase Chain Reaction PCR. DNA were amplified with FOXF1 binding promoter primers (see table S1) and EconoTaq Plus Green according the following cycles: 3 minutes at 95°C, 34 cycles: 95°C 15 seconds; 62°C 15 seconds; 72°C 20 seconds, 72°C 10 minutes. The samples were loaded onto the agarose gel for analysis. The relative level of RNA was normalized to housekeeping gene *hprt1*. Fold change was calculated using the $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ method) (20).

Transcriptomic analysis.

FACS method was used to isolate ECs and were sent in liquid nitrogen to GENEWIZ (**Genomics European Headquarters** Bahnhofstr. 8 04158 Leipzig Germany). Total RNA was extracted using Qiagen RNeasy Mini kit following manufacturer's instructions (Qiagen, Hilden, Germany). RNA samples were quantified using Qubit 4.0 Fluorometer (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) and RNA integrity was checked with RNA Kit on Agilent 5300 Fragment Analyzer (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). RNA sequencing libraries were prepared using the NEBNext Ultra RNA Library Prep Kit for Illumina following manufacturer's instructions (NEB, Ipswich, MA, USA). Briefly, mRNAs were first enriched with Oligo(dT) beads. Enriched mRNAs were fragmented for 15 minutes at 94 °C. First strand and second strand cDNAs were subsequently synthesized. cDNA fragments were end repaired and adenylated at 3' ends, and universal adapters were ligated to cDNA fragments, followed by index addition and library enrichment by limited-cycle PCR. Sequencing libraries were validated using NGS Kit on the Agilent 5300 Fragment Analyzer (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA), and quantified by using Qubit 4.0 Fluorometer (Invitrogen, Carlsbad, CA).

The sequencing libraries were multiplexed and loaded on the flowcell on the Illumina NovaSeq 6000 instrument according to manufacturer's instructions. The samples were sequenced using a 2x150 Pair-End (PE) configuration v1.5. Image analysis and base calling were conducted by the NovaSeq Control Software (NCS). Raw sequence data (.bcl files) generated from Illumina NovaSeq was converted into fastq files and de-multiplexed using Illumina bcl2fastq program version 2.20. One mismatch was allowed for index sequence identification. After investigating the quality of the raw data, sequence reads were trimmed to remove possible adapter sequences and nucleotides with poor quality using Trimmomatic v.0.36. The trimmed reads were mapped to the mouse reference genome available on ENSEMBL using the STAR aligner v.2.5.2b. BAM files were generated as a result of this step. Unique gene hit counts were calculated by using feature Counts from the Subread package v.1.5.2. Only unique reads that fell within exon regions were counted. After extraction of gene hit counts, the gene hit counts table was used for downstream differential expression analysis. Using DESeq2, a comparison of gene expression between the groups of samples was performed. The Wald test was used to generate P values and Log2 fold changes. Genes with adjusted P values < 0.05 and absolute log2 fold changes >1 were called as differentially expressed genes for each comparison. Gene ontology analysis was performed on the statistically significant set of genes by implementing the software GeneSCF. The goa_Mus musculus GO list was used to cluster the set of genes based on their biological process and determine their statistical significance. A PCA analysis was performed using the "plotPCA" function within the DESeq2 R package. The plot shows the samples in a 2D plane spanned by their first two principal components. The top 500 genes, selected by highest row variance, were used to generate the plot. The functional enrichment analysis was performed based on the "Biological Process" ontologies from the Gene Ontology database (GO.db R package version 3.16.0). ORA and GSEA were computed using the Bioconductor/R package clusterProfiler (version 4.6.0). Gene sets with a corrected p-value (Benjamini-Hochberg correction method) < 0.05 were considered significant. Protein-protein networks were built using the STRING-DB web software (<https://string-db.org/>) using significant DEGs found in cell-cell adhesion or angiogenesis ontologies. Statistical analysis were performed using R (version 4.2.2).

Endothelial assays.

Migration.

The freshly isolated ECs were immediately seeded at 200 000 cells / well in 96 well plates pre-coated with fibronectin and grown to confluency in the EGM-2 medium. The cells were washed with PBS (Ca+/Mg+) and the scratch was performed with the Incucyte® Cell Migration Kit according to the manufacturer's instructions (Sartorius)(21). After washing twice with PBS (Ca+/Mg+), the media DMEM/1.5% FBS was added. The recording time course of cell migration was for 20h in the Incucyte Zoom live-cell analysis system (Sartorius) and the analysis of the gap area of the wound was performed by the Incucyte Basic Analyzer software.

3D fibrin beads gel assay in vitro.

3D fibrin gel bead assay was performed as described previously (21). Briefly, the ECs were mixed with Cytodex 3 microcarrier beads (800 ECs per bead) and incubated at 37 °C. Gentle agitation was performed every 20 min for 4 h to allow cell adherence to the bead surface. Then beads were

transferred into a 25cm² flask in 5 mL of EGM-2 medium overnight. After 24h, the coated beads (~500 beads/mL) were resuspended in a fibrinogen solution (2.5mg/mL), containing aprotinin (1µg/mL) and VEGF (10ng/mL). Thrombin (10U/mL) was further added to induce fibrinogen polymerization for 15 min at 37 °C. The cells were incubated in EGM-2 supplemented with angiopoietin 1 (250µg/mL), HGF (100ng/mL), IGFBP3(50ng/mL), VEGF (20ng/mL), PDGF (10ng/mL), EGF (100ng/mL) for 4 days (21). Images were obtained using the Axioobserver Z1 Zeiss. Quantification of morphometrical parameters of the capillary network was performed using a program developed for the Image J software (22). This plugin is an extension of the “Angiogenesis Analyzer” for Image J written in the macro language of Image J. Representative parameters measured were number of anchorage per junctions, number of junctions, total master segments and number of meshes per beads.

Adhesion.

Isolated ECs were plated onto fibronectin-precoated-96 well-plates in EGM-2 (1500 cells/well) (21). After 30 min of incubation, the cells were washed with PBS, fixed with PFA 4% and permeabilized with 0.2% Triton X100 for 20 minutes at room temperature. The nuclei were stained with Hoescht (1/400) for 5 minutes in PBS. After 3 washes with PBS, the cells were imaged with the Axio-observer Z1 Zeiss software at the magnification of X5. The nuclei were counted with Image-J software (NIH, Bethesda, MD).

Proliferation.

Isolated ECs were plated onto fibronectin-precoated-96 well-plates in EGM-2 and the proliferation assay was performed for 60 hours in the Incucyte proliferation assay according to (21) (Sartorius). The analysis of the cell proliferation was performed by the Incucyte Basic Analyzer software.

Sub-cellular EC fractionation.

ECs were lysed in 5mM HEPES/NaOH pH 8.0, 85mM KCL, 0.5% NP-40 and leupeptin (10µg/mL), Na₃VO₄ (2mM) lysis buffer, and incubated 10 minutes on ice. The cell solution was centrifuged for 5 min at 3900 g at 4°C and the pellet was lysed with nuclear lysis buffer (50mM Tris/HCL pH 8.1, 300mM NaCl, 10mM EDTA, 1% SDS, leupeptin (10µg/mL), Na₃VO₄ (2mM)) and incubated 10 minutes on ice. Nuclear extracts were obtained by sonication (30 seconds on, 30 seconds off mode for 10 minutes) followed by centrifugation at 20,000xg for 10 min at 4°C. The supernatant was collected as the nuclei fraction.

Immunofluorescence.

Immunofluorescence was performed according to (6). Analysis of VE-cadherin Immunostaining. VE-cadherin signal and nuclei were segmented by first denoising images with a Gaussian filter ($\sigma = 1$), and then denoised images were thresholded with the triangle algorithm. The mean of VE-cadherin signal was computed over its segmentation mask, and the total area of nuclei was computed from Hoescht channel mask. In order to obtain an invariant measure of VE-cadherin signal regarding to both cell number and cell size, the mean VE-cadherin was divided by the total area of nuclei (20).

Chromatin immunoprecipitation assay (ChIP) was performed according to the protocol kindly provided by Dr Marco Saponaro.

Lungs histochemistry.

Lungs were inflated to full capacity and fixed by intratracheal instillation of formalin 10% (1 mL), transferred in ethanol 90% 2 hours at room temperature, then in ethanol 100% 3 hours still at room temperature. After 4 times in methylcyclohexane for 45 minutes at room temperature, the lungs were placed in paraffin/methylcyclohexane (1:1) at 60°C for 24 hours. and into fresh paraffin every day for 4 days, and dried at room temperature. Sagittal sections of 5 μm were cut from paraffin embedded lungs and kept at 60°C for an hour, then stained with Harris's hematoxylin/eosin or Masson's trichrome stain according to (15).

Lung morphometry.

Pulmonary arteries from 4 week-old mice (4 WT and 4 KI) were analyzed as previously described (23). Measurements of the vessel number were taken for each slide corresponding to each mouse lung. Only vessels of luminal diameter between 50-150 μm were selected for analysis. Image J was used for measurement of total vessel area (μm^2), luminal area (μm^2), and inner circumference (μm). Medial area (μm^2) was calculated as the difference between total and luminal areas. Standard medial thickness (μm) was calculated as the ratio of medial area to inner circumference (23).

Western blot and immunoprecipitation.

Protein extracts from lung and isolated ECs were analyzed by Western blot analysis as previously described (14). The antibodies used in the present study were: VE-cadherin (AF1002) (1/500), pY⁷³¹VE-cadherin (1/500), pY⁶⁵⁸VE-cadherin (1/500), pY⁴¹⁶Src (1/1000), Src (1/500), β -catenin (1/1000), VEGFR2 (1/500), pY¹¹⁷³VEGFR2 (1/500), VEGFA (1/500), S1PR1 (1/250). Protein expression was normalized with actin or vinculin expression level as indicated. The results are presented as mean \pm SEM.

For immunoprecipitation, 100 μg of proteins were incubated with 1 μg of VE-cadherin antibody (sc-19) overnight. Then the samples were incubated with protein G Sepharose for 3 hours, then washed run onto SDS-PAGE 10%. The proteins were then transferred onto a 0.45 μm nitrocellulose membrane. Membranes were blocked with milk, incubated with primary antibodies and corresponding HRP-conjugated secondary antibodies. Immunoreactive proteins were visualized by Bio-Rad ChemiDoc™ with ECL reagent (Bio-Rad Laboratories) and were quantified using densitometry with Image-J software (NIH, Bethesda, MD).

Broncho-alveolar lavage (BAL) and Angiogenesis protein array.

Using a 5-mL syringe, 1 mL of PBS with protease and phosphatase inhibitor was injected slowly into a cannula connected to the mice larynx. The BALF was collected by slowly drawing the injected PBS back

into the syringe and was placed in a 2-mL microfuge tube and placed on ice until BAL samples from all mice are collected. When all were collected, after a centrifugation for 5 min at 1000g, the supernatants were collected and concentrated on Amicon Ultra-2 - Ultracel-10 membrane, 10 kDa. Protein concentrations were determined using the Micro BCA Protein Assay Kit. Analysis was performed using the Angiogenesis assay according to the manufacturer's instructions (4 membranes). Immunoreactive proteins were visualized by Bio-Rad ChemiDoc™ with ECL reagent (Bio-Rad Laboratories) and were quantified using densitometry with Image-J software (NIH, Bethesda, MD).

Statistical analysis.

At least three to five mice per group were used in each set of experiments. The experiments were performed at least three times under identical conditions with comparable results. Data are represented as individual values plus means \pm SD. The sample size, what each "n" represents, the statistical tests used and the result of the statistical test are indicated in each respective figure legend. Statistical analyses were performed using Prism v8.0 (GraphPad) software. Differences between two different groups were analyzed by unpaired Student's t-test. A probability value <0.05 indicated by an asterisk* showed a significant difference between 2 groups. Non significant difference was indicated by ns. For immunostaining and immunofluorescence images, assessment of the differences were performed using boxplot and scatter plot in R along with Kruskal-Wallis rank sum test and chi-square test to determine the p-value.

RESULTS

Transcriptome of ECs from lungs of WT and KI mice

In the present study, we report the comprehensive transcriptome profiling of lung ECs from early young adult mice carrying the single point mutation Y⁶⁸⁵F VE-cadherin and unveil cellular dynamics and molecular features associated with cell-cell adhesion and angiogenesis. Lung purified ECs contained endothelial cell-specific mRNAs but not those encoding epithelial or fibroblast markers (Fig S1 and supplementary results). The RNA extracted from the cells was subjected to Next Generation Sequencing analysis (RNA-seq), and the resulting reads were aligned along 94,818 transcripts of the mouse genome (Fig. 1A). The global transcriptional changes across the two groups was visualized by a Volcano plot where the log fold change of each gene is represented (x-axis) in function of $(-\log_{10})$ of its adjusted p-value (y-axis). Genes with a corrected p-value less than 0.05 and an absolute $\log_2(\text{Fold change}) > 1$ are indicated by red dots. 884 genes were differentially expressed between ECs from KI mice and WT with 766 genes downregulated and 118 genes upregulated in ECs from KI mice. The top 10 of the Biological Processes (BPs) from the Gene Ontology database were related to cell-cell adhesion and angiogenesis included the vascular development and blood vessel morphogenesis which are the most deregulated functions linked to the endothelial characteristics. The top 30 differentially

expressed genes based on the corrected p-values sorted by the averaged expression value across samples are illustrated in Fig. 1B. The reproducibility among biological triplicates demonstrate the fidelity of the identification, isolation, and profiling of lung-specific ECs. Among the top 30 DEGs, genes encoding for transmembrane receptors such as IL9r, S1pr1, gpr68, Cxcr3V were up-regulated, whereas genes encoding for protein phosphatase Ptpd or enzymes involved in anions transport (Scl36a2, Scl38a5, Scn3a) and lipid metabolism (Lrat, Dpep1, Scube) were downregulated (Fig1C).

Several examples of genes were found to be downregulated in the KI such as, *Apln* (encodes for apelin), *Slit2* (encodes for Slit homolog 2 protein), *Robo4* (for Roundabout homolog 4), *Egfl7* (encodes Epidermal growth factor-like protein 7), *Mmrn2* (encodes for Multimerin-2), *Ccbe1* (for Collagen and calcium-binding EGF domain-containing protein 1), *Kdr* (encodes for VEGFR2), *Ecscr* (for Endothelial cell-specific chemotaxis regulator), *Mmp2* (for type IV collagenase). These genes were involved in the positive balance of angiogenesis and were down regulated in the KI mice (23-32). Among the other family of genes involved in the cell adhesion, several were known to influence EC-matrix interaction, including *Igsf5* (for Immunoglobulin superfamily member 5) (33,34), *Vcam1* (for Vascular cell adhesion protein 1)(35), *Jam2* (for Junctional adhesion molecule B) (36), *Lamb1* (laminin β 1)(37). These genes were downregulated in the KI ECs. The inhibition of their expression was reported to be in favor of a better cell attachment to ECM which corroborates with our previous results on EC adhesion. In contrast, the genes *Jag1* (Jagged 1) (38), *Spock2* (sparc/osteonectin, cwcv and kazal-like domains proteoglycan 2) (39) and *Itga5* (Integrin Subunit Alpha)(40) were upregulated in the KI. Another interesting function affected by the mutation of VE-cadherin is the vascular permeability since the site Y⁶⁸⁵ plays a key role in this process. The most important genes that were up-regulated in KI mice and related to permeability were *Slit2*, *Bmp6* (bone morphogenetic protein 6) (41, 42), *Ramp2* (receptor activity modifying protein 2) (43) while *Plec* (plectin) (44). The former was a gene coding for one of the major cytoskeletal linker protein that primarily binds to intermediate filament.

Using the STRING database to retrieve interactions between DEGs identified from RNAseq, a network of interacting proteins/genes was established to examine cluster coalescence. Cluster analysis revealed that the largest protein-protein interaction (PPI) was in the process of adhesion and angiogenesis. S1PR1 and KDR were found to interact each other and Cdh5 interacts with KDR in cell-cell adhesion and angiogenesis protein-protein

networks (Fig.S2 A,B). These data suggested that the gene expressions encoded by VE-cadherin mutation are involved in the main signaling pathway leading ECs to abnormal cell-adhesion and angiogenesis.

Comparison of angiogenic properties of isolated ECs from WT and KI mice.

The lung provides unique growth conditions for angiogenesis because of its oxygen-rich environment. Moreover, the basal expression of VEGF plays a central role in the life and death of pulmonary vascular ECs (4). Thus, we wondered whether the ECs from mutated mice exhibited different properties compared to WT involved in the angiogenic processes. We next studied *in vitro* assays for sprouting angiogenesis properties in which isolated ECs WT and KI coated on beads were allowed to sprout into fibrin gel. After 4 days, KI ECs and WT ECs elicited different angiogenic responses (Fig. 2). Thanks to an automated powerful quantification method, we demonstrated the changes in the morphometrical parameters of the neovessels formed in the fibrin matrix. Parameters chosen to our study were summarized in Table 1: number of junctions per bead which is a sign of pseudo-vessels complexity, number of anchorage junctions per bead which reflect the sprouting capacity, total master segment length per bead, which is associated with the ECs elongation, the development of the pseudo-capillaries capacity, and number of meshes per bead for studying the capacity to establish mesh network. All of these properties were significantly decreased in KI ECs as compared to the WT ECs.

Table 1: Vectorial objects characterized and quantified by the software analysis for the WT and KI ECs

Vectorial element	Short definition	WT (mean) ± SEM	KI (mean) ± SEM	p-value
<i>Anchorage Junction</i>	Junction linking a <i>Branch</i> or a <i>Master Segment</i> to a <i>Sphere</i> limit	5.46 ± 0.25	3.9 ± 0.30	0.0001
<i>Junction</i>	Group of <i>Nodes</i> forming a bifurcation	3.18 ± 0.35	2.19 ± 0.58	0.0009
<i>Total Master Segment length</i>	Sum of length of binary lines remaining after removal of branches	234.96 ± 26.31	167.33 ± 46.12	0.0007
<i>Meshes</i>	Area enclosed by <i>Master Segments</i> , or <i>Master Segments</i> and <i>Sphere</i> limits	1.045 ± 0.119	0.647 ± 0.15	0.01

Vascular ECs are critical to this process, since angiogenesis occurs via migration of ECs from pre-existing vessels, endothelial cell movement and proliferation (45). Therefore, we investigated the impact of mutated VE-cadherin on EC migration as it is one of EC functions which involves the dynamic and the interaction between ECs and VE-cadherin (46). The cell culture wound closure assay is one of the basic readouts for characterizing the migratory activity of cells (47). The isolated primary ECs from lung were submitted to wound closure assay using the WoundMaker to create 96 homogeneous scratches in

each microplate well. The wound healing was visualized in real time using the IncuCyte ZOOM™ and imaged over 8 h time period. As a result, the analysis of the lateral scratch wound showed a significant difference in the migratory rate of ECs from KI ($22.45\% \pm 5.207$) as compared to WT ($13.24\% \pm 5.17$) (p -value=0.034) after 20 hours suggesting that the mutant ECs migrate slower than the WT ones (Fig. 3A,B). Thus, the wound assay and the fibrin beads assay strongly suggest that the ECs from lungs of the KI mice had significant differences in their migratory properties.

Next, because the rate limiting step for ECs to start to form a monolayer from blood vessel is the initial adhesion to the extracellular matrix, we assessed cell adhesion for the ECs of the two genotypes (48). Thus, we used fibronectin which is the most classical exogenous substrate for ECs as it represents the classical adhesion-promoting protein. Briefly, the ECs were seeded (1500 cells/well) onto fibronectin-coated plates and incubated for 30 min at 37°C. At the end of the incubation time, the nuclei were staining with Hoescht and counted (49). As a result, the interaction with fibronectin was significantly higher (37.625 ± 9.23) in KI than in WT (26.8 ± 3.258 , p -value=0.012) (Fig. 3C). This data suggest that the ECs from KI mice formed the first few bonds during initial cell-substrate contact much faster than the ECs from WT mice.

We next wondered whether VE-cadherin mutant could affect EC proliferation as VE-cadherin was described to act as a negative regulator of EC proliferation (50,51). To test this hypothesis, the ECs from both genotypes were plated in 96 well-plates and the proliferation was followed for up to 60h. As a result, the ECs from WT mice started to proliferate between 40 to 60h, while the ECs from the mutant mice remained at a constant rate over the time period tested (WT 141.85 ± 32.52 vs KI 70.66 ± 14.86 , p =0.040 for 50h; WT 165.71 ± 34.14 vs KI 75.22 ± 24.25 , p =0.037 for 60h) (Fig 3D). This result is consistent with our previous results showing that ECs from mutant mice are more adherent to the external substrate.

Finally, VE-cadherin assembly into cell-cell junctions was then investigated in lung ECs from WT and KI mice in culture. Analysis of intensity of the immunostaining of VE-cadherin area at the membrane showed a significant highest labeling in the KI ECs (KI 189.7 ± 21.06) as compared to WT ECs (WT 100 ± 6.52) (p -value 0.0001) (Fig. 3 E,F).

Collectively, these results strongly suggest a powerful effect of the mutation of VE-cadherin on gene expressions as well as on EC features in the field of cell-cell adhesion and angiogenesis.

The binding of β -catenin to VE-cadherin is decreased in KI ECs

In order to determine how VE-cadherin mutation was involved in these processes, we wondered whether the association beta-catenin/VE-cadherin mutant was affected. We thus performed an immunoprecipitation of VE-cadherin antibody and immunoblotted with the antibody to beta-catenin from lung lysates from WT and KI mice. While beta-catenin was detected in each immunoprecipitate, a significant decrease in the interaction between mutated VE-cadherin and beta-catenin was found in KI mice (0.798 ± 0.098) compared to WT (1.136 ± 0.092) (p -value=0.0369) (Fig. 4A). In agreement with previous data (52), we confirmed that some beta-catenin molecules were removed from the VE-cadherin complex of adherens junctions. Knowing beta-catenin as a key role in the gene regulation (19), we investigated whether it could be delocalized into the nucleus in KI ECs. Therefore, we performed a sub-cellular fractionation and demonstrated an increase of beta-catenin in the nuclear fraction of KI lung (1.11 ± 0.14) compared with WT (0.69 ± 0.10) (p -value=0.040) (Fig. 4B). Thus, VE-cadherin mutant is associated to a lesser extent with β -catenin which translocated to the nucleus.

S1PR1 is a direct transcriptional target of the FOXF1 in lung ECs from KI mice compared to WT .

The regulation of β -catenin activity depends on its subcellular localization. In the nucleus, β -catenin interacts preferentially with LEF/TCF transcription factor leading to increase in transcriptional activity (19). In ECs from the lungs quiescent adult organ, the transcription factor forkhead box F1 (FOXF1) is highly expressed and the literature reports that FOXF1 deficiency is associated with a decreased in *S1pr1* expression *in vivo* and *in vitro* (53-55). Our transcriptomic data pointed to *S1PR1* as the gene specifically upregulated in the mutant mice compared to the WT. Therefore, we wondered whether FOXF1 was involved in this process (53). We thus analyzed whether FOXF1 directly regulate *S1pr1 promoter* in both mice genotypes. There are four potential FOXF1 binding sites that were identified in the -6.0-kb promoter region of the mouse *S1pr1* gene. It was shown in the literature that FOXF1 specifically bind to the -3880/-3876-base pair (bp) and -5141/-4815-bp regions of the *S1pr1* promoter (54) (Fig. 4C). Using a chromatin immunoprecipitation assay (CHIP) from mouse lung nuclei extracts from KI and WT to determine whether FOXF1 protein could physically bind to *S1pr1* promoter. We chosen the -5141/-4815-bp DNA fragment to perform RT-qPCR with primers (see table Supplementary 1) designed to capture the FOXF1-binding site near the transcription start site of the *S1pr1* promoter. EconoTaq Plus Green according the following cycles: 3 minutes at 95°C, 34 cycles: 95°C 15 seconds; 62°C 15 seconds; 72°C 20 seconds, 72°C 10 minutes. The DNA concentration was measured and the same amount of DNA (400ng) were loaded on the agarose gel for analysis. FOXF1 cross-linked protein/DNA complexes were immunoprecipitated with rabbit anti-FOXF1 (Fig. 4D). We have clearly identified that the FOXF1 protein directly bound to *S1PR1* promoter in ECs of both

genotypes with a significant seven fold increase in ECs from KI as compared to ECs from WT (fold-change of 7 ± 1.76 , p-value=0.023) (Fig. 4E). The binding specificity was further confirmed by immunoblot of FOXF1 in the CHIP samples (data not shown). These data suggest a direct transcriptional regulation of S1PR1 by FOXF1 in EC from KI mice. Analysis of the S1PR1 RNA and protein were further confirmed. Subsequent real-time PCR confirmed the above findings and showed a significant induction of S1PR1 mRNA expression, with an average fold change of 3.26 ± 0.310 (p-value=0.011) (Fig. 4F,G). When normalized to the level of β -actin, immunoblotting analysis showed a four-fold increased (p-value=0.034) of the S1PR1 protein in the KI mice compared to WT.

Therefore, it was concluded that the point mutation of VE-cadherin impaired beta-catenin binding leading to its translocation to nucleus and activation via FOXF1 of S1PR1 mRNA and protein .

Mutated VE-cadherin downregulates VEGFR2 independently of VEGF.

Previous studies have described that the loss of *S1PR1* in ECs induced vessel hyper-sprouting in the retina due to an increase in VEGFR2 activity (56). Therefore, we wondered whether the expression of VEGFR2 both at transcriptional and at the protein level was modified by VE-cadherin mutation. As a result, the relative expression of VEGFR2 mRNA was found to be decrease by 50% in the KI mouse vs the WT (p-value= 0.012). When normalized to actin, the protein expression of VEGFR2 was also decreased (p-value=0.02) (Fig 5A) as well as the phosphorylation of VEGFR2 at site Y¹¹⁷³ (KI: 0.53 ± 0.23 vs WT 1.71 ± 0.10 ; p-value= 0.009). In agreement with RT-PCR experiments and protein analysis, this data confirmed that a partially loss of VEGFR2 in the KI mice than in WT (Fig. 5B). Hence, we wanted to verify whether this VEGFR2 modification was related to the VEGFA level. Protein analysis was performed by Western blotting by use of an antibody that recognized the isoform 165 as a 23-kDa protein. No commercial antibody was available to detect specifically the 188 isoform. Thus, in our hands, we found a 23-kDa protein as well as the 46 kDa present in the same amount in the lung extracts of the two genotypes (Fig. 5C). Altogether, these results suggested that VEGFR2 was inhibited both at a transcriptional and protein level in the KI model without any change in VEGF expression. In contrast to the results previous published in the angiogenesis in the retina (56), the surexpression of S1PR1 in EC from adult KI lung showed a reduced VEGFR2 expression which is in agreement with the modification of the angiogenic features of EC isolated from KI as compared to WT.

VE-cadherin mutant is phosphorylated at site Y⁷³¹ and is associated with active Src

To further explore the mechanisms involved in the binding of β -catenin to mutated VE-cadherin, we determined the sites of phosphorylation in both genotypes by immunoblotting with the anti-pY⁶⁵⁸ VE-cadherin antibody and the anti-pY⁷³¹ VE-cadherin antibody (52). While no significant difference was found in pY⁶⁵⁸VE-cadherin between KI (0.38 ± 0.059) and WT (WT 0.553 ± 0.2) (p-value= 0.45) (Fig 6A), the site Y731 was significantly more phosphorylated in KI (1.48 ± 0.14) compared WT (WT 0.82 ± 0.13), (p-value=0.041) (Fig. 6B). This result demonstrates that in both genotypes VE-cadherin is phosphorylated in lung in vivo which is in agreement with our previous published data (11). Thus the phosphorylation of the site Y731 will impaired the binding of mutated VE-cadherin to β -catenin (52). In order to determine the kinases involved in that processes, we analyzed the presence of activated Src in both ECs types as it was described to be a good regulator of tyrosine phosphorylated sites of VE-cadherin. Using immunoblotting with the anti-pY⁴¹⁸-Src antibody from ECs lysates from WT and KI mice, we demonstrated that the level of activated c-Src was largely increased in the ECs from KI compared WT (KI 1.29 ± 0.09 vs WT 0.77 ± 0.07 , p-value= 0.02)(Fig. 6C). Moreover, it was found that pY⁴¹⁸-Src signal was significantly prominent in VE-cadherin immunoprecipitates from the KI mice (0.60 ± 0.035), (p-value=0.0269) and to a lesser extent in WT (0.35 ± 0.0643) (Fig. 6D). These findings confirmed our previously published data (11) and suggest that the VE-cadherin mutant is phosphorylated at site 731, and maintains Src at the EC junctions to exert its activity on junctional components.

EC mutation induced vascular alterations of lungs

To evaluate the functional involvement of S1PR1-induced EC barrier enhancement, Based on our transcriptomic data from ECs derived from lung mice, we wondered whether S1PR1 could affect the morphology of lung vessels. Histological examination of lung sections confirmed a strong decrease in KI vessel number (n=287) as compared to WT (n=411) (p-value=0.036) (Fig. 7A,B). A significant increase (2.06 fold) in the ratio of medial area to luminal area of pulmonary arteries of similar diameter (75-150 μ m) was noticed in the KI mice (WT 1.49 ± 0.065 versus KI 2.99 ± 0.506 , p-value=0.000013) (Fig7C). Besides, the lumen area was significantly narrower in the KI mice (WT $5550.23 \mu\text{m}^2 \pm 203$ versus KI $4864.7 \mu\text{m}^2 \pm 280$; p-value= 0.0098) (data not shown). Moreover, the standard medial thickness of pulmonary arteries was calculated as the ratio of medial area to inner circumference. It was higher in the KI 41.39 ± 6.48 (n=81) versus 26.87 ± 1.082 (n=55) for WT (p-value=0.0049) (Fig. 7D). Finally, the ratio of the medial area to total area was higher in the KI

0.66±0.011 versus 0.58±0.01 for the WT (p-value= 0.0000047) (data not shown). Altogether, these results regarding the morphometric analysis of lung vessels from WT and KI mice suggested that the mutation had an important role in the vascular structure of arteries.

Because the pulmonary arterial wall comprises collagen, we attempt to detect any deposition of collagen in KI as compared to WT. The immunohistochemical visualization of collagen fibers and morphometric analysis demonstrated a significant reduction around the walls of small pulmonary arteries in KI lung (mean 70039.02 ± 3142) as compared to WT (mean 53206 ± 3383.2852) (p-value 0.0008) (Fig. 7E,F). These findings are in agreement with the active participation of ECs to transport not only of water and small solutes but also of macromolecules between blood and tissues. Accordingly, we next determine whether any changes in the protein composition in the bronchoalveolar lavage (BAL) in WT and KI mice using a “Mouse Angiogenesis antibody Array” which is sensitive technique. Among 53 immunoreactive proteins that could be detected with this array, three proteins exhibited a significant increase in KI such as DLL4 (fold increase 2.38), known as inhibiting EC proliferation and vascular sprouting (57), insulin-like growth factor-binding protein 2 (IGFB2) (fold increase 1.31) contribute to the fibrogenic process (58) and osteopontin (fold increase 1.58) which is a member of small integrin-binding ligand (59) (Fig.7G). Statistical analysis showed that only osteopontin exhibited a significantly higher level in the KI mice as compared to WT (Fig. 7H). These results are in agreement with the measurement of the protein concentration in the BAL fluid and the edema formation which were found to be unchanged in both genotypes (Fig.S3). Taken together, these data suggested that the mutated VE-cadherin induced vascular alterations of lung vessels, with less fibrosis and no edema.

FIGURE 1

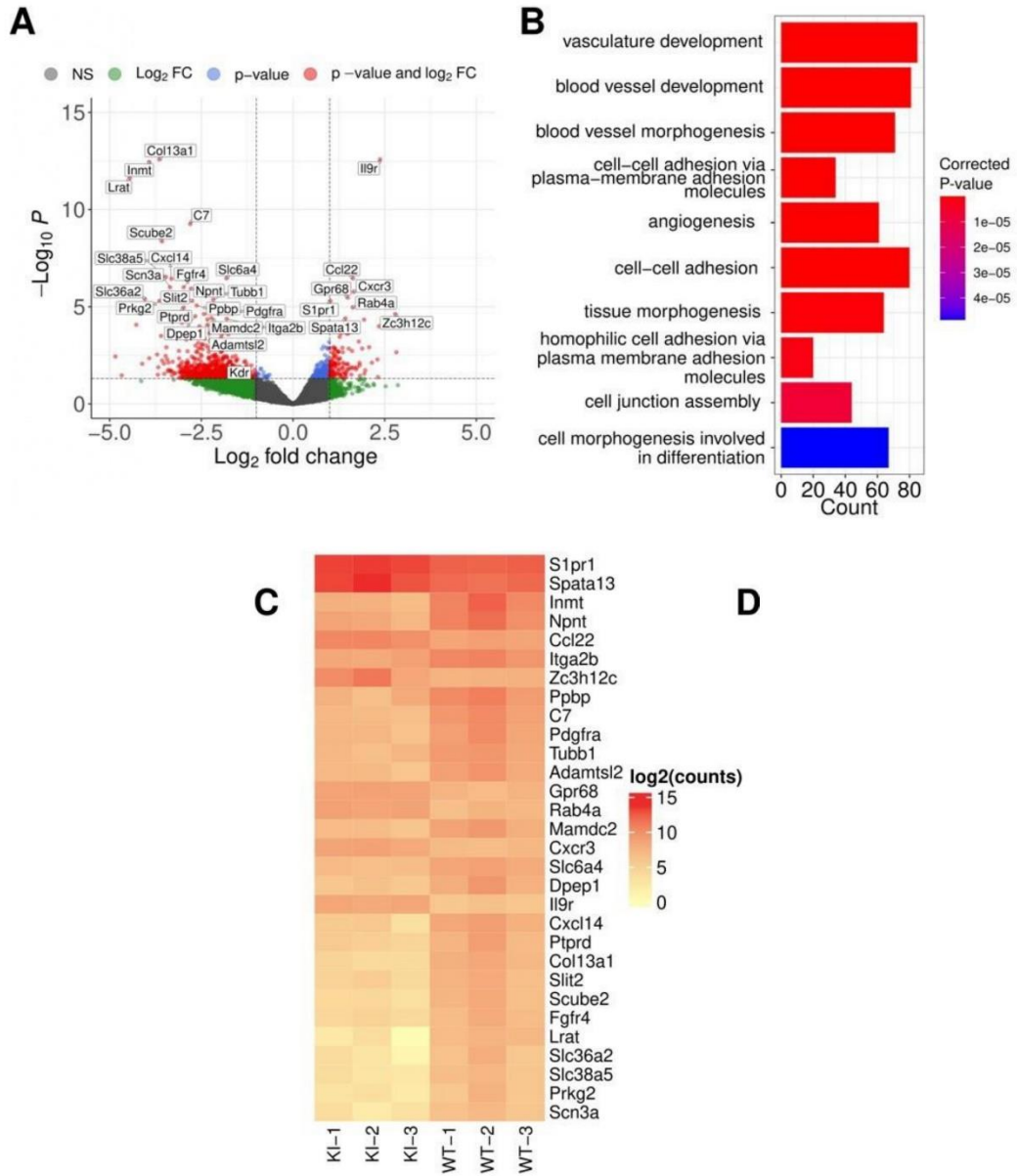


Figure 1: Gene expression profiling of FAC-sorted lung ECs (mutated versus WT) showed genes involved in the cell adhesion and angiogenesis. A. The global transcriptional changes across the two groups was visualized by a Volcano plot. Each point represents a gene. The log fold change of each gene is represented on the x-axis and the $-\log_{10}()$ of its adjusted p-value on the y-axis. Genes with a corrected p-value less than 0.05 and an absolute log₂ (Fold change) greater than 1 are indicated by red dots. **B.** Top 10 of the Biological Processes (BPs) from the Gene Ontology database enriched by significant genes (corrected p-value < 0.05 and absolute log₂(Fold change) > 1). **C.** Heatmap of top 30 differentially expressed genes (DEG) sorting by their average expression value across samples.

FIGURE 2

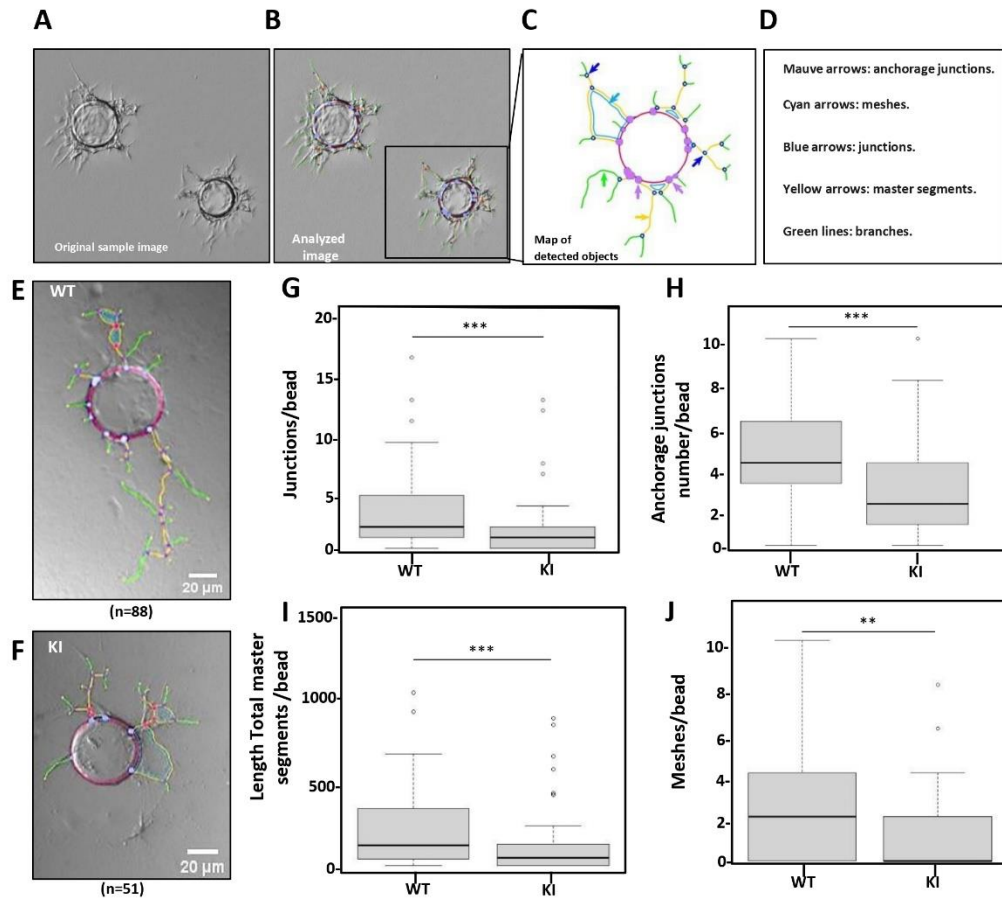


Figure 2: 3D Fibrin gel beads in vitro assay. A-D. Vectorial objects characterized and quantified by the software analysis for the WT and KI cellular trees. E-F. Representative images of EC coating beads sprouting after 4 days. G-J. Quantification of morphometrical parameters of the capillary network was performed by a computerized method on images taken on day 4. Representative parameters measured were number of anchorage per junctions, number of junctions, total master segments and number of meshes per beads. 88 beads for WT and 51 for KI were quantified; All bar graphs showed mean \pm SEM. Statistical significance was calculated by Student's t test two-tailed unpaired t-test, *p-value<0.05, ** p-value<0.01, **** p-value<0.0001 (*<0.05).

FIGURE 3

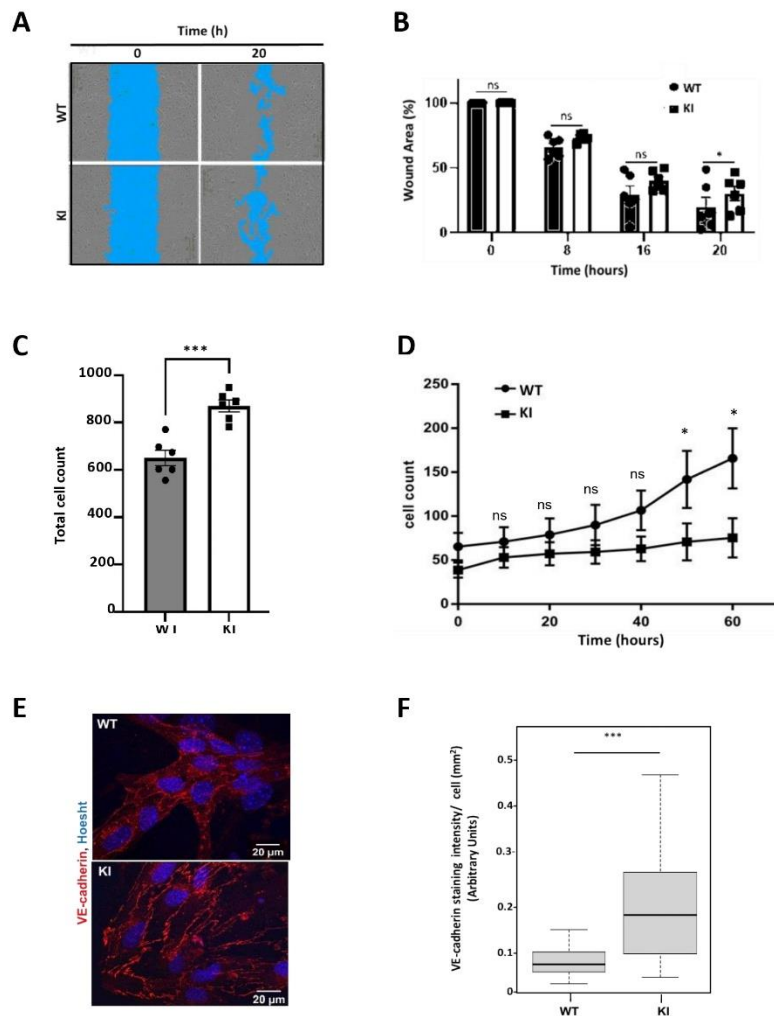


Figure 3: Lung ECs from mutated VE-cadherin mice have modified migration, adhesion and proliferation properties. **A.** Cell culture wound closure assay of ECs from WT and KI. ECs were seeded onto 96-well microplates to reach confluency within 48h. The scratch was made with the Incucyte® 96-Well Woundmaker Tool. The blue region denotes the scratch wound mask over time (t=0, t=20 hours). **B.** The scratch closure was monitored and imaged for 20 hours. The percentage of gap area was followed by repeat scanning in the live-cell analysis software until 20h. Magnification (X10) (n=3 mice per genotype). **C.** Cell adhesion assay. Cells were seeded at 1500 cells/96 wells onto fibronectin coated plate and incubated for 30 min and stained with Hoescht. The nuclei were counted for each well (n=6). **D.** Proliferation assay for WT and KI cells. ECs were seeded at a density of 1000 cells/mL onto a 96 well plate (n=3 mice per genotype). **E.** Representative immunofluorescence of the VE-cadherin on isolated ECs. Isolated ECs from lungs were cultured for 4 days and then fixed with PFA and stained with the VE-cadherin antibody. Hoescht was used to stain cell nuclei. Magnification (X63). All bar graphs showed mean \pm SEM. Statistical significance was calculated by Student's t test two-tailed unpaired t-test, *p-value<0.05, ** p-value<0.01, **** p-value<0.0001 (*<0.05). **F.** The intensity of VE-cadherin staining at membrane was quantified. Images are representative of 3 mice per genotype (n=29 for the WT and n=17 for the KI). Statistical analysis was performed using Mann-Whitney test (***) as described in Methods.

Figure 4

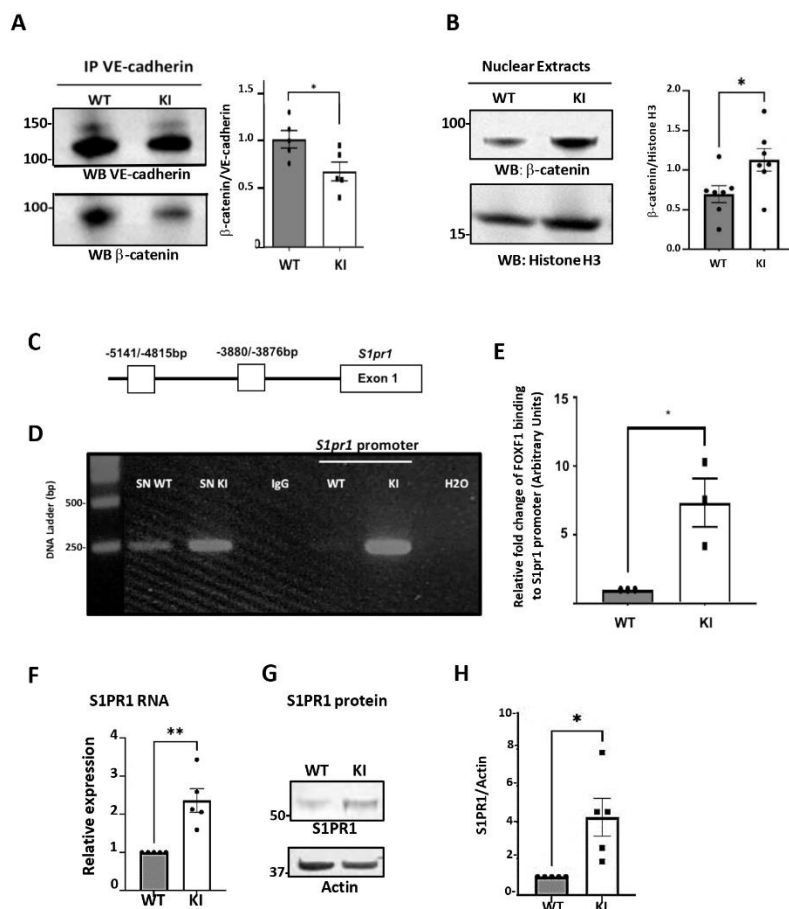


Figure 4: β -catenin dissociates from VE-cadherin and translocates into the nucleus to activate FOXF1 which directly binds to the *S1PR1* promoter in KI mice vs WT, leading to an increase in *S1PR1* mRNA and protein. **A.** Representative western blot of VE-cadherin immunoprecipitate from lung mice extract (100 μ g) probed with β -catenin antibody (n=5 mice per genotype). **B.** Western blot of β -catenin antibody using 16 μ g of protein from nuclear fraction. Histone H3 was used as loading control (n=7 mice per genotype). Molecular mass standards (in kDa) are shown at left. Statistical analysis was performed using Mann-Whitney test (**p-value<0.001) as described in Methods. All analysis of the relative expression of the proteins was measured by densitometry of autoradiographs using Image-J software (NIH, Bethesda, MD). All bar graphs were mean \pm SEM. Statistical analysis were performed using Student t-test (*p-value<0.05). **C.** Schematic drawing of the mouse *S1pr1* promoter region with potential FOXF1 DNA binding sites (white boxes). FOXF1 protein binds to the -5141/-4815-bp and -3880/-3876-bp of *S1pr1* promoter regions. **D.** FOXF1 cross-linked protein/DNA complexes were immunoprecipitated with rabbit anti-FOXF1. The same quantity of DNA was loaded onto the agarose gel for each fraction (Supernatant (SN) and *S1PR1* promoter regions bound to FOXF1). RT-qPCR was performed with primers designed to capture the FOXF1-binding site near the transcription start site of the *S1pr1* promoter, negatively and positively controlled by IgG and total input without immunoprecipitation. **E.** The relative fold change of the binding of FOXF1 on *S1pr1* promoter regions between WT and KI (n=3 mice per genotype) was quantified using Image-J software (NIH, Bethesda, MD). Molecular mass standards (in kDa) are shown at left. **F,G,H.** Relative expression of *S1PR1* mRNA and protein: Expression of *S1PR1* increased in the KI mice. *S1PR1* RNA expression level from isolated endothelial cells was quantified as the fold-change of WT after normalisation with *hprt1*. Immunoblotting analysis of lung protein extracts (30 μ g) was performed using the *S1PR1* antibody (n=5 mice per genotype) and normalized with actin.

FIGURE 5

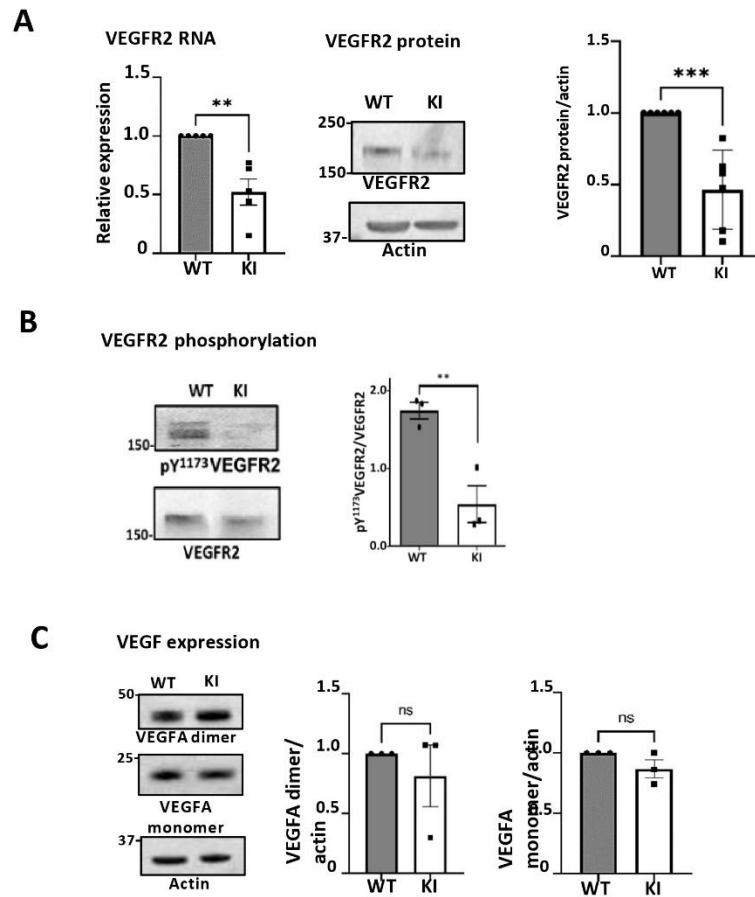


Figure 5: Effect of VE-cadherin mutation on VEGFR2 and VEGF expression. **A.** Expression of VEGFR2. RT-PCR analysis was performed from isolated EC RNA extract. VEGFR2 RNA expression level was expressed as the fold-change of WT after normalisation with hprt1. Immunoblots was performed from lung protein extract (30µg) and protein level was normalized with actin (n=5 mice per genotype). **B.** VEGFR2 phosphorylation was analyzed using the anti pY¹¹⁷⁵ antibody (30µg). **C.** Analysis of VEGFA dimer and monomer by Western blot (n=3 mice per genotype). All immunoblots were carried with 30 µg of total proteins and protein level was normalized with actin. Molecular mass standards (in kDa) are shown at left. All analysis of the relative expression of the protein were measured by densitometry of autoradiographs using Image-J software (NIH, Bethesda, MD). Statistical analysis performed by Student's t-test, (***, p-value<0.001. (*p-value<0.05). Non significant ns)

FIGURE 6

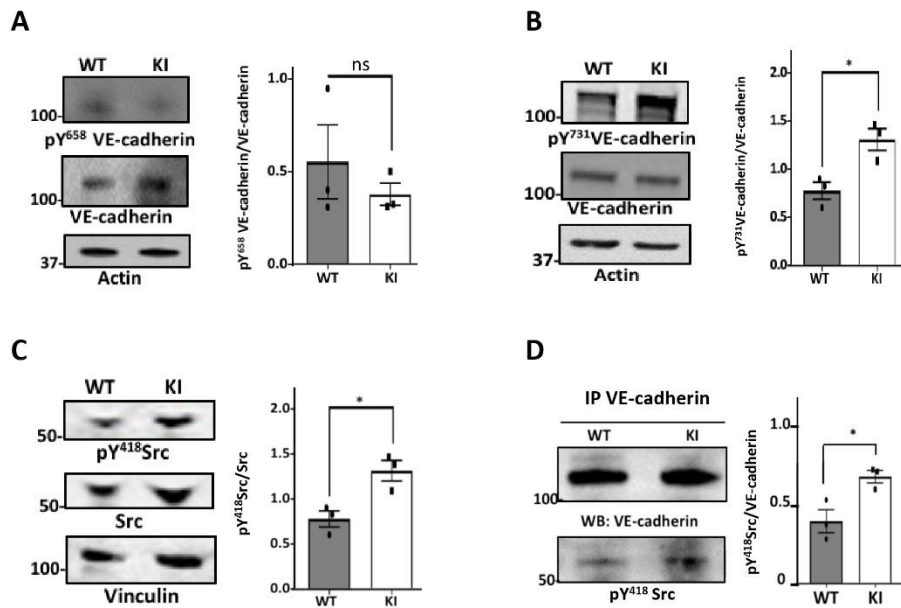


Figure 6: VE-cadherin mutant is phosphorylated at site Y⁷³¹ and is associated with active Src. **A.** Western Blot analysis of pY⁶⁵⁸ VE-cadherin and VE-cadherin in WT and KI using 30 μ g of protein lung extracts. Actin was used as loading control (n=3 independent experiments). **B.** Western Blot analysis of pY⁷³¹VE-cadherin in WT and KI using 30 μ g of lung extracts. Actin was used as loading control (n=3 mice per genotype). **C.** Western blot analysis of pY⁴¹⁸Src and Src were performed using 5 μ g of protein extracts from the isolated ECs from WT and KI mice. Vinculin was used as loading control (n=3 mice per genotype). Molecular mass standards (in kDa) are shown at left. Statistical analysis was performed using Mann-Whitney test (***)p-value<0.001) as described in Methods. All analysis of the relative expression of the proteins was measured by densitometry of autoradiographs using Image-J software (NIH, Bethesda, MD). All bar graphs were mean \pm SEM. Statistical analysis were performed using Student t-test (*p-value<0.05).

FIGURE 7

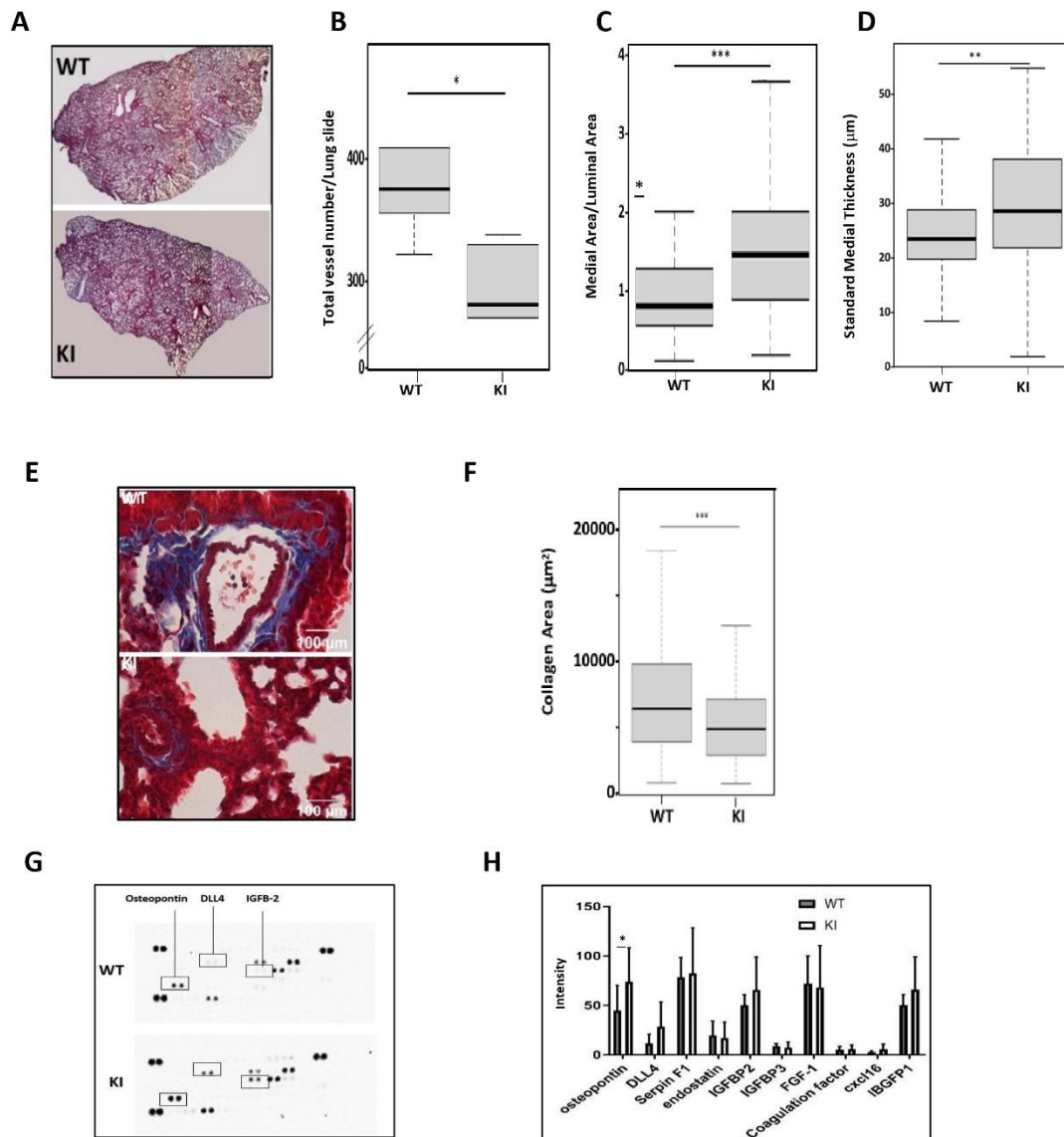


Figure 7. *In vivo* analysis of histological and morphometric evidence of thickened pulmonary arteries in the mutant and WT mouse : **A.** H&E from lung paraffin sections were used to count small pulmonary arteries of comparable diameter (75-150 μm). Images are representative of 4 mice per genotype. **B.** Medial area over luminal area ratio shows an increase in KI mice. **C.** Morphometric evidence of thickened, remodeled small pulmonary arteries. Standard medial thickness was calculated as the ratio of medial area to inner circumference. **D.** Representative histological profiles of paraffin-embedded lung sections stained haematoxylin-eosin and Masson's trichrome in WT and KI showing marked medial thickening of smaller pulmonary arteries from KI mouse vs WT mouse. Magnification (x40), scale bar 100μm. Images are representative of 4 mice per genotype. **E,F.** Collagen fibrils stained with Masson trichrome's were quantified using Image-J software (NIH, Bethesda, MD). Statistical analysis was performed using Mann-Whitney test (**p-value<0.001). **G.** « Mouse Angiogenesis Array » in the BAL fluid was performed according to the manufacturer's instructions. The same amount of proteins was applied onto the membranes. The relative intensity of the array spots between the two genotypes were quantified using Image-J software (NIH, Bethesda, MD). (n=4 mice per genotype). All bar graphs showed mean ± SEM.

DISCUSSION

VE-cadherin is well known as the major regulator of endothelium integrity and we found the protein highly phosphorylated on Y685 in human glioblastoma compared to normal tissue (6). Knowing the importance of the angiogenesis in cerebral tumoral tissues, we have previously published a tyrosine-->phenylalanine (Y-->F) point mutation (Y685F) within the cytoplasmic domain of VE-cadherin in a mouse to get insights in tyrosine phosphorylation of interendothelial junctions (15). We took advantage of this mouse model to analyze the global profiling of transcript (transcriptomics) based on our central hypothesis that beta-catenin will no longer bind to mutated VE-cadherin and will translocate to the nucleus, where it acts as a transcriptional activator (19). Our data demonstrate for the first time that a single point mutation in VE-cadherin cytoplasmic domain (Y⁶⁸⁵F) deregulated the gene expressions in lung ECs (15). It is noteworthy that the site of phosphorylation Y⁶⁸⁵ fitted the YxxV/I/L motif which was a consensus sequence for Src family kinases (12,13).

PROPERTIES OF ECs:

First of all, we isolated ECs from lung as VE-cadherin expression in the lung was greater than in other tissues (11). The vascularization of the lungs is mostly composed of capillary ECs which is a significant component of the alveolar-capillary membrane, a thin tissue barrier responsible for gas exchange between alveolar air and the pulmonary circulation (1,60,61). ECs from both mice exhibited a high level of VE-cadherin as determined by RT-PCR and immunofluorescence which is in agreement with our previously published data indicating that in KI mice, VE-cadherin was expressed to the same extent than in WT animals (15). To further characterize the ECs from lung, we determined their angiogenic functions. We demonstrated that the EC from KI had a slower rate of migration, both in the wound assay and in the fibrin beads assay, but they exhibited increased adhesion properties to extracellular matrix likely through integrin receptors (49). Cadherin-mediated adhesion also directly initiates both mechanical and biochemical signals known to affect focal adhesion formation. The focal adhesion kinase (FAK) is a tyrosine kinase that is involved in the assembly of focal adhesions and thereby promotes cell spreading on the extracellular matrix and its autophosphorylation site reflects its activity (62). Whether or not FAK is phosphorylated at site Y³⁹⁷ is still under investigation. Taken together, the single mutation of VE-cadherin demonstrate that the pulmonary ECs harboured significant structural modifications specifically involved in angiogenesis.

TRANSCRIPTOMIC ANALYSIS:

To obtain a deeper understanding of the mutation of VE-cadherin on the endothelium, we took the opportunity of this mouse model to perform for the first time a transcriptomic study of lung ECs from 4 weeks-old male mice. Diversity in EC functions have been recognized for decades (63,64). Because VE-cadherin is expressed in all the ECs, the RNA-seq analysis might be different depending in the organs. Accordingly, it is interesting to note that more than 800 genes were modified in lung which was not the case for the kidney (not shown). In agreement with this, it might be part of the specificity of the lung endothelium functions that are altered in lung diseases such as acute respiratory distress syndrome (ARDS), pulmonary fibrosis (PF), and chronic obstructive pulmonary disease (COPD) although to different degrees, indicating disease-specific mechanisms. In normal physiological conditions, ECs modulate vascular tone, provide barrier integrity, and regulate the entry of immune cells and circulating inflammatory mediators. Endothelial cell-cell junctions maintain the integrity of the pulmonary barrier and mutation at a single tyrosine site of VE-cadherin is inert to activate a specific cellular response, and gene expressions. Several studies have been reported using knock-in mice in which the cytoplasmic tyrosine of a receptor has been replaced with phenylalanine (65). Hence, further studies will be needed to understand how these gene expressions can be modified “only” by the mutation of one tyrosine in VE-cadherin as it is rare that the substitution of a single tyrosine causes such changes.

The most specific endothelial transcription program that we found was related to cell adhesion and angiogenesis. Our data were coherent with gene expression profiles which revealed a panel of differentially expressed cell adhesion molecules that contribute to enhanced cell–cell adhesion in microvascular cells (65). Several evidences have established that the pulmonary microvascular endothelium is much less permeable than in other organs (66,67). Cultured rat pulmonary microvascular ECs demonstrate reduced basal and inflammatory-mediated permeability to solutes. The retention of site-specific differences in permeability in multiply passaged ECs might explain these differences. Pulmonary micro- and macrovascular ECs demonstrate significant cell type–specific differences in DNA methylation pattern. In contrast, ECs in the bronchial vasculature are more leaky, are more responsive to inflammation, and have a far greater capacity for angiogenesis compared with ECs from the pulmonary vasculature (68,69).

Within the sets of genes found to be upregulated in the KI mice, we focused on S1PR1 as VE-cadherin was shown to be a target of S1P in cultured ECs (70). In addition, S1PR1 was described to inhibit VEGF-dependent vascular sprouting by a mechanism dependent on VE-cadherin function (70,71). Moreover, VE-cadherin is a critical mediator of S1PR1 function in angiogenic retina (56,71).

Our data reveal heretofore undescribed mechanisms regarding a VE-cadherin mutation Y⁶⁸⁵F which affects tissue-specific vascular network specialization as the demonstration of expression of S1PR1 at the adult stage in the lungs is important for vessel stabilization. β -catenin which is a major binding partner of VE-cadherin has an important role in activating complexes with transcription factors (19). Since β -catenin does not possess a DNA binding domain, it requires DNA binding partners to bind to the promoters of its target genes including FOXF1 (72). FOXF1 has been shown to be highly expressed in quiescent adult lungs. Moreover, FOXF1 was shown to be decreased in ECs within human idiopathic pulmonary fibrosis and endothelial-specific FOXF1 inhibition in mice was found to increase collagen depositions (73). These data are consistent with a role of the pulmonary microenvironment on the modulation of ECs behavior in adult lung vessels.

SIGNALING PATHWAYS

Among the different signaling pathways driven by the VE-cadherin mutation, we focused our interest on the VEGF-VEGF-R2 pathway as it is involved in VE-cadherin phosphorylation (6,13). Our RNA-sequencing analysis showed a downregulation of VEGFR2 (VEGFR2 -1.77, p-value=0.00845) which was confirmed at the RNA level and the protein level and was in agreement with the overexpression of S1PR1 (70). The cross talk between a seven-transmembrane-domain G-protein coupled receptor (S1PR1) and a growth factor receptor with tyrosine kinase activity (VEGFR2) might need further studies to determine if such pathways are involved in some of the abnormalities of tumor blood vasculature (74). To date five major autophosphorylation sites within VEGFR-2 have been studied in the past years. Y⁹⁵¹ lies in the kinase insert domain, Y¹⁰⁵⁴ and Y¹⁰⁵⁹ are in the kinase domain, whereas Y¹¹⁷⁵ (Y¹¹⁷³ in mouse) and Y¹²¹⁴ are in the C-terminal portion of the receptor (75). As a result, we found that VEGFR2 protein was decreased in KI mice as well as the phosphorylation on Y¹¹⁷³, which strongly suggest an impaired migration process (75), which was in agreement with our results on primary ECs in culture. Meanwhile, VEGF was unchanged thus any VEGF-mediated effect can be partially impaired because of the down regulation of VEGFR2 expression in ECs.

Although it was demonstrated that quiescent endothelium do not expressed any phosphorylated proteins of adherens junctions *in vitro* (18), in our mouse model *in vivo* the lung endothelium expressed pY⁷³¹VE-cadherin more predominantly in KI ECs. These results are in agreement with our previous published results in mice showing that the level of tyrosine phosphorylated proteins was higher in the lung than in other organs (11). Whether it is important for maintaining integrity of the capillary network remain to be explore. Indeed, the pulmonary endothelium is only separated from the alveolar space by a layer of extracellular matrix and an

epithelial cytoplasm each around 0.1 mm thick (68,69). Thus the subtle regulation of cell-cell adhesion is likely under VEGF which expression at a basal level is particularly high in the lungs (30). As a consequence, the tyrosine kinase c-Src is always predominantly active in ECs from adult lung leading to phosphorylation of Y⁶⁵⁸ and Y⁷³¹-VE-cadherin. In VE-cadherin mutant, VE-cadherin is still phosphorylated at site Y⁷³¹ which **disrupt its ability to bind β -catenin** (52). As the Y⁷³¹ site is unique to VE-cadherin when compared to other cadherins, it may suggest an endothelium-specific mechanism of regulation of transcription in specific disease like the pathogenesis of lung fibrosis such as idiopathic pulmonary fibrosis. Our study was performed on ECs from 4-week-adult mice and we demonstrated a reduction in vascular density with larger and thicker vessels, and an decrease in collagen deposit in the lung of KI mice. Further studies on this mouse model would be required to better understand the treatment of fibrosis as endothelial dysfunction is not completely understood in fibrosis (73).

CONCLUDING REMARKS:

We demonstrated that, using a particular knock-in model Y685F-VE-cadherin, the transcriptome of lung ECs related to the phosphorylation of VE-cadherin is largely modified. Given the different signaling pathways that are linked to cell-cell adhesion and angiogenesis, we focused on *S1pr1* gene for two reasons: the first one is that VE-cadherin phosphorylation was showed by our laboratory in very aggressive and angiogenic tumors (human glioblastoma) and the second one is because this gene is known to stabilize the vascular endothelium. In most tumors, vessels have abnormalities resulting in tortuous capillary network. The epigenetic reprogramming of ECs due to the phosphorylation of the VE-cadherin might open up new therapeutic avenues to better understand ways of increasing the accessibility of drug treatments.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are indebted to: Soumalama Bama-Toupet, Charlène Magallon and Hervé Pointu for their technical assistance in the animal facilities, Aude Salomon and Violaine Simon for their excellent technical expertise, Véronique Colin-Faure as the IRIG flow cytometry platform manager and we thank her for excellent technical support for cell sorting, Frédéric Sergent and Nicolas Lemaitre for their technical expertise regarding immunohistochemistry of lungs, Frédérique Mitler and Frédérique Kermarrec-Marcel for their advices in immunoblot and PCR, Patricia Obeid for her expertise in image quantifications, Mylène Pezet from the Optimal Platform, and Dr Eva Faurobert for their expertise in primary cell culture. We thank Dr Saporano for excellent technical advices for CHIP assays.

SOURCE OF FUNDING

This work was supported by the French National Institute of Health and Medical Research INSERM the French Atomic Energy and Alternative Energies Commission (CEA), Fundamental Research Division/Interdisciplinary Research Institute of Grenoble/Department of Health/Biosciences et Bioingénierie pour la Santé (BGE) (UMRS 13), Ligue Nationale contre Le Cancer (Comité Savoie), Federation Nationale des Centres de Lutte contre le Cancer (GEFLUC Grenoble-Dauphiné-Savoie). Olivia GARNIER received funding from Grenoble Alliance for Integrated Structural & Cell Biology Foundation (GRAL), a program from the Chemistry Biology Health (CBH) Graduate School of University Grenoble Alpes (ANR-17-EURE-0003). All the project received funding from GRAL, a program from the Chemistry Biology Health (CBH) Graduate School of University Grenoble Alpes (ANR-17-EURE-0003)

SUPPLEMENTARY INFORMATION

Transcriptomic profiling and pathway analysis of mouse lung microvascular endothelial cells with Y685F VE-cadherin knock-in

Olivia GARNIER¹, Florian JEANNERET², Aude DURAND³, Arnold FERTIN⁴, Donald MARTIN⁴, Sarah BERNDT⁵, Gilles CARPENTIER⁶, Christophe BATTAIL², Isabelle VILGRAIN¹

- 7) Univ. Grenoble Alpes, INSERM U13, CEA, Institute of Interdisciplinary Research of Grenoble (IRIG), Laboratory of Biosciences et Bioingénierie pour la santé (BGE)-Biomics, 38000 Grenoble, France .
- 8) Univ. Grenoble Alpes, INSERM U13, CEA, Institute of Interdisciplinary Research of Grenoble (IRIG), Laboratory of Biosciences et Bioingénierie pour la santé (BGE)-BIOMICS, 38000 Grenoble, France .
- 9) LETI-DTBS-LSMB CEA Grenoble
- 10) Univ. Grenoble Alpes, CNRS, TIMC-IMAG - UMR 5525, 38000 Grenoble, France.
- 11) School of Pharmaceutical Sciences, Université de Genève, Rue Michel Servet 1, 1211, Geneva, 4, Switzerland
- 12) Gly-CRRET Research Unit 4397, Université Paris-Est Créteil, 61 avenue du général de Gaulle, 94010, Créteil, France

Running title: VE-cadherin mutation drives S1PR1 expression

Key words: Gene expression, Endothelial cells, VE-cadherin, protein phosphorylations, tyrosine kinases, S1PR1 .

To whom correspondence should be addressed :

Dr Isabelle VILGRAIN

Univ. Grenoble Alpes, INSERM U13, CEA, Institute of Interdisciplinary Research of Grenoble (IRIG),
Laboratory of Biosciences et Bioingénierie pour la Santé (BGE)-BIOMICS, 38054-Grenoble Cedex,
France

E-mail : isabelle.vilgrain@cea.fr

SUPPLEMENTARY METHOD

Chromatin immunoprecipitation assay (ChIP)

The ChIP protocol was kindly given by Dr Marco Saporano (J. Wang et al. 2021). 4 weeks mouse was sacrificed. Mouse lungs were harvested immediately and placed in cold PBS (Ca-/Mg-) . Immersed tissues were shredded using scalpel into small pieces and digested with 4 ml of collagenase I (3mg/ml) in DMEM (4.5g/L Glucose) with no serum at 37°C for 45 min. Every 15 minutes, the tube was shaken to improve the collagenase I activity. The digestion is stopped by adding an equal volume of DMEM (4.5g/L Glucose) with 20% FBS: the complete medium. The cells suspension was pass through a 10 ml syringe with a 18G needle to avoid clump. Then the minced tissue was passed through several filters: 100, 70µm filters and centrifuged at 1200 rpm for 5 minutes. The supernatant was carefully removed and resuspended in PBS1X. Formaldehyde was added to 1% final concentration and incubated in rotation at room temperature for 15 minutes. Glycine (125mM) was immediately added and followed by 5 minutes incubation at room temperature under agitation. The solution was centrifuged 2 minutes at 14000 rpm and washed twice with ice-cold PBS1X 2 minutes at 14000 rpm. Cells were lysed with ChIP cell lysis buffer: 5mM HEPES pH 8.0, 85mM KCl, 0.5% NP-40 and leupeptinine (10µg/ml), orthovanadate sodium (2mM), and incubated 5 minutes on ice. Solution was centrifuged 5 minutes at 3900xg at 4°C to obtain nuclei pellet. The supernatant was discarded. The nuclei were lysed with ChIP nuclear lysis buffer: 50mM Tris-HCl pH 8.1, 10mM EDTA (pH 8.0), 1% SDS + leupeptinine (10µg/ml) and orthovanadate sodium (2mM) and incubated 5 minutes on ice. Nuclear lysate was sheared by using an ice-water bath embedded sonication system at high power, 30 seconds on, 30 seconds off mode for 10 minutes. Sonicated chromatin was cleared by centrifugation at 20,000g for 10' at 4 °C. Chromatin was diluted 1:5 with ChIP dilution buffer: 0.01% SDS, 1.1% Triton X-100, 1.2mM EDTA (pH 8.0), 16.7mM Tris-HCl pH 8.1, 167mM NaCl + leupeptinine (10µg/ml) and orthovanadate sodium (2mM). The sample was cleared with 30µl of Sepharose beads G for 30 minutes under agitation at 4°C. Then following by centrifugation at 6000 rpm 2 minutes at 4°C. The supernatant was transferred into a new tube and 2.5µg of FOXF1 antibody was added overnight at 4°C under agitation. Sepharose beads G were added into the tubes and incubated 3h at 4°C under agitation. Washes are performed sequentially, doing them two times with 1ml of each of the following buffers: ChIP low salt buffer: 0.1% SDS, 1% Triton X-100, 2mM EDTA, 20mM Tris-HCl pH 8.1, 150mM NaCl. ChIP high salt buffer: 0.1% SDS, 1% Triton X-100, 2mM EDTA, 20mM Tris-HCl pH 8.1, 500mM NaCl. ChIP LiCl buffer: 10mM Tris-HCl pH 8.0, 250mM LiCl, 1%NP40, 1% deoxycholic acid and 1mM EDTA. A final wash was made with TE buffer (pH=8) and centrifuged at 3000rpm for 3 minutes. The pellet was resuspended in 40µl elution buffer (50mM TrisHCl pH 8.0, 10mM EDTA, 1%SDS) with RNase 10mg/ml. Incubation overnight at 65°C. The sample was centrifuged 1 minute at 12000rpm and the supernatant was transferred into a fresh tube where 120µl TE/1%SDS was added with proteinase K (20mg/ml) and glycogen (10mg/ml) whereas the pellet were resuspended in laemmli 2X for western blot analysis. The chromatin solution was incubated for 2 hours at 37°C. An exact equal volume of Phenol/Chloroform/Isoamilalchol 25:24:1 pH 8.0 was added and mixed by inverting the tube until the phases are completely mixed. Then, the tube was centrifuged at 12000 rpm 5 minutes and the upper layer was collected into a new tube where ethanol 100% and 5M NaCl were added. The sample was stored at -20°C for 1 hour. It was centrifuged again 10 minutes at 12000 rpm. The pellet was resuspended in ethanol 70% and centrifuged 10 minutes 1200 rpm. The supernatant was retrieved as the pellet let completely dry before adding TE buffer and go for PCR and qRT-PCR.

Lung wet-to-dry weight ratio:

The lungs were weighed immediately after removal (wet weight) and again after drying in an oven at 60 °C for 72 h (dry weight). The lung wet-to-dry weight ratio was calculated as the ratio of wet weight to dry weight. Lung wet-to-dry weight ratio was used as an index of pulmonary edema formation.

SUPPLEMENTARY TABLE

Supplementary Table1:List of primers sequence in mouse

qPCR	
Alpha-SMA	
Forward	CAGCCATCTTTCATTGGGATG
Reverse	TGGTACCCCCTGACAGGAC
CD31	
Forward	GGAAGTGTCCCTCCCTTGAGC
Reverse	GCCTTCCGTTCTTAGGGTCG
Cdh5	
Forward	CACGGACAAGATCAGCTCCT
Reverse	GGTAGCATGTTGGGGGTGTC
Hprt1	
Forward	TGGATACAGGCCAGACTTTGTT
Reverse	CAAACGTGATTCAAATCCCTGAAGT
Ptprc	
Forward	GAGAATGCCCTTCTTCTGCC
Reverse	GCGTGGATAACACACCTGG
S1pr1	
Forward	TTGAGCGAGGCTGCTGTTTC
Reverse	GGGGTGGTATTTCTCCAGGC
Vegfr2	
Forward	CTAGGCGCCTGCACCAAGCC
Reverse	CTTGCCCTGGCGGAAGCGTG
ChIP	
FOXF1 binding site on promoter -5141/-4815 bp	
Forward	TGTGGCATCCTTGCCTTCC
Reverse	GAGTCACACCACAGCTCCTC

SUPPLEMENTARY RESULTS

Isolation of lung ECs.

The mice used in this study were referred as to wild type (WT) and the knock-in mouse carrying a tyrosine-to phenylalanine point mutation of VE-cadherin Y⁶⁸⁵ (KI). Thus, the ECs were isolated from the lungs of both genotypes. We studied ECs from mice lung to avoid the structural, phenotypic, and functional heterogeneity of ECs depending on the tissue (1). Moreover, we previously published that the murine lung had the highest expression of VE-cadherin compared to other organs (Lambeng et al. 2005). The cells were isolated using flow cytometry after collagenase dissociation and single-cell suspensions staining for surface antigens (CD31 and CD 45 labelling). CD31 is a uniform marker of ECs resistant to collagenase treatment. The percentage of ECs was calculated using light scatter and fluorescence characteristics. The antibody to CD31 recognized a distinct population (Fig.S1A), whereas cells incubated with non immune rat immunoglobulins harboured background staining (Neg). The percentages of CD31-positive cells in lung tissues were highly reproducible; variations were found to be less than 5% of the mean over three independent measurements for one lung. Representative examples of flow cytometry analyses of cells from lungs are shown in Fig.S1A. We then examined whether cell surface endothelial markers (Cdh5, and CD31) were expressed in ECs using RT-PCR analysis. cDNA templates synthesized from RNA preparations from mouse were amplified using the oligonucleotide primers described in Table 1. *α-SMA*, and *Ptprc* were used to determine the non-purified fraction (NP). As shown in Fig.S1B, the relative expression of Cdh5 and CD31 was significantly higher in ECs than in the NP. We then assessed the purity of ECs after several days in primary culture using the immunofluorescence of VE-cadherin. The cells showed the cobblestone appearance typical of cultured EC and expressed VE-cadherin at the cell surface which confirmed the homogeneity of the isolated cells (Fig. S1C).

SUPPLEMENTARY FIGURES

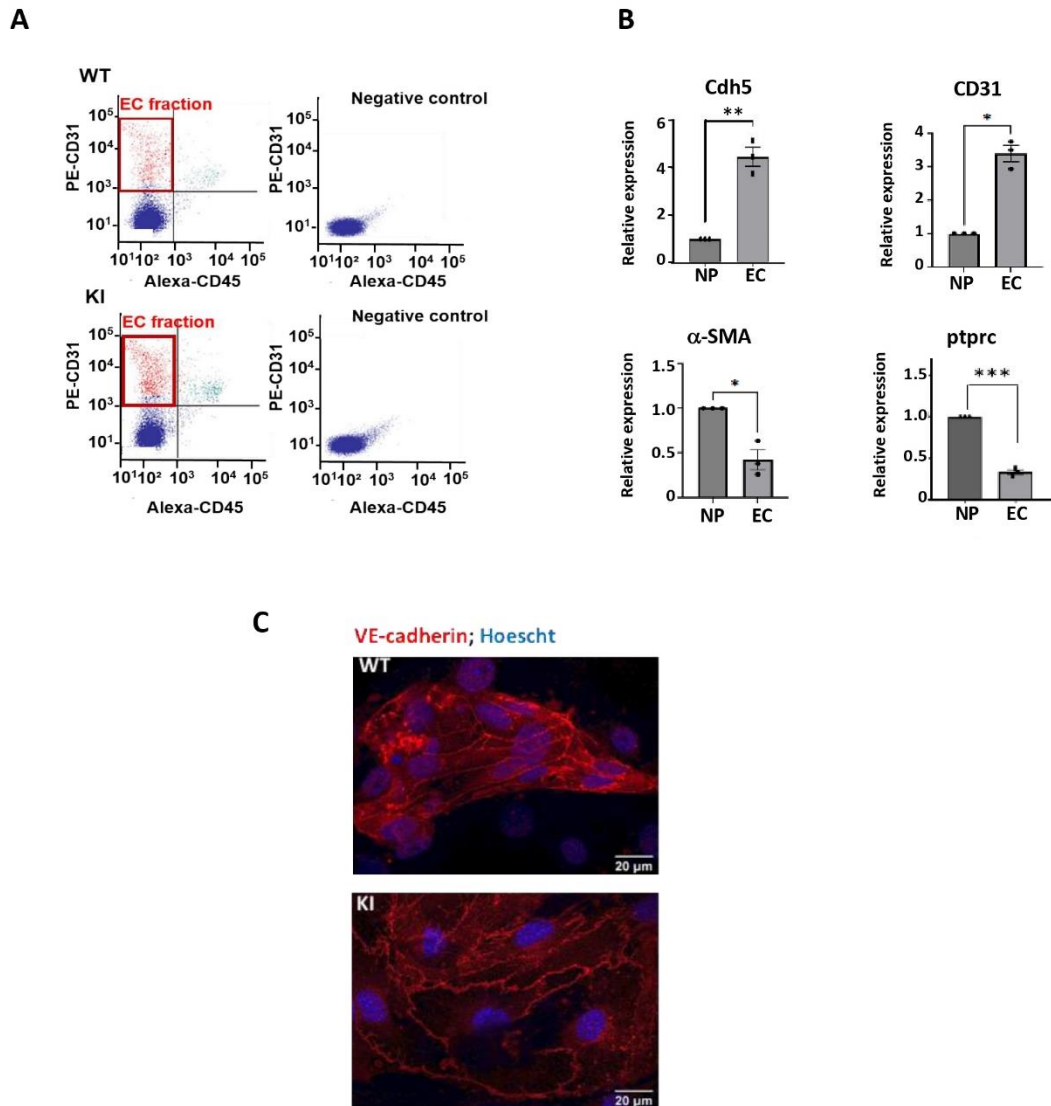


Figure S1: Characterization of Lung Endothelial Cells (ECs) from mutant (KI) and wild type (WT) mouse. **A.** Representative sorting of EC using fluorescent activated cell sorter (FACS). Mouse cells were stained with PE-CD31 and Alexa488-CD45. The ECs population are represented in red (88.3%), the immune cells (0.02%) and the other cell types (11.40%) are in blue. **B.** Representative levels of several endothelial markers validate the purity of the isolated ECs. Total RNA was reverse-transcribed and amplified using exponential non saturating conditions with specific oligonucleotides for Cdh5, and CD31. PCR products were separated on ethidium bromide-stained 2.5% agarose gel. α -SMA, and ptpcr were used for non-purified fraction. The markers were expressed according fold-change to the non-purified fraction (NP) after normalization with hprt1. (n=3 mice per genotype). Statistical significance was calculated by Student's t-test (*p-value<0.05). **C.** Immunofluorescence of VE-cadherin in the isolated ECs. Nuclei were stained with Hoescht (blue). The slides were imaged with the Axio Imager M2 Zeiss microscope (magnification X63).

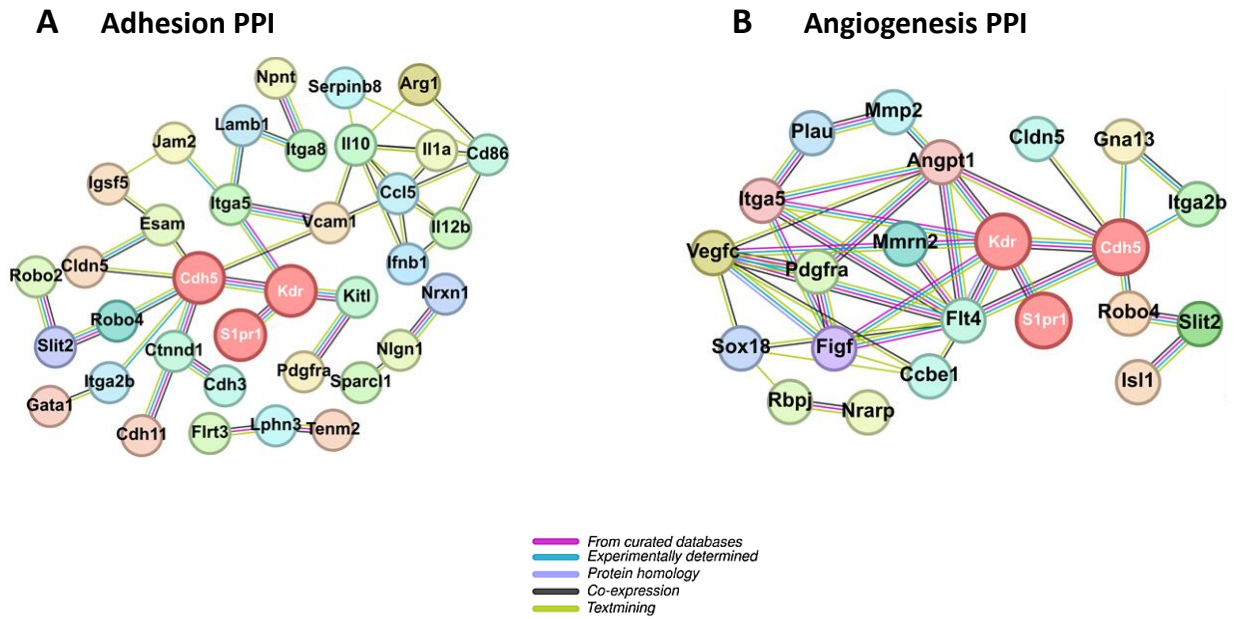


Figure S2: Deregulated gene-gene interaction network analysis between WT and KI.
A. Deregulated gene-gene interaction network analysis involved in cell–cell adhesion. **B.** Deregulated protein-protein interaction network of DEGs involved in angiogenesis. Analysis was performed using String software. Cdh5 is encircled. The thickness of the line between two genes is correlated with the strength of data support.

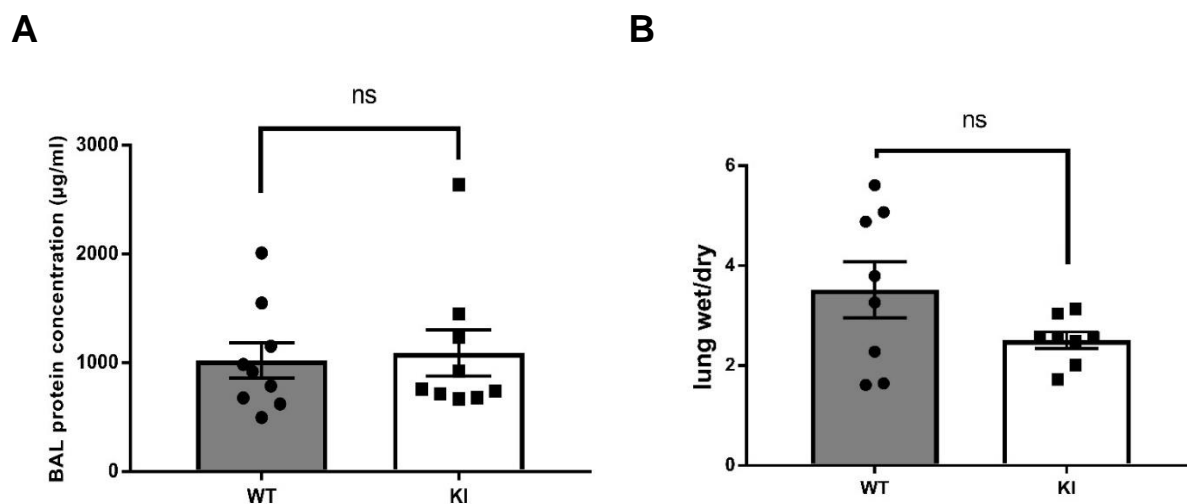


Figure S3. *In vivo* analysis of BAL concentration and edema formation. A. Protein concentration from the BAL fluid was quantified by BCA dosage. No significant (ns) difference was observed between the WT and the KI. **B.** Lung wet-to-dry weight ratio as a sign of the pulmonary edema was calculated. No significant (ns) difference was observed (n=8 mice per genotype). Student T test was used to assess statistical significance. All bar graphs showed mean \pm SEM.

SUPPLEMENTARY REFERENCES

- Ahmadi, Mahdi, et Jafar Rezaie. 2020. « Tumor Cells Derived-exosomes as Angiogenic Agents: possible therapeutic implications ». *Journal of Translational Medicine*.
- Ahn, Joong Bae et al. 2010. « Circulating Endothelial Progenitor Cells (EPC) for Tumor Vasculogenesis in Gastric Cancer Patients ». *Cancer Letters* 288(1): 124-32.
- Aird, William C. 2007. « Phenotypic Heterogeneity of the Endothelium ». *Circulation Research* 100(2): 158-73.
- Alitalo, Kari, Tuomas Tammela, et Tatiana V. Petrova. 2005. « Lymphangiogenesis in Development and Human Disease ». *Nature* 438(7070): 946-53.
- Allingham, Michael J., Jaap D. van Buul, et Keith Burridge. 2007. « ICAM-1-Mediated, Src- and Pyk2-Dependent Vascular Endothelial Cadherin Tyrosine Phosphorylation Is Required for Leukocyte Transendothelial Migration ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 179(6): 4053-64.

- Alonso, Florian, François-Xavier Boittin, Jean-Louis Béný, et Jacques-Antoine Haefliger. 2010. « Loss of Connexin40 Is Associated with Decreased Endothelium-Dependent Relaxations and ENOS Levels in the Mouse Aorta ». *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 299(5): H1365-1373.
- Angst, Brigitt D., Cristiana Marcozzi, et Anthony I. Magee. 2001. « The cadherin superfamily: diversity in form and function ». *Journal of Cell Science* 114(4): 629-41.
- Apte, Rajendra S., Daniel S. Chen, et Napoleone Ferrara. 2019. « VEGF in Signaling and Disease: Beyond Discovery and Development ». *Cell* 176(6): 1248-64.
- Arif, Nida et al. 2021a. « PECAM-1 supports leukocyte diapedesis by tension-dependent dephosphorylation of VE-cadherin ». *The EMBO Journal* 40(9): e106113.
- . 2021b. « PECAM-1 Supports Leukocyte Diapedesis by Tension-Dependent Dephosphorylation of VE-Cadherin ». *The EMBO journal* 40(9): e106113.
- Balaji Ragunathrao, Vijay Avin et al. 2019. « Sphingosine-1-Phosphate Receptor 1 Activity Promotes Tumor Growth by Amplifying VEGF-VEGFR2 Angiogenic Signaling ». *Cell Reports* 29(11): 3472-3487.e4.
- Barber, Alistair J., et David A. Antonetti. 2003. « Mapping the Blood Vessels with Paracellular Permeability in the Retinas of Diabetic Rats ». *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 44(12): 5410-16.
- Bates, David O. et al. 2002. « VEGF165b, an Inhibitory Splice Variant of Vascular Endothelial Growth Factor, Is down-Regulated in Renal Cell Carcinoma ». *Cancer Research* 62(14): 4123-31.
- Baumeister, Ulf et al. 2005. « Association of Csk to VE-cadherin and inhibition of cell proliferation ». *The EMBO Journal* 24(9): 1686-95.
- Bazzoni, Gianfranco, et Elisabetta Dejana. 2004. « Endothelial Cell-to-Cell Junctions: Molecular Organization and Role in Vascular Homeostasis ». *Physiological Reviews* 84(3): 869-901.
- Beckmann, Taylor et al. 2022. « Strategizing Drug Therapies in Pulmonary Hypertension for Improved Outcomes ». *Pharmaceuticals* 15(10): 1242.
- Bentley, Katie et al. 2014. « The Role of Differential VE-Cadherin Dynamics in Cell Rearrangement during Angiogenesis ». *Nature Cell Biology* 16(4): 309-21.
- Bergmann, Olaf et al. 2015. « Dynamics of Cell Generation and Turnover in the Human Heart ». *Cell* 161(7): 1566-75.
- Bern, Lungenliga Schweiz, 3007. « Poumons et voies respiratoires - Ligue pulmonaire Suisse ». <https://www.liguepulmonaire.ch/fr/preserver-les-poumons/connaissances/poumons-et-voies-respiratoires.html> (8 août 2023).
- Bessaguet, Flavien, Daniel Henrion, et Alexis Desmoulière. 2022. « Organisation générale des vaisseaux sanguins ». *Actualités Pharmaceutiques* 61(619): 53-56.
- Betsholtz, Christer. 2018. « Cell–cell signaling in blood vessel development and function ». *EMBO Molecular Medicine* 10(3): e8610.

- Bian, Fenghua et al. 2023. « Lung Endothelial Cells Regulate Pulmonary Fibrosis through FOXF1/R-Ras Signaling ». *Nature Communications* 14(1): 2560.
- Bien-Möller, Sandra et al. 2023. « The Putative S1PR1 Modulator ACT-209905 Impairs Growth and Migration of Glioblastoma Cells In Vitro ». *Cancers* 15(17): 4273.
- « Biomolecules | Free Full-Text | New Insights into the Alveolar Epithelium as a Driver of Acute Respiratory Distress Syndrome ». <https://www.mdpi.com/2218-273X/12/9/1273> (8 août 2023).
- Bonizol Camasao, Dimitria, et Diego Mantovani. 2021. « The mechanical characterization of blood vessels and their substitutes in the continuous quest for physiological-relevant performances. A critical review ». *Materials Today Bio* 10: 100106.
- Borek, Izabela et al. 2023. « The Vascular Perspective on Acute and Chronic Lung Disease ». *The Journal of Clinical Investigation* 133(16). <https://www.jci.org/articles/view/170502> (5 septembre 2023).
- Brasch, Julia et al. 2011. « Structure and binding mechanism of vascular endothelial cadherin, a divergent classical cadherin ». *Journal of molecular biology* 408(1): 57-73.
- Broermann, Andre et al. 2011. « Dissociation of VE-PTP from VE-Cadherin Is Required for Leukocyte Extravasation and for VEGF-Induced Vascular Permeability in Vivo ». *The Journal of Experimental Medicine* 208(12): 2393-2401.
- Bryant, Annie et al. 2023. « Endothelial Cells Are Heterogeneous in Different Brain Regions and Are Dramatically Altered in Alzheimer's Disease ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 43(24): 4541-57.
- Buschmann, Ivo et al. 2010. « Pulsatile Shear and Gja5 Modulate Arterial Identity and Remodeling Events during Flow-Driven Arteriogenesis ». *Development (Cambridge, England)* 137(13): 2187-96.
- Cai, Yuqi et al. 2016a. « FOXF1 Maintains Endothelial Barrier Function and Prevents Edema after Lung Injury ». *Science Signaling* 9(424): ra40.
- . 2016b. « FOXF1 maintains endothelial barrier function and prevents edema after lung injury ». *Science Signaling* 9(424): ra40-ra40.
- Cao, Jian et al. 2011. « Lentiviral-Human Heme Oxygenase Targeting Endothelium Improved Vascular Function in Angiotensin II Animal Model of Hypertension ». *Human Gene Therapy* 22(3): 271-82.
- Cao, Zhongwei et al. 2016. « Targeting of the Pulmonary Capillary Vascular Niche Promotes Lung Alveolar Repair and Ameliorates Fibrosis ». *Nature Medicine* 22(2): 154-62.
- Cerutti, Camilla, et Anne Ridley. 2017. « Endothelial cell-cell adhesion and signaling ». *Experimental Cell Research* 358.
- Chadjichristos, C. E. et al. 2010. « Endothelial-Specific Deletion of Connexin40 Promotes Atherosclerosis by Increasing CD73-Dependent Leukocyte Adhesion ». *Circulation* 121(1): 123-31.

- Chen, Chiu-Yu et al. 2012. « Blood Flow Reprograms Lymphatic Vessels to Blood Vessels ». *The Journal of Clinical Investigation* 122(6): 2006-17.
- Chen, Hongliu et al. 2022. « Selexipag Improves Lipopolysaccharide-Induced ARDS on C57BL/6 Mice by Modulating the CAMP/PKA and CAMP/Epac1 Signaling Pathways ». *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 45(8): 1043-52.
- Chervin-Pétinot, Adeline et al. 2012. « Epithelial Protein Lost In Neoplasm (EPLIN) Interacts with α -Catenin and Actin Filaments in Endothelial Cells and Stabilizes Vascular Capillary Network in Vitro ». *The Journal of Biological Chemistry* 287(10): 7556-72.
- Chung, Jihwa et al. 2019. « Coxsackievirus and Adenovirus Receptor Mediates the Responses of Endothelial Cells to Fluid Shear Stress ». *Experimental & Molecular Medicine* 51(11): 1-15.
- « Classification & Structure of Blood Vessels | SEER Training ». <https://training.seer.cancer.gov/anatomy/cardiovascular/blood/classification.html> (16 août 2023).
- Cohen, C. J. et al. 2001. « The Coxsackievirus and Adenovirus Receptor Is a Transmembrane Component of the Tight Junction ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98(26): 15191-96.
- Coon, Brian G. et al. 2015. « Intramembrane binding of VE-cadherin to VEGFR2 and VEGFR3 assembles the endothelial mechanosensory complex ». *The Journal of Cell Biology* 208(7): 975-86.
- Corada, Monica et al. 1999. « Vascular endothelial-cadherin is an important determinant of microvascular integrity in vivo ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96(17): 9815-20.
- . 2013. « Sox17 is indispensable for acquisition and maintenance of arterial identity ». *Nature Communications* 4: 2609.
- Cusack, Rachael, Lieuwe D. Bos, Pedro Povoas, et Ignacio Martin-Loeches. 2023. « Endothelial dysfunction triggers acute respiratory distress syndrome in patients with sepsis: a narrative review ». *Frontiers in Medicine* 10. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmed.2023.1203827> (12 novembre 2023).
- Dent, Rebecca et al. 2007. « Triple-Negative Breast Cancer: Clinical Features and Patterns of Recurrence ». *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 13(15 Pt 1): 4429-34.
- Derouette, Jean-Paul et al. 2009. « Molecular Role of Cx37 in Advanced Atherosclerosis: A Micro-Array Study ». *Atherosclerosis* 206(1): 69-76.
- Derycke, L. et al. 2006. « Soluble N-Cadherin Fragment Promotes Angiogenesis ». *Clinical & Experimental Metastasis* 23(3-4): 187-201.
- Dudley, Andrew C., et Arjan W. Griffioen. 2023. « Pathological angiogenesis: mechanisms and therapeutic strategies ». *Angiogenesis* 26(3): 313-47.

- Duong, Cao Nguyen et al. 2020. « Interference With ESAM (Endothelial Cell-Selective Adhesion Molecule) Plus Vascular Endothelial-Cadherin Causes Immediate Lethality and Lung-Specific Blood Coagulation ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 40(2): 378-93.
- Duong, Cao Nguyen, et Dietmar Vestweber. 2020. « Mechanisms Ensuring Endothelial Junction Integrity Beyond VE-Cadherin ». *Frontiers in Physiology* 11.
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphys.2020.00519> (21 août 2023).
- Eriksson, Einar E. et al. 2005. « Powerful Inflammatory Properties of Large Vein Endothelium In Vivo ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 25(4): 723-28.
- Eswarappa, Sandeepa M. et al. 2014. « Programmed Translational Readthrough Generates Antiangiogenic VEGF-Ax ». *Cell* 157(7): 1605-18.
- Failla, Cristina M., Miriam Carbo, et Veronica Morea. 2018. « Positive and Negative Regulation of Angiogenesis by Soluble Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1 ». *International Journal of Molecular Sciences* 19(5): 1306.
- Fantin, Alessandro et al. 2013. « NRP1 Acts Cell Autonomously in Endothelium to Promote Tip Cell Function during Sprouting Angiogenesis ». *Blood* 121(12): 2352-62.
- Féléto, Michel, et Paul M. Vanhoutte. 2006. « Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor: Where Are We Now? ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 26(6): 1215-25.
- Ferrara, Napoleone, et Anthony P. Adamis. 2016. « Ten Years of Anti-Vascular Endothelial Growth Factor Therapy ». *Nature Reviews Drug Discovery* 15(6): 385-403.
- Freeman, Brandi D., Fabiana S. Machado, Herbert B. Tanowitz, et Mahalia S. Desruisseaux. 2014. « Endothelin-1 and its role in the pathogenesis of infectious diseases ». *Life sciences* 118(2): 110-19.
- Fukuhara, Atsunori et al. 2002. « Involvement of Nectin in the Localization of Junctional Adhesion Molecule at Tight Junctions ». *Oncogene* 21(50): 7642-55.
- Furuse, M. et al. 1993. « Occludin: A Novel Integral Membrane Protein Localizing at Tight Junctions ». *The Journal of Cell Biology* 123(6 Pt 2): 1777-88.
- Gaengel, Konstantin et al. 2012. « The Sphingosine-1-Phosphate Receptor S1PR1 Restricts Sprouting Angiogenesis by Regulating the Interplay between VE-Cadherin and VEGFR2 ». *Developmental Cell* 23(3): 587-99.
- Galley, H. F., et N. R. Webster. 2004a. « Physiology of the endothelium ». *British Journal of Anaesthesia* 93(1): 105-13.
- . 2004b. « Physiology of the endothelium ». *British Journal of Anaesthesia* 93(1): 105-13.
- Gamble, Jennifer R. et al. 2000. « Angiopoietin-1 Is an Antipermeability and Anti-Inflammatory Agent In Vitro and Targets Cell Junctions ». *Circulation Research* 87(7): 603-7.
- Garnier, Olivia, et Isabelle Vilgrain. 2023. « Dialogue between VE-Cadherin and Sphingosine 1 Phosphate Receptor1 (S1PR1) for Protecting Endothelial Functions ». *International Journal of Molecular Sciences* 24(4): 4018.

- Gavard, Julie. 2014. « Endothelial permeability and VE-cadherin ». *Cell Adhesion & Migration* 8(2): 158-64.
- Gavard, Julie, et J. Silvio Gutkind. 2006. « VEGF Controls Endothelial-Cell Permeability by Promoting the β -Arrestin-Dependent Endocytosis of VE-Cadherin ». *Nature Cell Biology* 8(11): 1223-34.
- Gebb, Sarah, et Troy Stevens. 2004. « On lung endothelial cell heterogeneity ». *Microvascular Research* 68(1): 1-12.
- Gerhardt, Holger et al. 2003. « VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia ». *The Journal of Cell Biology* 161(6): 1163-77.
- Giampietro, Costanza et al. 2015. « The actin-binding protein EPS8 binds VE-cadherin and modulates YAP localization and signaling ». *Journal of Cell Biology* 211(6): 1177-92.
- Gillich, Astrid et al. 2020. « Capillary Cell-Type Specialization in the Alveolus ». *Nature* 586(7831): 785-89.
- Gimbrone, M. A. 1987. « Vascular Endothelium: Nature's Blood-Compatible Container ». *Annals of the New York Academy of Sciences* 516: 5-11.
- Girard, Jean-Philippe, et Timothy A. Springer. 1995. « High endothelial venules (HEVs): specialized endothelium for lymphocyte migration ». *Immunology Today* 16(9): 449-57.
- Giri, Hemant et al. 2021. « Thrombomodulin Is Essential for Maintaining Quiescence in Vascular Endothelial Cells ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 118(11): e2022248118.
- Godwin, Luke, Muhammad Ali Tariq, et Jonathan S. Crane. 2023. « Histology, Capillary ». In *StatPearls*, Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK546578/> (16 août 2023).
- Gong, Haixia et al. 2014. « Evidence of a common mechanism of disassembly of adherens junctions through G α 13 targeting of VE-cadherin ». *The Journal of Experimental Medicine* 211(3): 579-91.
- Gordon, Emma J. et al. 2016. « The Endothelial Adaptor Molecule TSA α Is Required for VEGF-Induced Angiogenic Sprouting through Junctional c-Src Activation ». *Science Signaling* 9(437): ra72.
- Gory-Fauré, S. et al. 1999. « Role of Vascular Endothelial-Cadherin in Vascular Morphogenesis ». *Development (Cambridge, England)* 126(10): 2093-2102.
- Guo, Xiaohua et al. 2020. « Focal adhesion kinase and Src mediate microvascular hyperpermeability caused by fibrinogen- γ C- terminal fragments ». *PLoS ONE* 15(4): e0231739.
- Harper, Steven J., et David O. Bates. 2008. « VEGF-A splicing ». *Nature reviews. Cancer* 8(11): 880-87.
- Hayashi, Makoto et al. 2013. « VE-PTP regulates VEGFR2 activity in stalk cells to establish endothelial cell polarity and lumen formation ». *Nature Communications* 4: 1672.
- He, Liqun et al. 2018. « Single-Cell RNA Sequencing of Mouse Brain and Lung Vascular and Vessel-Associated Cell Types ». *Scientific Data* 5(1): 180160.

- He, ZhengYu, YeSen Zhu, et Hong Jiang. 2009. « Toll-like Receptor 4 Mediates Lipopolysaccharide-Induced Collagen Secretion by Phosphoinositide3-Kinase-Akt Pathway in Fibroblasts during Acute Lung Injury ». *Journal of Receptor and Signal Transduction Research* 29(2): 119-25.
- Heathcote, Helen R. et al. 2019. « Endothelial TRPV4 Channels Modulate Vascular Tone by Ca²⁺ - Induced Ca²⁺ Release at Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptors ». *British Journal of Pharmacology* 176(17): 3297-3317.
- Hellström, Mats et al. 2007. « Dll4 Signalling through Notch1 Regulates Formation of Tip Cells during Angiogenesis ». *Nature* 445(7129): 776-80.
- Hendrix, Mary J. C. et al. 2001. « Expression and functional significance of VE-cadherin in aggressive human melanoma cells: Role in vasculogenic mimicry ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98(14): 8018-23.
- Herold, Susanne, Konstantin Mayer, et Juergen Lohmeyer. 2011. « Acute Lung Injury: How Macrophages Orchestrate Resolution of Inflammation and Tissue Repair ». *Frontiers in Immunology* 2. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2011.00065> (15 août 2023).
- Herron, Crystal R. et al. 2011. « p120 regulates endothelial permeability independently of its NH₂ terminus and Rho binding ». *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 300(1): H36-48.
- Hirase, T. et al. 1997. « Occludin as a Possible Determinant of Tight Junction Permeability in Endothelial Cells ». *Journal of Cell Science* 110 (Pt 14): 1603-13.
- Hla, Timothy, Krishnan Venkataraman, et Jason Michaud. 2008. « The vascular S1P gradient—Cellular sources and biological significance ». *Biochimica et biophysica acta* 1781(9): 477-82.
- Houck, K.A. et al. 1992. « Dual Regulation of Vascular Endothelial Growth Factor Bioavailability by Genetic and Proteolytic Mechanisms. » *Journal of Biological Chemistry* 267(36): 26031-37.
- Hu, Guochang, Aaron T. Place, et Richard D. Minshall. 2008. « Regulation of Endothelial Permeability by Src Kinase Signaling ». *Chemico-biological interactions* 171(2): 177-89.
- Huertas, Alice et al. 2018. « Pulmonary Vascular Endothelium: The Orchestra Conductor in Respiratory Diseases: Highlights from Basic Research to Therapy ». *European Respiratory Journal* 51(4). <https://erj.ersjournals.com/content/51/4/1700745> (24 juillet 2023).
- Hussain, Bilal et al. 2022. « High endothelial venules as potential gateways for therapeutics ». *Trends in Immunology* 43(9): 728-40.
- Hussell, Tracy, et Thomas J. Bell. 2014. « Alveolar Macrophages: Plasticity in a Tissue-Specific Context ». *Nature Reviews Immunology* 14(2): 81-93.
- Jakobsson, Lars et al. 2010. « Endothelial Cells Dynamically Compete for the Tip Cell Position during Angiogenic Sprouting ». *Nature Cell Biology* 12(10): 943-53.
- Jambusaria, Ankit et al. 2020. « Endothelial heterogeneity across distinct vascular beds during homeostasis and inflammation » éd. Anna Akhmanova. *eLife* 9: e51413.

- Jin, Yi et al. 2022. « Tyrosine-Protein Kinase Yes Controls Endothelial Junctional Plasticity and Barrier Integrity by Regulating VE-Cadherin Phosphorylation and Endocytosis ». *Nature Cardiovascular Research* 1(12): 1156-73.
- Johnson-Léger, Caroline A. et al. 2002. « Junctional adhesion molecule-2 (JAM-2) promotes lymphocyte transendothelial migration ». *Blood* 100(7): 2479-86.
- Jouda, Hatem, Luis Murillo, et Tao Wang. 2022. « Current Progress in Vascular Engineering and Its Clinical Applications ». *Cells* 11: 493.
- Juettner, Vanessa V. et al. 2019. « VE-PTP stabilizes VE-cadherin junctions and the endothelial barrier via a phosphatase-independent mechanism ». *Journal of Cell Biology* 218(5): 1725-42.
- Kalucka, Joanna et al. 2020. « Single-Cell Transcriptome Atlas of Murine Endothelial Cells ». *Cell* 180(4): 764-779.e20.
- Katoh, Masaru. 2018. « Multi-layered prevention and treatment of chronic inflammation, organ fibrosis and cancer associated with canonical WNT/ β -catenin signaling activation (Review) ». *International Journal of Molecular Medicine* 42(2): 713-25.
- Kibria, G, D Heath, P Smith, et R Biggar. 1980. « Pulmonary endothelial pavement patterns. » *Thorax* 35(3): 186-91.
- Kioi, Mitomu et al. 2010. « Inhibition of Vasculogenesis, but Not Angiogenesis, Prevents the Recurrence of Glioblastoma after Irradiation in Mice ». *The Journal of Clinical Investigation* 120(3): 694.
- Klomp, Jennifer E. et al. 2019. « Time variant SRC kinase activation determines endothelial permeability response ». *Cell chemical biology* 26(8): 1081-1094.e6.
- Kobielak, Agnieszka, et Elaine Fuchs. 2004. « α -CATENIN: AT THE JUNCTION OF INTERCELLULAR ADHESION AND ACTIN DYNAMICS ». *Nature reviews. Molecular cell biology* 5(8): 614-25.
- Krüger-Genge, Anne, Anna Blocki, Ralf-Peter Franke, et Friedrich Jung. 2019. « Vascular Endothelial Cell Biology: An Update ». *International Journal of Molecular Sciences* 20(18): 4411.
- Ku, Yun Hyi et al. 2017. « Rosiglitazone increases endothelial cell migration and vascular permeability through Akt phosphorylation ». *BMC Pharmacology and Toxicology* 18(1): 62.
- Kuwabara, H. et al. 2001. « Occludin Regulates Actin Cytoskeleton in Endothelial Cells ». *Cell Structure and Function* 26(2): 109-16.
- Lambeng, Nathalie et al. 2005. « Vascular Endothelial-Cadherin Tyrosine Phosphorylation in Angiogenic and Quiescent Adult Tissues ». *Circulation Research* 96(3): 384-91.
- Lampugnani, Maria Grazia et al. 2003. « Contact inhibition of VEGF-induced proliferation requires vascular endothelial cadherin, β -catenin, and the phosphatase DEP-1/CD148 ». *The Journal of Cell Biology* 161(4): 793-804.
- Lampugnani, Maria Grazia, Elisabetta Dejana, et Costanza Giampietro. 2018. « Vascular Endothelial (VE)-Cadherin, Endothelial Adherens Junctions, and Vascular Disease ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 10(10): a029322.

- Laroche, Fabrice J. F. et al. 2023. « S1P1 Threonine 236 Phosphorylation Mediates the Invasiveness of Triple-Negative Breast Cancer and Sensitivity to FTY720 ». *Cells* 12(7): 980.
- Lau, Skadi, Manfred Gossen, Andreas Lendlein, et Friedrich Jung. 2021. « Venous and Arterial Endothelial Cells from Human Umbilical Cords: Potential Cell Sources for Cardiovascular Research ». *International Journal of Molecular Sciences* 22(2): 978.
- Leach, Heather G., Izabela Chrobak, Rong Han, et Maria Trojanowska. 2013. « Endothelial Cells Recruit Macrophages and Contribute to a Fibrotic Milieu in Bleomycin Lung Injury ». *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 49(6): 1093-1101.
- Lebok, Patrick et al. 2016. « Loss of Membranous VEGFR1 Expression Is Associated with an Adverse Phenotype and Shortened Survival in Breast Cancer ». *Molecular Medicine Reports* 14(2): 1443-50.
- Lee, Chunsik et al. 2023. « VEGF-B prevents excessive angiogenesis by inhibiting FGF2/FGFR1 pathway ». *Signal Transduction and Targeted Therapy* 8: 305.
- « Les poumons - Cancer du poumon ». <https://www.e-cancer.fr/Patients-et-proches/Les-cancers/Cancer-du-poumon/Les-poumons> (7 août 2023).
- Li, Min, Kurt R. Stenmark, Robin Shandas, et Wei Tan. 2009. « Effects of Pathological Flow on Pulmonary Artery Endothelial Production of Vasoactive Mediators and Growth Factors ». *Journal of Vascular Research* 46(6): 561-71.
- Li, Yanyang et al. 2023. « Activation of Angiopoietin-Tie2 Signaling Protects the Kidney from Ischemic Injury by Modulation of Endothelial-Specific Pathways ». *Journal of the American Society of Nephrology* 34(6): 969.
- Li, Yi-Xuan et al. 2022. « Targeting pulmonary vascular endothelial cells for the treatment of respiratory diseases ». *Frontiers in Pharmacology* 13: 983816.
- Liu, Fei et al. 2010. « Feedback Amplification of Fibrosis through Matrix Stiffening and COX-2 Suppression ». *The Journal of Cell Biology* 190(4): 693-706.
- Liu, Liangliang et al. 2021. « Role of Transient Receptor Potential Vanilloid 4 in Vascular Function ». *Frontiers in Molecular Biosciences* 8: 677661.
- Liu, Longbin et al. 2018. « Angiotensin II inhibits the protein expression of ZO-1 in vascular endothelial cells by downregulating VE-cadherin ». *Molecular Medicine Reports* 18(1): 429-34.
- Lobov, I. B. et al. 2007. « Delta-like Ligand 4 (Dll4) Is Induced by VEGF as a Negative Regulator of Angiogenic Sprouting ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104(9): 3219-24.
- Ludwig, Ralf J et al. 2009. « Junctional adhesion molecule (JAM)-B supports lymphocyte rolling and adhesion through interaction with $\alpha 4\beta 1$ integrin ». *Immunology* 128(2): 196-205.
- Lugano, Roberta, Mohanraj Ramachandran, et Anna Dimberg. 2020. « Tumor Angiogenesis: Causes, Consequences, Challenges and Opportunities ». *Cellular and Molecular Life Sciences* 77(9): 1745-70.

- Luissint, Anny-Claude, Asma Nusrat, et Charles A. Parkos. 2014. « JAM-Related Proteins in Mucosal Homeostasis and Inflammation ». *Seminars in Immunopathology* 36(2): 211-26.
- Malekian, Saba et al. 2020. « Expression of Diverse Angiogenesis Factor in Different Stages of the 4T1 Tumor as a Mouse Model of Triple-Negative Breast Cancer ». *Advanced Pharmaceutical Bulletin* 10(2): 323-28.
- Maniatis, Nikolaos A., Anastasia Kotanidou, John D. Catravas, et Stylianos E. Orfanos. 2008. « Endothelial pathomechanisms in acute lung injury ». *Vascular Pharmacology* 49(4): 119-33.
- Martin, Marcy et al. « Role of endothelial cells in pulmonary fibrosis via SREBP2 activation ». *JCI Insight* 6(22): e125635.
- Martin-Padura, I. et al. 1998. « Junctional Adhesion Molecule, a Novel Member of the Immunoglobulin Superfamily That Distributes at Intercellular Junctions and Modulates Monocyte Transmigration ». *The Journal of Cell Biology* 142(1): 117-27.
- Maynard, Sharon E. et al. 2003. « Excess Placental Soluble Fms-like Tyrosine Kinase 1 (sFlt1) May Contribute to Endothelial Dysfunction, Hypertension, and Proteinuria in Preeclampsia ». *The Journal of Clinical Investigation* 111(5): 649-58.
- Medina-Leyte, Diana Jhoseline et al. 2021. « Endothelial Dysfunction, Inflammation and Coronary Artery Disease: Potential Biomarkers and Promising Therapeutical Approaches ». *International Journal of Molecular Sciences* 22(8): 3850.
- Meyer, Marlene et al. 1999. « A novel vascular endothelial growth factor encoded by Orf virus, VEGF-E, mediates angiogenesis via signalling through VEGFR-2 (KDR) but not VEGFR-1 (Flt-1) receptor tyrosine kinases ». *The EMBO Journal* 18(2): 363-74.
- Milutinovic, Stefan, et Awen Gallimore. 2023. « The link between T cell activation and development of functionally useful tumour-associated high endothelial venules ». *Discovery Immunology* 2(1): kyad006.
- Mochizuki, Seiichi et al. 2003. « Role of hyaluronic acid glycosaminoglycans in shear-induced endothelium-derived nitric oxide release ». *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 285(2): H722-26.
- Morini, Marco F. et al. 2018. « VE-Cadherin–Mediated Epigenetic Regulation of Endothelial Gene Expression ». *Circulation Research* 122(2): 231-45.
- Nan, Weijin, Yuxi He, Shurong Wang, et Yan Zhang. 2023. « Molecular Mechanism of VE-Cadherin in Regulating Endothelial Cell Behaviour during Angiogenesis ». *Frontiers in Physiology* 14. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10433914/> (23 août 2023).
- Navarro, Pilar, Luigi Ruco, et Elisabetta Dejana. 1998. « Differential Localization of VE- and N-Cadherins in Human Endothelial Cells: VE-Cadherin Competes with N-Cadherin for Junctional Localization ». *The Journal of Cell Biology* 140(6): 1475-84.
- Neto, Filipa et al. « YAP and TAZ regulate adherens junction dynamics and endothelial cell distribution during vascular development ». *eLife* 7: e31037.
- Neubauer, Katharina, et Barbara Zieger. 2022. « Endothelial Cells and Coagulation ». *Cell and Tissue Research* 387(3): 391-98.

- Ng, Hooi, Lee Alvin, Che-Nan Kuo, et Yu-Fang Shen. 2018. « Bioprinting of artificial blood vessels ». *International Journal of Bioprinting* 4.
- Ni, Wentao et al. 2020. « Role of angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) in COVID-19 ». *Critical Care* 24(1): 422.
- Nieset, Jill E. et al. 1997. « Characterization of the interactions of α -catenin with α -actinin and β -catenin/plakoglobin ». *Journal of Cell Science* 110(8): 1013-22.
- Niethamer, Terren K et al. 2020. « Defining the role of pulmonary endothelial cell heterogeneity in the response to acute lung injury » éd. Gordana Vunjak-Novakovic et Didier YR Stainier. *eLife* 9: e53072.
- Nishio, Kazumi et al. 1998. « Differential Contribution of Various Adhesion Molecules to Leukocyte Kinetics in Pulmonary Microvessels of Hyperoxia-exposed Rat Lungs ». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 157(2): 599-609.
- Noda, Kazuomi et al. 2010. « Vascular Endothelial-Cadherin Stabilizes at Cell–Cell Junctions by Anchoring to Circumferential Actin Bundles through α - and β -Catenins in Cyclic AMP-Epac-Rap1 Signal-activated Endothelial Cells ». *Molecular Biology of the Cell* 21(4): 584-96.
- Nolan, Daniel J. et al. 2013. « Molecular Signatures of Tissue-Specific Microvascular Endothelial Cell Heterogeneity in Organ Maintenance and Regeneration ». *Developmental Cell* 26(2): 204-19.
- Nottebaum, Astrid F. et al. 2008. « VE-PTP Maintains the Endothelial Barrier via Plakoglobin and Becomes Dissociated from VE-Cadherin by Leukocytes and by VEGF ». *The Journal of Experimental Medicine* 205(12): 2929-45.
- Nova, Zuzana, Henrieta Skovierova, et Andrea Calkovska. 2019a. « Alveolar-Capillary Membrane-Related Pulmonary Cells as a Target in Endotoxin-Induced Acute Lung Injury ». *International Journal of Molecular Sciences* 20(4): 831.
- . 2019b. « Alveolar-Capillary Membrane-Related Pulmonary Cells as a Target in Endotoxin-Induced Acute Lung Injury ». *International Journal of Molecular Sciences* 20(4): 831.
- Nwariaku, Fiemu E. et al. 2002. « Tyrosine Phosphorylation of Vascular Endothelial Cadherin and the Regulation of Microvascular Permeability ». *Surgery* 132(2): 180-85.
- Okamoto, Takayuki, et Koji Suzuki. 2017. « The Role of Gap Junction-Mediated Endothelial Cell–Cell Interaction in the Crosstalk between Inflammation and Blood Coagulation ». *International Journal of Molecular Sciences* 18(11): 2254.
- Orsenigo, Fabrizio et al. 2012. « Phosphorylation of VE-cadherin is modulated by haemodynamic forces and contributes to the regulation of vascular permeability in vivo ». *Nature Communications* 3: 1208.
- Ortiz, Maria A. et al. 2021. « Src family kinases, adaptor proteins and the actin cytoskeleton in epithelial-to-mesenchymal transition ». *Cell Communication and Signaling* 19(1): 67.
- Park, J E et al. 1994. « Placenta growth factor. Potentiation of vascular endothelial growth factor bioactivity, in vitro and in vivo, and high affinity binding to Flt-1 but not to Flk-1/KDR. » *Journal of Biological Chemistry* 269(41): 25646-54.

- Patan, S., L. L. Munn, et R. K. Jain. 1996. « Intussusceptive Microvascular Growth in a Human Colon Adenocarcinoma Xenograft: A Novel Mechanism of Tumor Angiogenesis ». *Microvascular Research* 51(2): 260-72.
- Pearson, J. D., J. S. Carleton, et J. L. Gordon. 1980. « Metabolism of Adenine Nucleotides by Ectoenzymes of Vascular Endothelial and Smooth-Muscle Cells in Culture ». *The Biochemical Journal* 190(2): 421-29.
- Pérez-Gutiérrez, Lorena, et Napoleone Ferrara. 2023. « Biology and Therapeutic Targeting of Vascular Endothelial Growth Factor A ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology*: 1-19.
- Polena, Helena et al. 2018. « The tyrosine-kinase inhibitor sunitinib targets vascular endothelial (VE)-cadherin: a marker of response to antitumoural treatment in metastatic renal cell carcinoma ». *British Journal of Cancer* 118(9): 1179-88.
- Polverino, Francesca, Bartolome R. Celli, et Caroline A. Owen. 2018. « COPD as an endothelial disorder: endothelial injury linking lesions in the lungs and other organs? (2017 Grover Conference Series) ». *Pulmonary Circulation* 8(1): 2045894018758528.
- Potente, Michael, et Taija Mäkinen. 2017. « Vascular Heterogeneity and Specialization in Development and Disease ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 18(8): 477-94.
- Potter, Matthew D., Simone Barbero, et David A. Cheresh. 2005. « Tyrosine Phosphorylation of VE-Cadherin Prevents Binding of P120- and β -Catenin and Maintains the Cellular Mesenchymal State * ». *Journal of Biological Chemistry* 280(36): 31906-12.
- Rahimi, Nader. 2017. « Defenders and Challengers of Endothelial Barrier Function ». *Frontiers in Immunology* 8. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2017.01847> (7 septembre 2023).
- Redzic, Zoran. 2011. « Molecular biology of the blood-brain and the blood-cerebrospinal fluid barriers: similarities and differences ». *Fluids and Barriers of the CNS* 8(1): 3.
- Rehm, Kerstin, et Stefan Linder. 2017. « Drebrin's Role in the Maintenance of Endothelial Integrity ». In *Drebrin: From Structure and Function to Physiological and Pathological Roles*, Advances in Experimental Medicine and Biology, éd. Tomoaki Shirao et Yuko Sekino. Tokyo: Springer Japan, 347-60. https://doi.org/10.1007/978-4-431-56550-5_21 (22 août 2023).
- Reitsma, Sietze et al. 2007. « The endothelial glycocalyx: composition, functions, and visualization ». *Pflugers Archiv* 454(3): 345-59.
- « Review: Anatomy of the Lung | SEER Training ». <https://training.seer.cancer.gov/lung/anatomy/review.html> (7 août 2023).
- Reynolds, Albert B. 2007. « p120-catenin: past and present ». *Biochimica et biophysica acta* 1773(1): 2-7.
- Ribatti, Domenico et al. 2005. « Microvascular Density, Vascular Endothelial Growth Factor Immunoreactivity in Tumor Cells, Vessel Diameter and Intussusceptive Microvascular Growth in Primary Melanoma ». *Oncology Reports* 14(1): 81-84.

- Ricard, Nicolas et al. 2014. « Increased Pericyte Coverage Mediated by Endothelial-Derived Fibroblast Growth Factor-2 and Interleukin-6 Is a Source of Smooth Muscle-like Cells in Pulmonary Hypertension ». *Circulation* 129(15): 1586-97.
- Ricard, Nicolas, Sabine Bailly, Christophe Guignabert, et Michael Simons. 2021. « The quiescent endothelium: signalling pathways regulating organ-specific endothelial normalcy ». *Nature Reviews. Cardiology* 18(8): 565-80.
- Rocheffort, Pauline et al. 2017. « Soluble VE-Cadherin in Metastatic Breast Cancer: An Independent Prognostic Factor for Both Progression-Free Survival and Overall Survival ». *British Journal of Cancer* 116(3): 356-61.
- Rodor, Julie et al. 2022. « Single-cell RNA sequencing profiling of mouse endothelial cells in response to pulmonary arterial hypertension ». *Cardiovascular Research* 118(11): 2519-34.
- Ruddle, Nancy H. 2023. « Regulation, maintenance, and remodeling of high endothelial venules in homeostasis, inflammation, and cancer ». *Current Opinion in Physiology* 36: 100705.
- S, Sajeesh et al. 2022. « Stem Cell Based Approaches to Modulate the Matrix Milieu in Vascular Disorders ». *Frontiers in Cardiovascular Medicine* 9.
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcvm.2022.879977> (6 septembre 2023).
- Sabine, Amélie et al. 2015. « FOXC2 and Fluid Shear Stress Stabilize Postnatal Lymphatic Vasculature ». *The Journal of Clinical Investigation* 125(10): 3861-77.
- Sakurai, Yoshiko et al. 2005. « Essential role of Flk-1 (VEGF receptor 2) tyrosine residue 1173 in vasculogenesis in mice ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(4): 1076-81.
- Sandoo, Aamer et al. 2010. « The Endothelium and Its Role in Regulating Vascular Tone ». *The Open Cardiovascular Medicine Journal* 4: 302-12.
- Sfriso, Riccardo et al. 2018. « 3D Artificial Round Section Micro-Vessels to Investigate Endothelial Cells under Physiological Flow Conditions ». *Scientific Reports* 8(1): 5898.
- Sidibé, Adama et al. 2012. « Soluble VE-Cadherin in Rheumatoid Arthritis Patients Correlates with Disease Activity: Evidence for Tumor Necrosis Factor α -Induced VE-Cadherin Cleavage ». *Arthritis & Rheumatism* 64(1): 77-87.
- . 2014. « VE-cadherin Y685F knock-in mouse is sensitive to vascular permeability in recurrent angiogenic organs ». *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 307(3): H455-63.
- Sidibé, Adama, et Beat A. Imhof. 2014. « VE-Cadherin Phosphorylation Decides: Vascular Permeability or Diapedesis ». *Nature Immunology* 15(3): 215-17.
- Sluiters, Thijs J. et al. 2021. « Endothelial Barrier Function and Leukocyte Transmigration in Atherosclerosis ». *Biomedicine* 9(4): 328.
- Soker, Shay et al. 1998. « Neuropilin-1 Is Expressed by Endothelial and Tumor Cells as an Isoform-Specific Receptor for Vascular Endothelial Growth Factor ». *Cell* 92(6): 735-45.

- « Structure and Function of Blood Vessels | Anatomy and Physiology II ». <https://courses.lumenlearning.com/suny-ap2/chapter/structure-and-function-of-blood-vessels/> (16 août 2023).
- Sun, Zuyue et al. 2012. « VEGFR2 induces c-*Src* signaling and vascular permeability in vivo via the adaptor protein *TSA*d ». *The Journal of Experimental Medicine* 209(7): 1363-77.
- Tacconi, Carlotta et al. 2019. « Activation of the VEGFC/VEGFR3 Pathway Induces Tumor Immune Escape in Colorectal Cancer ». *Cancer Research* 79(16): 4196-4210.
- Taddei, Andrea et al. 2008. « Endothelial Adherens Junctions Control Tight Junctions by VE-Cadherin-Mediated Upregulation of Claudin-5 ». *Nature Cell Biology* 10(8): 923-34.
- Tammela, Tuomas et al. 2008. « Blocking VEGFR-3 Suppresses Angiogenic Sprouting and Vascular Network Formation ». *Nature* 454(7204): 656-60.
- Thurston, Gavin et al. 2000. « Angiopoietin-1 Protects the Adult Vasculature against Plasma Leakage ». *Nature Medicine* 6(4): 460-63.
- Timmerman, Ilse et al. 2012. « The tyrosine phosphatase SHP2 regulates recovery of endothelial adherens junctions through control of β -catenin phosphorylation ». *Molecular Biology of the Cell* 23(21): 4212-25.
- . 2015. « A local VE-cadherin and Trio-based signaling complex stabilizes endothelial junctions through Rac1 ». *Journal of Cell Science* 128(16): 3041-54.
- Tornavaca, Olga et al. 2015. « ZO-1 controls endothelial adherens junctions, cell–cell tension, angiogenesis, and barrier formation ». *The Journal of Cell Biology* 208(6): 821-38.
- Trow, Terence K., et Darren B. Taichman. 2009. « Endothelin receptor blockade in the management of pulmonary arterial hypertension: Selective and dual antagonism ». *Respiratory Medicine* 103(7): 951-62.
- Tsuji-Tamura, Kiyomi, et Minetaro Ogawa. 2018. « Morphology regulation in vascular endothelial cells ». *Inflammation and Regeneration* 38.
- Tuder, Rubin M. 2017. « Pulmonary Vascular Remodeling in Pulmonary Hypertension ». *Cell and tissue research* 367(3): 643-49.
- « Ultrastructure of developing alveoli. I. The role of the interstitial fibroblast - Vaccaro - 1978 - The Anatomical Record - Wiley Online Library ». <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ar.1091920402> (16 août 2023).
- Ushakumary, Mereena George, Matthew Riccetti, et Anne-Karina T. Perl. 2021. « Resident Interstitial Lung Fibroblasts and Their Role in Alveolar Stem Cell Niche Development, Homeostasis, Injury, and Regeneration ». *STEM CELLS Translational Medicine* 10(7): 1021-32.
- Vassiliou, Alice G., Anastasia Kotanidou, Ioanna Dimopoulou, et Stylianos E. Orfanos. 2020. « Endothelial Damage in Acute Respiratory Distress Syndrome ». *International Journal of Molecular Sciences* 21(22): 8793.

- Veerman, Krystle et al. 2019. « Single-Cell Analysis Reveals Heterogeneity of High Endothelial Venules and Different Regulation of Genes Controlling Lymphocyte Entry to Lymph Nodes ». *Cell Reports* 26(11): 3116-3131.e5.
- Vestweber, Dietmar. 2008. « VE-Cadherin ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 28(2): 223-32.
- . 2015. « How Leukocytes Cross the Vascular Endothelium ». *Nature Reviews Immunology* 15(11): 692-704.
- Vilgrain, Isabelle et al. 2013. « Evidence for Post-Translational Processing of Vascular Endothelial (VE)-Cadherin in Brain Tumors: Towards a Candidate Biomarker ». *PLoS ONE* 8(12): e80056.
- Villalba, Nuria, Sheon Baby, et Sarah Y. Yuan. 2021. « The Endothelial Glycocalyx as a Double-Edged Sword in Microvascular Homeostasis and Pathogenesis ». *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 9. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2021.711003> (6 septembre 2023).
- Vincent, Peter A., Kanyan Xiao, Kathleen M. Buckley, et Andrew P. Kowalczyk. 2004. « VE-cadherin: adhesion at arm's length ». *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 286(5): C987-97.
- Vukelic, Sasa, et Kathy K. Griendling. 2014. « Angiotensin II, from vasoconstrictor to growth factor: a paradigm shift ». *Circulation research* 114(5): 754-57.
- Wallez, Y. et al. 2007. « Src Kinase Phosphorylates Vascular Endothelial-Cadherin in Response to Vascular Endothelial Growth Factor: Identification of Tyrosine 685 as the Unique Target Site ». *Oncogene* 26(7): 1067-77.
- Wang, Jianming et al. 2021. « Persistence of RNA transcription during DNA replication delays duplication of transcription start sites until G2/M ». *Cell Reports* 34(7): 108759.
- Wang, Xinrong, Alfredo Maria Bove, Giuseppe Simone, et Binyun Ma. 2020. « Molecular Bases of VEGFR-2-Mediated Physiological Function and Pathological Role ». *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 8. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2020.599281> (30 août 2023).
- Weber, Christian, Line Fraemohs, et Elisabetta Dejana. 2007. « The Role of Junctional Adhesion Molecules in Vascular Inflammation ». *Nature Reviews Immunology* 7(6): 467-77.
- Weis, Sara, Jianhua Cui, Leo Barnes, et David Cheresh. 2004. « Endothelial barrier disruption by VEGF-mediated Src activity potentiates tumor cell extravasation and metastasis ». *Journal of Cell Biology* 167(2): 223-29.
- Weiss, Elisabeth E. et al. 1998. « Vinculin Is Part of the Cadherin–Catenin Junctional Complex: Complex Formation between α -Catenin and Vinculin ». *The Journal of Cell Biology* 141(3): 755-64.
- Wessel, Florian et al. 2014a. « Leukocyte Extravasation and Vascular Permeability Are Each Controlled in Vivo by Different Tyrosine Residues of VE-Cadherin ». *Nature Immunology* 15(3): 223-30.
- . 2014b. « Leukocyte Extravasation and Vascular Permeability Are Each Controlled in Vivo by Different Tyrosine Residues of VE-Cadherin ». *Nature Immunology* 15(3): 223-30.

- White, Eric S. 2015. « Lung Extracellular Matrix and Fibroblast Function ». *Annals of the American Thoracic Society* 12(Suppl 1): S30-33.
- Wilting, J. et al. 1996. « VEGF121 Induces Proliferation of Vascular Endothelial Cells and Expression of Flk-1 without Affecting Lymphatic Vessels of Chorioallantoic Membrane ». *Developmental Biology* 176(1): 76-85.
- Xiao, Kanyan et al. 2005. « p120-Catenin Regulates Clathrin-dependent Endocytosis of VE-Cadherin ». *Molecular Biology of the Cell* 16(11): 5141-51.
- Xiao, Zeshuai, Zhaohui Zhang, et Scott L. Diamond. 1997. « Shear stress induction of the endothelial nitric oxide synthase gene is calcium-dependent but not calcium-activated ». *Journal of Cellular Physiology* 171(2): 205-11.
- Xin, Hong, Cuiling Zhong, Eric Nudleman, et Napoleone Ferrara. 2016. « Evidence for Pro-Angiogenic Functions of VEGF-Ax ». *Cell* 167(1): 275-284.e6.
- Yamada, Soichiro et al. 2005. « Deconstructing the Cadherin-Catenin-Actin Complex ». *Cell* 123(5): 889-901.
- Zhang, Xuebin et al. 2023. « Adipsin alleviates cardiac microvascular injury in diabetic cardiomyopathy through Csk-dependent signaling mechanism ». *BMC Medicine* 21: 197.
- Zhang, Yihang, et Jiazhen Wang. 2023. « Cellular and Molecular Mechanisms in Idiopathic Pulmonary Fibrosis ». *Advances in Respiratory Medicine* 91(1): 26-48.
- Zhao, Jingling et al. 2015. « Angiotensin-1 Protects the Endothelial Cells Against Advanced Glycation End Product Injury by Strengthening Cell Junctions and Inhibiting Cell Apoptosis ». *Journal of Cellular Physiology* 230(8): 1895-1905.
- Zhao, Weiming, Lan Wang, Juntang Yang, et al. 2023. « Endothelial cell-derived MMP19 promotes pulmonary fibrosis by inducing E(nd)MT and monocyte infiltration ». *Cell Communication and Signaling* 21(1): 56.
- Zhao, Weiming, Lan Wang, Yaxuan Wang, et al. 2023. « Injured Endothelial Cell: A Risk Factor for Pulmonary Fibrosis ». *International Journal of Molecular Sciences* 24(10): 8749.
- Zhu, Xiaoxia, et Wen Zhou. 2015. « The Emerging Regulation of VEGFR-2 in Triple-Negative Breast Cancer ». *Frontiers in Endocrinology* 6.
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fendo.2015.00159> (8 septembre 2023).
- Zissel, G. et al. 2000. « Human Alveolar Epithelial Cells Type II Are Capable of Regulating T-Cell Activity ». *Journal of Investigative Medicine: The Official Publication of the American Federation for Clinical Research* 48(1): 66-75.

REFERENCES

1. Aird WC. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms. *Circ Res.* 2007 ;100(2):158-173. doi: 10.1161/01.RES.0000255691.76142.4a.
2. Grunewald M, Avraham I, Dor Y, Bachar-Lustig E, Itin A, Jung S, Chimenti S, Landsman L, Abramovitch R, Keshet E. VEGF-induced adult neovascularization: recruitment, retention, and role of accessory cells. *Cell.* 2006 ;124(1):175-89. doi: 10.1016/j.cell.2005.10.036.
3. Rafii S, Butler JM, Ding BS. Angiocrine functions of organ-specific endothelial cells. *Nature.* 2016;529:316–325. doi: 10.1038/nature17040.
4. Ferrara N, Houck KA, Jakeman LB, Winer J, Leung DW. The vascular endothelial growth factor family of polypeptides. *J Cell Biochem.* 1991;47(3):211-218;doi: 10.1002/jcb.240470305.
5. Polena H, Creuzet J, Dufies M, Sidibé A, Khalil-Mgharbel A, Salomon A, Deroux A, Quesada JL, Roelants C, Filhol O, Cochet C, Blanc E, Ferlay-Segura C, Borchiellini D, Ferrero JM, Escudier B, Négrier S, Pages G, Vilgrain I. The tyrosine-kinase inhibitor sunitinib targets vascular endothelial (VE)-cadherin: a marker of response to antitumoural treatment in metastatic renal cell carcinoma. *Br J Cancer.* 2018;118(9):1179-1188. doi: 10.1038/s41416-018-0054-5.
6. Vilgrain I, Sidibé A, Polena H, Cand F, Mannic T, Arboleas M, Boccard S, Baudet A, Gulino-Debrac D, Bouillet L, Quesada JL, Mendoza C, Lebas JF, Pelletier L, Berger F. Evidence for post-translational processing of vascular endothelial (VE)-cadherin in brain tumors: towards a candidate biomarker. *PLoS One.* 2013;8(12):e80056. doi: 10.1371/journal.pone.0080056.
7. Rochefort P, Chabaud S, Pierga JY, Tredan O, Brain E, Bidard FC, Schiffler C, Polena H, Khalil-Mgharbel A, Vilgrain I, Bachelot T. Soluble VE-cadherin in metastatic breast cancer: an independent prognostic factor for both progression-free survival and overall survival. *Br J Cancer.* 2017;116(3):356-361. doi: 10.1038/bjc.2016.427.
8. Breviario F, Caveda L, Corada M, Martin-Padura I, Navarro P, Golay J, Introna M, Gulino D, Lampugnani MG, Dejana E. Functional properties of human vascular endothelial cadherin (7B4/cadherin-5), an endothelium-specific cadherin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995; (8):1229-1239. doi: 10.1161/01.atv.15.8.1229.

- 9.** Kouklis P, Konstantoulaki M, Malik AB. VE-cadherin-induced Cdc42 signaling regulates formation of membrane protrusions in endothelial cells. *J Biol Chem.* 2003. 278: 16230–16236. doi: 10.1074/jbc.M212591200.
- 10.** Esser, S., Lampugnani, M. G., Corada, M., Dejana, E., Risau, W. *J. Cell Sci.* 1998;111, 1853–1865. doi: 10.1242/jcs.111.13.1853.
- 11.** Lambeng N, Wallez Y, Rampon C, Cand F, Christé G, Gulino-Debrac D, Vilgrain I, Huber P. Vascular endothelial-cadherin tyrosine phosphorylation in angiogenic and quiescent adult tissues. *Circ Res.* 2005 ;96(3):384-391.doi: 10.1161/01.RES.0000156652.99586.9f.
- 12.** Lindquist J, Simeoni L, Schraven B. Transmembrane adapters: attractants for cytoplasmic effectors. *Immunol Rev.* 2003;191: 165–182.doi: 10.1034/j.1600-065x.2003.00007.
- 13.** Wallez Y, Cand F, Cruzalegui F, Wernstedt C, Souchelnytskyi S, Vilgrain I, Huber P. Src kinase phosphorylates vascular endothelial-cadherin in response to vascular endothelial growth factor: identification of tyrosine 685 as the unique target site. *Oncogene.* 2007;26(7):1067-77. doi: 10.1038/sj.onc.1209855.
- 14.** Das S, Marsden PA. Angiogenesis in glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* 2013;369:1561–1563. doi: 10.1056/NEJMcibr1309402.
- 15.** Sidibé A, Polena H, Pernet-Gallay K, Razanajatovo J, Mannic T, Chaumontel N, Bama S, Maréchal I, Huber P, Gulino-Debrac D, Bouillet L, Vilgrain I. VE-cadherin Y685F knock-in mouse is sensitive to vascular permeability in recurrent angiogenic organs. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2014;307(3):H455-63. doi: 10.1152/ajpheart.00774.2013.
- 16.** Sidibé A, Polena H, Razanajatovo J, Mannic T, Chaumontel N, Bama S, Maréchal I, Huber P, Gulino-Debrac D, Bouillet L, Vilgrain I. Dynamic phosphorylation of VE-cadherin Y685 throughout mouse estrous cycle in ovary and uterus. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2014 Aug 1;307(3):H448-54. doi: 10.1152/ajpheart.00773.2013.
- 17.** Wessel F, Winderlich M, Holm M, Frye M, Rivera-Galdos R, Vockel M, Linnepe R, Ipe U, Stadtmann A, Zarbock A, Nottebaum AF, Vestweber D. Leukocyte extravasation and vascular permeability are each controlled in vivo by different tyrosine residues of VE-cadherin. *Nat Immunol.* 2014;15(3):223-230. doi: 10.1038/ni.2824.
- 18.** Dejana E, Orsenigo F, Lampugnani MG. The role of adherens junctions and VE-cadherin in the control of vascular permeability. *J Cell Sci.* 2008;121(Pt 13):2115-2122. doi: 10.1242/jcs.017897.

19. McCrea PD, Gottardi CJ. Beyond β -catenin: prospects for a larger catenin network in the nucleus. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2016;17(1):55-64. doi: 10.1038/nrm.2015.3.
20. Zack GW, Rogers WE, Latt SA. Automatic measurement of sister chromatid exchange frequency. *J Histochem Cytochem.* 1977;25(7):741-753. doi: 10.1177/25.7.70454.
21. Nowak-Sliwinska P, Alitalo K, Allen E, Anisimov A, Aplin AC, Auerbach R, Augustin HG, Bates DO, van Beijnum JR, Bender RHF, Bergers G, Bikfalvi A, Bischoff J, Böck BC, Brooks PC, Bussolino F, Cakir B, Carmeliet P, Castranova D, Cimpean AM, Cleaver O, Coukos G, Davis GE, De Palma M, Dimberg A, Dings RPM, Djonov V, Dudley AC, Dufton NP, Fendt SM, Ferrara N, Fruttiger M, Fukumura D, Ghesquière B, Gong Y, Griffin RJ, Harris AL, Hughes CCW, Hultgren NW, Iruela-Arispe ML, Irving M, Jain RK, Kalluri R, Kalucka J, Kerbel RS, Kitajewski J, Klaassen I, Kleinmann HK, Koolwijk P, Kuczynski E, Kwak BR, Marien K, Melero-Martin JM, Munn LL, Nicosia RF, Noel A, Nurro J, Olsson AK, Petrova TV, Pietras K, Pili R, Pollard JW, Post MJ, Quax PHA, Rabinovich GA, Raica M, Randi AM, Ribatti D, Ruegg C, Schlingemann RO, Schulte-Merker S, Smith LEH, Song JW, Stacker SA, Stalin J, Stratman AN, Van de Velde M, van Hinsbergh VWM, Vermeulen PB, Waltenberger J, Weinstein BM, Xin H, Yetkin-Arik B, Yla-Herttuala S, Yoder MC, Griffioen AW. Consensus guidelines for the use and interpretation of angiogenesis assays. *Angiogenesis.* 2018. 21(3):425-532. doi: 10.1007/s10456-018-9613-x.
22. Carpentier G, Berndt S, Ferratge S, Rasband W, Cuendet M, Uzan G, Albanese P. Angiogenesis Analyzer for ImageJ - A comparative morphometric analysis of "Endothelial Tube Formation Assay" and "Fibrin Bead Assay". *Sci Rep.* 2020;10(1):11568. doi: 10.1038/s41598-020-67289-8.
23. Said SI, Hamidi SA, Dickman KG, Szema AM, Lyubsky S, Lin RZ, Jiang YP, Chen JJ, Waschek JA, Kort S. Moderate pulmonary arterial hypertension in male mice lacking the vasoactive intestinal peptide gene. *Circulation.* 2007;115(10):1260-1268.
24. Kidoya H, Ueno M, Yamada Y, Mochizuki N, Nakata M, Yano T, Fujii R, Takakura N. Spatial and temporal role of the apelin/APJ system in the caliber size regulation of blood vessels during angiogenesis. *EMBO J.* 2008;27(3):522-534. doi: 10.1038/sj.emboj.7601982.
25. Brose K, Bland KS, Wang KH, Arnott D, Henzel W, Goodman CS, Tessier-Lavigne M, Kidd T. Slit proteins bind Robo receptors and have an evolutionarily conserved role in repulsive axon guidance. *Cell* 1999, 96(6):795-806. doi: 10.1016/s0092-8674(00)80590-5.
26. Park KW, Morrison CM, Sorensen LK, Jones CA, Rao Y, Chien CB, Wu JY, Urness LD, Li DY. Robo4 is a vascular-specific receptor that inhibits endothelial migration. *Dev. Biol.* 2003;261(1):251-267. doi: 10.1016/s0012-1606(03)00258-6.

- 27.** Nichol D, Stuhlmann H. EGFL7: a unique angiogenic signaling factor in vascular development and disease. *Blood*. 2012;119(6):1345-1352. doi: 10.1182/blood-2011-10-322446.
- 28.** Pellicani R, Poletto E, Andreuzzi E, Paulitti A, Doliana R, Bizzotto D, Braghetta P, Colladel R, Tarticchio G, Sabatelli P, Bucciotti F, Bressan G, Iozzo RV, Colombatti A, Bonaldo P, Mongiat M. Multimerin-2 maintains vascular stability and permeability. *Matrix Biol*. 2020;87:11-25. doi: 10.1016/j.matbio.2019.08.002.
- 29.** Jeltsch M, Jha SK, Tvorogov D, Anisimov A, Leppänen VM, Holopainen T, Kivelä R, Ortega S, Kärpänen T, Alitalo K. CCBE1 enhances lymphangiogenesis via A disintegrin and metalloprotease with thrombospondin motifs-3-mediated vascular endothelial growth factor-C activation. *Circulation*. 2014;129(19):1962-1971. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.113.002779.
- 30.** Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev*. 2004;25(4):581-611. doi: 10.1210/er.2003-0027.
- 31.** Zhuang X, Cross D, Heath VL, Bicknell R. Shear stress, tip cells and regulators of endothelial migration. *Biochem Soc Trans*. 2011;39(6):1571-1575. doi: 10.1042/BST20110746.
- 32.** Chen Q, Jin M, Yang F, Zhu J, Xiao Q, Zhang L. Matrix metalloproteinases: inflammatory regulators of cell behaviors in vascular formation and remodeling. *Mediators Inflamm*. 2013;2013:928315. doi: 10.1155/2013/928315.
- 33.** Clark RA, Folkvord JM, Nielsen LD. Either exogenous or endogenous fibronectin can promote adherence of human endothelial cells. *J Cell Sci*. 1986;82:263-280. doi: 10.1242/jcs.82.1.263.
- 34.** Cai X, Zhou X, Xiao F, Ye B, Huang W, Huang Z. Inhibition of hsa-miR-6086 protects human umbilical vein endothelial cells against TNF α -induced proliferation inhibition and apoptosis via CDH5. *Gene*. 2018;661:202-208. doi: 10.1016/j.gene.2018.03.091.
- 35.** Cybulsky MI, Fries JW, Williams AJ, Sultan P, Eddy R, Byers M, Shows T, Gimbrone MA Jr, Collins T. Gene structure, chromosomal location, and basis for alternative mRNA splicing of the human VCAM1 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88(17):7859-7863. doi: 10.1073/pnas.88.17.7859.

- 36.** Garrido-Urbani S, Bradfield PF, Imhof BA. Tight junction dynamics: the role of junctional adhesion molecules (JAMs). *Cell Tissue Res.* 2014;355(3):701-715. doi: 10.1007/s00441-014-1820-1.
- 37.** Wagner JUG, Chavakis E, Rogg EM, Muhly-Reinholz M, Glaser SF, Günther S, John D, Bonini F, Zeiher AM, Schaefer L, Hannocks MJ, Boon RA, Dimmeler S. Switch in Laminin β 2 to Laminin β 1 Isoforms During Aging Controls Endothelial Cell Functions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2018 ;38(5):1170-1177. doi: 10.1161/ATVBAHA.117.310685.
- 38.** High FA, Lu MM, Pear WS, Loomes KM, Kaestner KH, Epstein JA. Endothelial expression of the Notch ligand Jagged1 is required for vascular smooth muscle development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 ;105(6):1955-1959. doi: 10.1073/pnas.0709663105.
- 39.** Ye Z, Chen J, Hu X, Yang S, Xuan Z, Lu X, Zhao Q. SPOCK1: a multi-domain proteoglycan at the crossroads of extracellular matrix remodeling and cancer development. *Am J Cancer Res.* 2020;10(10):3127-3137. PMID: 33163261.
- 40.** Turner CJ, Badu-Nkansah K, Crowley D, van der Flier A, Hynes RO. Integrin- α 5 β 1 is not required for mural cell functions during development of blood vessels but is required for lymphatic-blood vessel separation and lymphovenous valve formation. *Dev Biol.* 2014;392(2):381-392. doi: 10.1016/j.ydbio.2014.05.006.
- 41.** Benn A, Bredow C, Casanova I, Vukičević S, Knaus P. VE-cadherin facilitates BMP-induced endothelial cell permeability and signaling. *J Cell Sci.* 2016;129(1):206-218. doi: 10.1242/jcs.179960.
- 42.** Yuen DA, Robinson LA. Slit2-Robo signaling: a novel regulator of vascular injury. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2013;22(4):445-451. doi: 10.1097/MNH.0b013e32836235f4.
- 43.** Cueille C, Garel JM. RAMPs and G protein coupled receptors. *Med Sci (Paris).* 2004;20(8-9):773-778. doi: 10.1051/medsci/2004208-9773.
- 44.** Broussard JA, Green KJ. Plectin pulls it together, coupling the cortical actin and intermediate filament cytoskeletons. *J Cell Biol.* 2022;221(3):e202201054. doi: 10.1083/jcb.202201054.
- 45.** Folkman J. Angiogenesis. *Annu Rev Med.* 2006;57:1-18. doi: 10.1146/annurev.med.57.121304.131306.

- 46.** Bentley K, Franco CA, Philippides A, Blanco R, Dierkes M, Gebala V, Stanchi F, Jones M, Aspalter IM, Cagna G, Weström S, Claesson-Welsh L, Vestweber D, Gerhardt H. The role of differential VE-cadherin dynamics in cell rearrangement during angiogenesis. *Nat Cell Biol.* 2014;16(4):309-321. doi: 10.1038/ncb2926.
- 47.** Liang CC, Park AY, Guan JL. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nat Protoc.* 2007;2(2):329-333. doi: 10.1038/nprot.2007.30.
- 48.** Huebsch JC, McCarthy JB, Diglio CA, Mooradian, D L. Endothelial Cell Interactions With Synthetic Peptides From the Carboxyl-Terminal Heparin-Binding Domains of Fibronectin. *Circ. Res.* 1995; 77, 43–53. doi: 10.1161/01.res.77.1.43.
- 49.** Clark RA, Folkvord JM, Nielsen LD. Either exogenous or endogenous fibronectin can promote adherence of human endothelial cells. *J Cell Sci.* 1986;82:263-280. doi: 10.1242/jcs.82.1.263.
- 50.** Cai X, Zhou X, Xiao F, Ye B, Huang W, Huang Z. Inhibition of hsa-miR-6086 protects human umbilical vein endothelial cells against TNF α -induced proliferation inhibition and apoptosis via CDH5. *Gene.* 2018;661:202-208. doi: 10.1016/j.gene.2018.03.091
- 51.** Mühleder S, Fernández-Chacón M, Garcia-Gonzalez I, Benedito R. Endothelial sprouting, proliferation, or senescence: tipping the balance from physiology to pathology. *Cell Mol Life Sci.* 2021;78(4):1329-1354. doi: 10.1007/s00018-020-03664-y.
- 52.** Potter MD, Barbero S, Cheresch DA. Tyrosine phosphorylation of VE-cadherin prevents binding of p120- and beta-catenin and maintains the cellular mesenchymal state. *J Biol Chem.* 2005;280(36):31906-31912. doi: 10.1074/jbc.M505568200.
- 53.** Kalinichenko VV, Zhou Y, Shin B, Stolz DB, Watkins SC, Whitsett JA, et al. Wild-type levels of the mouse Forkhead Box f1 gene are essential for lung repair. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2002;282:6/L1253–65. doi: 10.1152/ajplung.00463.2001.
- 54.** Kalinichenko VV, Lim L, Stolz DB, Shin B, Rausa FM, Clark J, Whitsett JA, Watkins SC, Costa RH. Defects in pulmonary vasculature and perinatal lung hemorrhage in mice heterozygous null for the Forkhead Box f1 transcription factor. *Dev Biol.* 2001;235: 489–506. doi: 10.1006/dbio.2001.0322.

- 55.** Bishop NB., Stankiewicz P, Steinhorn RH. Alveolar capillary dysplasia. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2011;184, 172–179. doi: 10.1164/rccm.201010-1697CI.
- 56.** Gaengel K, Niaudet C, Hagikura K, Laviña B, Muhl L, Hofmann JJ, Ebarasi L, Nyström S, Rymo S, Chen LL, Pang MF, Jin Y, Raschperger E, Roswall P, Schulte D, Benedito R, Larsson J, Hellström M, Fuxe J, Uhlén P, Adams R, Jakobsson L, Majumdar A, Vestweber D, Uv A, Betsholtz C. The sphingosine-1-phosphate receptor S1PR1 restricts sprouting angiogenesis by regulating the interplay between VE-cadherin and VEGFR2. *Dev Cell.* 2012;23(3):587-599. doi: 10.1016/j.devcel.2012.08.005.
- 57.** Luo W, Garcia-Gonzalez I, Fernández-Chacón M, Casquero-Garcia V, Sanchez-Muñoz MS, Mühleder S, Garcia-Ortega L, Andrade J, Potente M, Benedito R. Arterialization requires the timely suppression of cell growth. *Nature.* 2021;589(7842):437-441. doi: 10.1038/s41586-020-3018-x
- 58.** Allen JT, Bloor CA, Knight RA, Spiteri MA. Expression of insulin-like growth factor binding proteins in bronchoalveolar lavage fluid of patients with pulmonary sarcoidosis. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1998;19(2):250-8. doi: 10.1165/ajrcmb.19.2.3080.
- 59.** Chakraborty G, Jain S, Kundu GC. Osteopontin promotes vascular endothelial growth factor-dependent breast tumor growth and angiogenesis via autocrine and paracrine mechanisms. *Cancer Res.*;68(1):152-61. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-2126.
- 60.** Townsley MI. Structure and composition of pulmonary arteries, capillaries, and veins. *Compr Physiol.* 2012;2(1):675-709. doi: 10.1002/cphy.c100081.
- 61.** Niethamer TK, Stabler CT, Leach JP, Zepp JA, Morley MP, Babu A, Zhou S, Morrissey EE. Defining the role of pulmonary endothelial cell heterogeneity in the response to acute lung injury. *Elife.* 2020;9:e53072. doi: 10.7554/eLife.53072.
- 62.** Pedrosa AR, Bodrug N, Gomez-Escudero J, Carter EP, Reynolds LE, Georgiou PN, Fernandez I, Lees DM, Kostourou V, Alexopoulou AN, Batista S, Tavora B, Serrels B, Parsons M, Iskratsch T, Hodivala-Dilke KM. Tumor Angiogenesis Is Differentially Regulated by Phosphorylation of Endothelial Cell Focal Adhesion Kinase Tyrosines-397 and -861. *Cancer Res.* 2019;79(17):4371-4386. doi: 10.1158/0008-5472.
- 63.** Rohlenova K, Goveia J, García-Caballero M, Subramanian A, Kalucka J, Treps L, Falkenberg KD, de Rooij LPMH, Zheng Y, Lin L, Sokol L, Teuwen LA, Geldhof V, Taverna F, Pircher A, Conradi LC, Khan S, Stegen S, Panovska D, De Smet F, Staal FJT, Mclaughlin RJ, Vinckier S, Van Bergen T, Ectors N, De Haes P, Wang J, Bolund L, Schoonjans L, Karakach TK, Yang H, Carmeliet G, Liu Y, Thienpont B, Dewerchin M,

Eelen G, Li X, Luo Y, Carmeliet P. Single-Cell RNA Sequencing Maps Endothelial Metabolic Plasticity in Pathological Angiogenesis. *Cell Metab.* 2020;31(4):862-877. doi: 10.1016/j.cmet.2020.03.009.

64. Travaglini KJ, Nabhan AN, Penland L, Sinha R, Gillich A, Sit RV, Chang S, Conley SD, Mori Y, Seita J, Berry GJ, Shrager JB, Metzger RJ, Kuo CS, Neff N, Weissman IL, Quake SR, Krasnow MA. A molecular cell atlas of the human lung from single-cell RNA sequencing. *Nature.* 2020;587(7835):619-625. doi: 10.1038/s41586-020-2922-4.

65. 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.* 2005 Jan 25;102(4):1076-81. doi: 10.1073/pnas.0404984102. Epub 2005 Jan 11. PMID: 15644447; PMCID: PMC545830.

66. Weibel ER. Lung morphometry: the link between structure and function. *Cell Tissue Res.* 2017;367(3):413-426. doi: 10.1007/s00441-016-2541-4.

67. Lahm T, Crisostomo PR, Markel TA, Wang M, Lillemoe KD, Meldrum DR. The critical role of vascular endothelial growth factor in pulmonary vascular remodeling after lung injury. *Shock.* 2007;28(1):4-14. doi: 10.1097/shk.0b013e31804d1998.

68. Gebb S, Stevens T. On lung endothelial cell heterogeneity. *Microvasc Res.* 2004;68:1–12. doi: 10.1016/j.mvr.2004.02.002.

69. Aird WC. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: II. Representative vascular beds. *Circ Res.* 2007;100(2):174-190. doi: 10.1161/01.RES.0000255690.03436.ae.

70. Garnier O, Vilgrain I. Dialogue between VE-Cadherin and Sphingosine 1 Phosphate Receptor1 (S1PR1) for Protecting Endothelial Functions. *Int J Mol Sci.* 2023;24(4):4018-. doi: 10.3390/ijms24044018.

71. Yanagida K, Engelbrecht E, Niaudet C, Jung B, Gaengel K, Holton K, Swendeman S, Liu CH, Levesque MV, Kuo A, Fu Z, Smith LEH, Betsholtz C, Hla T. Sphingosine 1-Phosphate Receptor Signaling Establishes AP-1 Gradients to Allow for Retinal Endothelial Cell Specialization. *Dev Cell.* 2020;52(6):779-793.e7. doi: 10.1016/j.devcel.2020.01.016.

72. Cai Y, Bolte C, Le T, Goda C, Xu Y, Kalin TV, Kalinichenko VV. FOXF1 maintains endothelial barrier function and prevents edema after lung injury. *Sci Signal.* 2016;9(424):ra40. doi: 10.1126/scisignal.aad1899.

73. Bian F, Lan YW, Zhao S, Deng Z, Shukla S, Acharya A, Donovan J, Le T, Milewski D, Bacchetta M, Hozain AE, Tipograf Y, Chen YW, Xu Y, Shi D, Kalinichenko VV, Kalin TV. Lung endothelial cells regulate pulmonary fibrosis through FOXF1/R-Ras signaling. *Nat Commun.* 2023;14(1):2560. doi: 10.1038/s41467-023-38177-2.

74. Stylianopoulos T, Munn LL, Jain RK. Reengineering the Tumor Vasculature: Improving Drug Delivery and Efficacy. *Trends Cancer.* 2018;4(4):258-259. doi: 10.1016/j.trecan.2018.02.010.

75. Simons M, Gordon E, Claesson-Welsh L. Mechanisms and regulation of endothelial VEGF receptor signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2016;17(10):611-625. doi: 10.1038/nrm.2016.87.

76 Adam AP. Regulation of Endothelial Adherens Junctions by Tyrosine Phosphorylation. *Mediators Inflamm.*; 2015;2015:272858. doi: 10.1155/2015/272858.

I.4. Revue

*Dialogue between VE-Cadherin and
Sphingosine 1 Phosphate Receptor1 (S1PR1)
for Protecting Endothelial Functions*



Review

Dialogue between VE-Cadherin and Sphingosine 1 Phosphate Receptor1 (S1PR1) for Protecting Endothelial Functions

Olivia Garnier and Isabelle Vilgrain *

University Grenoble Alpes, INSERM U13, CEA, BGE-Biomics, 38000 Grenoble, France

* Correspondence: isabelle.vilgrain@cea.fr

Abstract: The endothelial cells (EC) of established blood vessels in adults remain extraordinarily quiescent in the sense that they are not actively proliferating, but they fulfill the necessary role to control the permeability of their monolayer that lines the interior of blood vessels. The cell–cell junctions between ECs in the endothelium comprise tight junctions and adherens homotypic junctions, which are ubiquitous along the vascular tree. Adherens junctions are adhesive intercellular contacts that are crucial for the organization of the EC monolayer and its maintenance and regulation of normal microvascular function. The molecular components and underlying signaling pathways that control the association of adherens junctions have been described in the last few years. In contrast, the role that dysfunction of these adherens junctions has in contributing to human vascular disease remains an important open issue. Sphingosine-1-phosphate (S1P) is a bioactive sphingolipid mediator found at high concentrations in blood which has important roles in the control of the vascular permeability, cell recruitment, and clotting that follow inflammatory processes. This role of S1P is achieved through a signaling pathway mediated through a family of G protein-coupled receptors designated as S1PR1. This review highlights novel evidence for a direct linkage between S1PR1 signaling and the mediation of EC cohesive properties that are controlled by VE-cadherin.

Keywords: endothelium; endothelial cells; adherens junctions; VE-cadherin; lysophospholipids; sphingosine-1-phosphate (S1P); sphingosine 1 phosphate receptor1 (S1PR1)



Citation: Garnier, O.; Vilgrain, I. Dialogue between VE-Cadherin and Sphingosine 1 Phosphate Receptor1 (S1PR1) for Protecting Endothelial Functions. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 4018. <https://doi.org/10.3390/ijms24044018>

Academic Editor: Catherine Davis

Received: 12 January 2023

Revised: 9 February 2023

Accepted: 13 February 2023

Published: 16 February 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

The endothelium comprises a monolayer of endothelial cells (ECs) lining all vessels and functions as an important regulator of vascular homeostasis. It has important physiological properties that include mediating the balance between vasodilation and vasoconstriction, as well as the control of thrombogenesis and fibrinolysis. In addition, the endothelium provides a semipermeable barrier between blood and the interstitial space, which controls leukocyte trafficking and tumor metastasis. It is, therefore, important to understand the mechanisms that are involved in the maintenance of its functional integrity.

2. Adherens Junctions

The integrity of the endothelium depends on the cohesive strength between the ECs [1]. Several proteins exhibiting adhesive properties are involved in inter-EC contacts. These EC contacts, called adherens junctions, are present along the blood vessels. The interactions of cadherins with electron-dense complexes delineate the adhesive junctions that contribute to tissue integrity (Figure 1).

These specialized structures maintain the strength between ECs that is controlled by contractility and EC adhesive interactions. In adherens junctions, the transmembrane protein responsible for cell-to-cell adhesion is vascular endothelial (VE)-cadherin, which is cell-specific. It is present at all adherens junctions, and its Ca²⁺-dependent homotypic interactions are crucial for endothelial assembly. Thus, this protein is frequently used for labeling ECs at the early stages of vasculogenesis and angiogenesis [1–3]. Mouse embryos

carrying a homozygous null mutation of the *VE-cadherin* gene died after 9.5 to 10 days due to a lack of vascular remodeling and angiogenesis [4]. This dramatic phenotype was similar to that obtained with partial truncation of the VE-cadherin cytoplasmic tail [5]. The homophilic adhesive interactions are mediated through the extracellular domain of the protein (EC1–EC5). The cytoplasmic domain which is associated with actin via an interaction of the C-terminal domain with β -catenin/ α -catenin or plakoglobin/ α -catenin is mostly responsible for the strength of the EC junction. In addition, association of VE-cadherin with vimentin through plakoglobin/desmoplakin stabilizes the anchorage of adherens junctions to the actin cytoskeleton [6]. VE-cadherin is involved in several biological processes, including endothelial cell migration, survival [5], contact-induced growth inhibition [1], vascular integrity [6], and the endothelial network [7]. Both the extracellular domain and the cytoplasmic tail of VE-cadherin are important for the maintenance of normal vascular integrity. The discovery of a monoclonal antibody directed against an extracellular epitope that is only accessible in ECs forming new angiogenic networks has allowed specific targeting of VE-cadherin in the tumor vasculature, despite ubiquitous VE-cadherin expression in normal vessels [8–12]. Importantly, targeting with the monoclonal antibody has demonstrated the major role of the extracellular domain of VE-cadherin [13]. Altogether, these data highlight the major role of VE-cadherin in the maintenance of EC junctions and the vascular barrier.

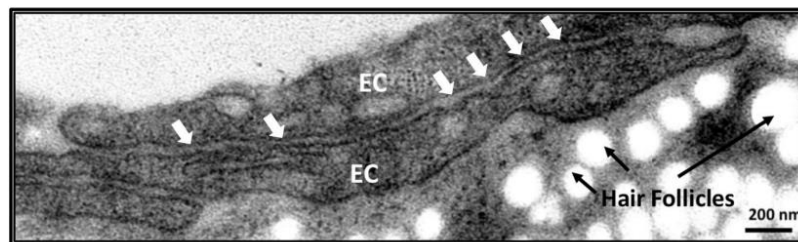


Figure 1. High-resolution transmission electron micrograph showing an endothelial adherens junction in adult mouse skin. EC stands for endothelial cell. The white arrows indicate the adherens junction between two overlapping ECs. The white spots are the hair follicles in the mouse skin. Scale bar is 200 nm.

3. Tyrosine Phosphorylation of VE-Cadherin Has a Significant Impact on Barrier Dysfunction

Tyrosine phosphorylation of the cadherin–catenin complex is a potent mechanism that regulates the stability of cell–cell junctions. Multiple tyrosine kinases [14–20] and phosphatases [21–27] co-distribute with adherens junction components. Several factors, such as VEGF, TNF- α , platelet activating factor, thrombin, and histamine, are known to increase endothelial permeability by inducing the tyrosine phosphorylation of VE-cadherin [13]. The binding of VEGF to its receptor, VEGFR2, activates several autophosphorylation sites, including Y⁹⁵¹ [28]. When phosphorylated, this provides a binding site for the T-cell-specific adaptor protein TSA_d, which is a c-Src-homology-2 (SH2) domain-containing protein which regulates the activation of c-Src [29]. Among its different substrates in EC, c-Src targets VE-cadherin during vascular remodeling and angiogenesis [30,31]. Our laboratory has identified that the site 685 (Y⁶⁸⁵) in the cytoplasmic domain of VE-cadherin becomes phosphorylated in response to VEGF in vitro [30] and in vivo in mice [32,33], as well as in tumoral vasculature [34]. Other studies of microvasculature have reported that the phosphorylation of sites Y⁶⁵⁸ and Y⁷³¹ following VEGF challenge occurs through reactive oxygen species and Rac1 [35]. Thus, several signaling pathways are involved in VEGF-mediated VE-cadherin phosphorylation, depending on the type of vessels and cells. In the case of TNF- α , it was shown that VE-cadherin was tyrosine-phosphorylated at sites Y⁶⁵⁸ and Y⁷³¹ through the PI3K/P110 α , Pyk2, and Rac1/Tiam1 cascades [36]. These phosphorylation

sites (Y⁶⁵⁸ and Y⁷³¹) are responsible for the uncoupling of β -catenin and p120, which are partners linked to actin cytoskeleton [37]. Although VE-cadherin tyrosine phosphorylation is barely detectable in the adult quiescent endothelium, it is a process required in several diseases driven by angiogenesis, including cancer, atherosclerosis, diabetic retinopathy, and arthritis.

4. Endothelium and Sphingosine-1-Phosphate (S1P)

S1P: sphingosine-1-phosphate (S1P) is a sphingolipid that comprises a class of lysophospholipid mediators that are important bioactive lipids. S1P originates from the platelets, and it has been shown to have a major role in a variety of biologic processes, which include DNA synthesis, neurite retraction, stress fiber formation, and membrane depolarization [38]. Many effects of S1P on vasculature are due to expression of the membrane receptor S1PR1 by the EC. Blood flow delivers S1P in micromolar concentrations, whereas tissue concentrations of S1P are usually in the nanomolar range [39]. In plasma and serum, S1P is distributed mainly in the high-density lipoprotein (HDL) fraction. In tissue, S1P is synthesized intracellularly by the actions of sphingomyelinase, ceramidase, and sphingosine kinase [40,41]. It has been demonstrated that S1P acts through specific binding to Edg (endothelial differentiation gene), the first receptor discovered during a search for immediate early genes that regulate endothelial cell differentiation. The ligand and its receptor were found to have some angiogenic properties. Indeed, treatment of ECs with S1P for 30 min resulted in a dramatic increase in actin stress fibers and cortical actin structures. Moreover, the activation of S1P receptors triggers several effects in EC, including proliferation, survival, migration, morphogenesis, adhesion molecule expression, and cytoskeletal changes [42,43]. Thus, S1P induced the proliferation of new vasculature, but stabilized the established vasculature. This is in sharp contrast to other angiogenic factors such as VEGF.

S1P Receptors: The characterization of the S1P receptors has provided new insight into this new angiogenic factor. S1PR1 is part of a family of seven-transmembrane-domain G-protein coupled receptors (GPCRs) [44]. The *S1PR1* transcript was cloned as an immediate-early gene induced during the formation of capillary-like networks by human ECs. Three putative, but less well-characterized, S1P-GPCRs have been identified [45,46]. Disruption of the *S1PR1* gene in mice caused embryonic lethality due to massive hemorrhage between embryonic days E12.5 to E14.5. The embryos underwent normal vasculogenesis and angiogenesis, but had a defect in the recruitment of mural cells to the vessel walls [47]. S1P has a high affinity (Kd 8nM) for its receptor, and the binding induces cytoskeletal rearrangement and subsequent endothelial barrier regulation. Lee et al. had previously shown that S1P up-regulates P-cadherin based adherens junctions in S1PR1 S1PR1-transfected HEK-293, then extended those investigations to demonstrate that the localization of VE-cadherin, α , β -, and γ -catenin at cell-cell junctions was dramatically increased within 1 h of S1P treatment [47]. That concept showing that the adherens junction assembly was under the dynamic control of S1PR1 in EC suggested that S1P might control EC integrity and functionality. From experiments using an S1PR1-specific agonist and antagonist in vivo, ex vivo, and in vitro, Gaengel et al. proposed that S1PR1 signaling regulates cellular adhesion, motility, and VE-cadherin localization. Moreover, an endothelial knockout of the *S1P1* gene led to damage to the adherens junctions and destabilization of VE-cadherin [48]. Altogether, the authors concluded that S1P/S1PR1 could protect the neovessels from hyperpermeability.

5. S1PR1 Signaling Pathways Controlling Endothelial Junctions

Although most of the overall physiological effects of S1P have been described, the details of the underlying signaling pathways remain only partially described. As for other GPCRs, S1PR1 is localized on the plasma membrane of EC. When it binds its ligand, S1PR1 is rapidly desensitized until it is re-cycled to the membrane. This process is also known for other GPCRs that are regulated by phosphorylation on serine residues of the C-terminus domain to uncouple GPCR/G-protein signaling. This uncoupling is followed by the recruitment of β -arrestin, which facilitates endocytosis, dephosphorylation, and

resensitization [49]. Importantly, S1PR1 contains three tyrosine residues, including the tyrosine 143 (Y¹⁴³) that mutational analysis has identified to be within the ERY motif between transmembrane domain III and the intracellular loop. The phosphorylation of this site has been shown to play a critical role in modulating the cell surface expression of S1PR1 [50]. S1PR1 phosphorylation at tyrosine Y¹⁴³ was induced by the membrane-associated non-receptor tyrosine kinase c-Src. Another group has recently shown that Y¹⁴³ phosphorylation of S1PR1 drives the receptor into the endoplasmic reticulum, which is dependent on the chaperone-binding immunoglobulin protein (BiP). BiP is also considered to be involved in protein folding and assembly, Ca²⁺ homeostasis, and regulation of endoplasmic reticulum stress signaling. Intracellular BiP was shown to be an important mediator of lung vascular injury through its ability to mediate EC permeability by virtue of activating Ca²⁺ signaling and promoting VE-cadherin disassembly [51]. BiP contains a nucleotide and a substrate-binding domain. The nucleotide-binding domain binds and hydrolyzes ATP. The activity of BiP is regulated by its allosteric ATPase cycle. Co-immunoprecipitation studies have shown that phosphorylated S1PR1 interacted with BiP through its ATPase domain. Furthermore, EC expressing Y¹⁴³D-S1PR, which mimics the phosphorylated form of S1PR1, exhibited increased BiP-ATPase activity. Thus, the authors concluded that S1P induced the phosphorylation of S1PR1 at site Y¹⁴³ and promoted the translocation of BiP to the cytoplasm. This led to increased BiP-ATPase activity, thereby augmenting its chaperone function. Altogether, these results show that BiP binds to endocytosed S1PR1 in the cytoplasm and promotes its transport to the endoplasmic reticulum. This identifies a new role for tyrosine phosphorylation of S1PR1, which supports its localization to a specific organelle and disruption of the EC barrier [52].

Mechanistically, S1PR1 was described to signal exclusively through the heterotrimeric G-protein composed of α , β , and γ subunits [49]. G α s deletion in EC mimicked S1PR1 gene knockout, which caused severe hemorrhage and embryonic lethality around day E11.5. No modification of the mural cell coverage was seen, but a reduced expression of VE-cadherin at the EC junctions in embryos was observed. It seems that G α s links the membrane-bound S1PR1 to its intracellular effector VE-cadherin, and thus controls vascular integrity [53].

S1PR1 can also activate the G-protein G α i, which, in turn, induces mobilization of intracellular Ca²⁺ and thus leads to increases in the small GTPases Rac1 and Cdc42 [54]. As a consequence, activated Rac1 and Cdc42 stabilize cadherin-catenin complexes and lead to rigid cell-cell adhesion that regulates adherens junction assembly.

The PI3K pathway is also involved in S1PR signaling pathway by activating PDK1 (3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1) and AKT. The pleckstrin homology domains of both PDK1 and AKT can bind to PIP₃; thus, PDK1 phosphorylates and activates AKT at the amino acid threonine T³⁰⁸ in its catalytic site. AKT-1 then modulates Rac1-GTP binding through phosphorylation. The guanine nucleotide exchange factor specific for Rac Tiam1, T lymphoma invasion and metastasis gene 1, translocates to the cell-cell contact area. Then, Rac-1 activity recruits cortactin to the actin-nucleation complex, which allows the polymerization of actin filaments at the cell periphery that distend the membrane and lead to the spreading of ECs. Thus, the S1P challenge induced a dramatic increase in actin stress fibers in ECs, as well as an increase in the localization of VE-cadherin into discontinuous structures at cell-cell contact regions. S1P acts through another mechanism related to cell-matrix interactions via focal adhesions. S1P was shown to activate the cytoplasmic c-Src kinases in EC [55,56] and the focal adhesion kinases (FAKs) located at focal adhesions [57]. Because one of the primary functions of phosphotyrosine residues is to provide docking sites for proteins that contain c-Src-homology-2 (SH2) domains, the formation of protein complexes essential for the assembly of focal adhesion structures is facilitated. Among the different sites of phosphorylation that are found in the FAK structure, the amino acid tyrosine 397 (Y³⁹⁷) is the autophosphorylation site stimulated by cell-matrix adhesion. A result of this conformational change is the c-Src association through the c-Src-SH2 domain. In addition, there is a proline-rich sequence in FAK which acts as a high-affinity binding site for the SH3 domain of c-Src. The activation of c-Src leads to

phosphorylation of FAK at several potential remaining sites, namely Y⁴⁰⁷, Y⁵⁷⁶, Y⁵⁷⁷, Y⁸⁶¹, and Y⁹²⁵ [58]. These additional phosphorylation sites of FAK can affect actin fiber assembly and focal adhesion formation and turnover. Thus, c-Src family kinases in focal adhesion complexes affect not only cellular migration, but also EC shape and vascular permeability. Upon S1P challenge, the specific phosphorylation of FAK at the Y⁵⁷⁶ site plays an important role in S1P-induced focal adhesion formation, EC barrier enhancement, and EC chemotactic motility [59–61]. Conversely, upon EC cell–cell adhesion, it was shown that FAK directly phosphorylates the VE-cadherin cytoplasmic domain at tyrosine residue Y⁶⁵⁸ [62]. As FAK controls VE-cadherin-Y⁶⁵⁸ phosphorylation in response to VEGF and TNE, these data support the importance of FAK activity in the regulation of cell–cell adherens junctions in addition to the canonical role of FAK in controlling cell–matrix focal adhesion dynamics. VE-cadherin-Y⁶⁵⁸ is located within the p120-catenin binding region, and mutagenesis results support a model whereby Y⁶⁵⁸ phosphorylation disrupts p120-catenin binding and may induce site-selective modulation of VE-cadherin, thus affecting adherens junction stability [37]. Taken together, these data support a key role of S1P/S1PR1 in the regulation of FAK in the barrier function.

To further demonstrate the effect of S1P on VE-cadherin, Wang et al. [63] showed that the analog of S1P, (S)-FTY720-phosphonate((3S)-3-(amino)-3-(hydroxymethyl)-5-(4'-octylphenyl)-pentylphosphonic acid) (Tys), induced both redistribution of the VE-cadherin complex to cell–cell junctions by binding with β -catenin, and, in association with cortical actin ring formation, anchored them to the cytoskeleton, in addition to improving cell–cell and cell–matrix interactions. The effect of Tys increasing barrier function *in vitro* was supported by measurements of increased transendothelial electrical resistance, which was significantly attenuated by a VE-cadherin functional blocking antibody. The marked increase in vascular permeability induced by the extracellular administration of anti-VE-cadherin antibodies demonstrates that VE-cadherin complexes are targets for Tys that are able to participate in EC barrier enhancement [13]. However, the stable analog of S1P exhibits some differences in effects on EC when compared to those of the native S1P. Nevertheless, the barrier regulatory effects of Tys reveal additional EC signaling pathways for preserving or reconstituting the vascular barrier that provides potential therapeutic utility.

Those effects of S1P on VE-cadherin have been further elucidated by experiments using mice and tissue cultures. An extensive post-transcriptional regulation of VE-cadherin by S1P was reported, including intracellular complex formation and trafficking, as well as membrane localization. The knockout of S1PR1 in EC induced a loss of VE-cadherin and VEGFR2 from the cell junctions in post-natal EC. The loss of S1PR1 in the mice embryos was associated with an endothelial hyperplasia and abnormal microvasculature in the aorta [48]. S1PR1 is known to regulate EC integrity and behavior by modulating junction protein localization and cell contractility [64]. S1PR1 has been shown, *in vivo* and *in vitro*, to increase junctional localization of VE-cadherin, thus increasing vascular stability and inhibiting VEGFR2 signaling. Indeed, under S1P stimulation, VE-cadherin co-immunoprecipitated with β -catenin, α -catenin, and γ -catenin. Conversely, the antagonist of S1PR1 increased cell sprouting, characterized by longer and more branched sprouts. Moreover, the deletion of S1PR1 and VE-cadherin genes was responsible for hyper-sprouting similar to that observed with VEGF. Thus, the collaboration between S1PR1 and VE-cadherin is important to inhibit cell sprouting and to maintain vascular integrity. More recently, the observation of VE-cadherin-mediated anastomosis of brain capillaries during early stages of brain vascularization demonstrated that the canonical Wnt- β -catenin signaling pathway could be counteracted by the S1PR1 pathway. Conversely, at later stages of vascularization, S1PR1 regulates VE-cadherin localization at the membrane and allows the maturation of the blood–brain barrier. In brain capillaries, Wnt signaling decreases to a low baseline level after lumen formation. In lumenized vessels, activation of S1PR1 signaling would occur, which would enable functional S1PR1 signaling for blood–brain barrier maintenance. As S1PR1 activated Rac1, the authors speculated that Wnt signaling may regulate Rac1-mediated S1PR1 signaling and thereby modulate junction localization of adhesion molecules. These

data indicate that S1PR1-Rac1-mediated regulation of VE-cadherin has a different effect on established junctions than on those newly formed during brain angiogenesis [65].

6. VE-Cadherin Controls S1PR1 Expression through Coordinated Expression of Several Genes to Promote Vascular Stability

All reports in the literature strongly suggest that S1PR1 signaling can regulate VE-cadherin expression and localization to maintain the integrity of the endothelial barrier. We infer the corollary that VE-cadherin could potentially regulate the expression of S1PR1. VE-cadherin has a certain number of cytoplasmic interacting proteins that couple VE-cadherin to the cytoskeleton, which were termed α -, β -, and γ -catenin. β -catenin translocates to the nucleus and modulates the expression of several genes through its binding to T-cell factor (TCF)/lymphoid enhancer-binding transcription factors. As an example, β -catenin can activate transcription of Wnt/ β -catenin target genes. Since β -catenin does not possess a DNA binding domain, it requires DNA binding partners to bind to the promoters of its target genes [66]. For instance, the zinc finger transcription factor Krüppel-like factor 2 (*Klf2*) was shown to stabilize the vasculature and to limit vascular disease in the face of metabolic and inflammatory challenges. In adults, *Klf2* acts as a central transcriptional switch point between the quiescent and activated states of EC. Indeed, it was shown that *Klf2* overexpression inhibited VEGFR2 promoter activity and, thus, inhibited VEGFR2 mRNA and protein expression [67]. Interestingly, *FoxO1*, which is a direct transcriptional regulator of *Klf2*, regulates T-cell trafficking, quiescence, and survival [68]. The first relation between cell migration and S1PR1/*Klf2* was demonstrated in *Klf2*-deficient T-cells that showed a defect in thymocyte emigration. Because S1PR1 was shown to be critical for thymocyte migration, the authors examined the expression of S1PR1 in *Klf2*^{-/-} thymocytes and found upregulation of S1PR1 mRNA expression. Using chromatin immunoprecipitation (ChIP) assays, the authors demonstrated that *Klf2* both binds and activates the S1PR1 promoter, which is critical for thymocyte egress. During inflammatory processes, the dysfunction of the endothelium is a cause of vascular diseases, and *Klf2* might be interesting as a therapeutic target for the treatment of chronic inflammation [69]. Indeed, the EC detection of a change in shear stress stimulates a signal to the nucleus that results in modification of gene transcription. The expression of *Klf2* has been demonstrated in areas of high shear stress in the adult human aorta [70,71]. The mechanical changes in vessel walls upon shear stress is mediated by the activation of integrins, GPCRs, tyrosine kinases, or ion channels in EC. The best-studied mechanotransducer is a complex of VE-cadherin and VEGFR2 at cell–cell junctions. VEGFR2 activates the PI(3)K-Akt pathway within minutes, leading to the phosphorylation of *FoxO1* and thus facilitating its active nuclear export and inhibiting its transcriptional activity [72,73]. VE-cadherin clustering at junctions in confluent EC was shown to induce persistent *FoxO1* inactivation. As a consequence, nuclear *Klf2* binding to the S1PR1 promoter will be increased, leading to S1PR1 expression and stabilization of the vessel [74]. Significantly, its association with other transcription factors also determines the specificity of the downstream effects of *FoxO1*. For instance, it was shown that β -catenin forms a complex with *FoxO1*, which represses claudin-5 expression [75]. Taken together, these data show that *Klf2* and *FoxO1* may cooperate in the transactivation of target genes and regulate EC proliferation, as well as the vascular barrier.

Forkhead Box (FOX) transcription factor is another transcription factor that has pro-angiogenic functions. Indeed, its inactivation in EC revealed that *Foxf1* regulates the transcription of genes for angiogenesis and maintenance of EC junctions. Indeed, using chromatin immunoprecipitation and luciferase reporter assays, the authors demonstrated that *Foxf1* directly induced the transcriptional activity of the S1PR1 promoter, thus increasing the expression of both mRNAs and proteins [76,77]. Moreover, the deletion of *Foxf1* in ECs dramatically reduced the VE-cadherin mRNA, as well as β -catenin. Taken together, these data demonstrate that *Foxf1* is also involved in the stability of the endothelium barrier.

The epigenetic regulation induced by VE-cadherin clustering in human dermal microvascular ECs showed that VE-cadherin is involved in the expression of several genes related to vascular stability [78]. For instance, there was a general downregulation of genes involved in cell proliferation and EC sprouting, compared to a promotion of genes involved in the interaction with the extracellular matrix and cell–cell adhesion. This effect can be attributed to the interaction of VE-cadherin with its intracellular partners, such as β -catenin and p120. Since the truncation of 80 AA in the VE-cadherin cytoplasmic tail prevents the binding of β -catenin [5], the complex formed in the nucleus may increase *FoxO1* activity by stabilizing its binding to DNA. The specificity of the downstream effects of β -catenin depends upon its localization. When at the adherens junctions, β -catenin stabilizes VE-cadherin by anchoring its cytoplasmic tail to the actin cytoskeleton. In response to several stimuli, the dissociation of β -catenin from the adherens junctions acts as a transcriptional coregulator. This implicates phosphorylation processes.

Among the nine tyrosine amino acids in the cytoplasmic tail of VE-cadherin, the phosphorylation of residues Y⁶⁵⁸, Y⁶⁸⁵, and Y⁷³¹ results from activation of kinases and/or suppression of phosphatases. The amino acid tyrosines Y⁶⁵⁸ or Y⁷³¹, in the region of VE-cadherin, were previously shown to bind p120- and β -catenin. With the exception of E-cadherin, the Y⁶⁵⁸ site is well-conserved among cadherins, which suggests that phosphorylation of this residue may be a general mechanism to disrupt cell barrier function. Conversely, since the Y⁷³¹ site is unique to VE-cadherin, we suggest that the regulation of the Y⁷³¹ residue may implicate an endothelium-specific mechanism. We suggest that the uncoupling process might be linked to the reprogramming of ECs through several gene expressions (unpublished observations). Indeed, the tyrosine phosphorylation of VE-cadherin at site Y⁷³¹ reduces β -catenin affinity, leading to an increased amount of cytoplasmic β -catenin molecules available for signaling to the nucleus, and would, therefore, influence gene expressions [79,80]. This includes developmental regulators and other genes involved in coordinating cell proliferation, cell–cell interactions, and cell–matrix interactions. While VE-cadherin has been considered as a multifunctional adhesion receptor modulating endothelial biology, VE-cadherin may also dictate EC behavior through the regulation of intracellular signaling pathways controlling gene transcription via multiple DNA-binding proteins, including, at least, β -catenin.

7. Potential Roles for S1PR1 and VE-Cadherin in Therapies

The roles of S1PR1 and VE-cadherin in vascular homeostasis are well-described, but could provide useful targets for therapies to treat diseases associated with endothelial barrier disruption. For example, hepatic ischemia reperfusion injury is induced during the resection and transplantation of the liver. This injury leads to abnormal vascular tone and increases in macrophage and proinflammatory cytokine filtration due to the sinusoidal endothelial cell damage. Administration of S1PR1 agonists leads to an increase in VE-cadherin expression, which attenuates the symptoms of hepatic ischemia reperfusion injury [81].

Ovarian hyperstimulation syndrome is characterized by ovarian enlargement and vascular leakage, and leads to complications with follicular growth and maturation. S1PR1 agonists increase VE-cadherin expression and prevent its phosphorylation. Moreover, a decrease in VEGFR1 and VEGFR2 levels is also observed. In this syndrome, S1PR1 treatment restores the endothelial barrier [82,83].

In the context of cancer, S1PR1 is known to reduce tumor angiogenesis. Evidence for this was derived from two xenograft tumor growth models. The administration of miR302-367 promoted VE-cadherin expression and *Klf2* activity, which, in turn, induced S1PR1 transcription. The results demonstrated that S1PR1 mediated angiogenesis restriction and led to vascular stability. Therefore, S1PR1 has the capacity to reduce tumor growth [84]. In breast cancer, low S1PR1 expression induces the formation of vasculogenic mimicry (VM), which consists of vessel-like networks associated with poor prognosis and the development of tumor metastases. VE-cadherin/ β -catenin complex is highly expressed

in VM. Overexpression of S1PR1 in breast cancer prevents the VM formation by inducing VE-cadherin phosphorylation on tyrosine 731, leading to disruption of the VE-cadherin/ β -catenin complex and, thus, a reduction in tumor growth [85].

S1PR1 is also implicated in the immune system and has a significant impact in several diseases. Multiple sclerosis (MS) is an autoimmune disease where the B and T lymphocytes attack the myelin sheath, leading to the nerve conduction deficiency. S1PR1 expressed on B and T lymphocytes is responsible for cell trafficking. Ozanimod is an S1PR1 modulator that is approved for clinical usage in several countries, with the clinical outcomes of reducing inflammation, demyelination associated with MS, and circulating lymphocytes [86]. The blockade of S1PR1 pathways in autoimmune thyroiditis reduces the incidence and the gravity of the disease, along with a reduction in the proportion of inflammation cells [87].

In chronic inflammatory processes such as atherosclerosis, S1P binding to S1PR1 activates the signaling pathway NF- κ B, which is responsible for angiogenesis and secretion of proinflammatory cytokines, such as tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 beta, from lymphatic endothelial cells. Mice with atherosclerosis that are treated with FTY720, a competitor of S1P, have fewer lymphatic vessels, which implies that S1P/S1PR1 is a pathway involved in vessel tube formation [88].

Altogether, because VE-cadherin is an important member of adherens junctions in all vessels and S1PR1 is mainly expressed in EC, it seems plausible that targeting the cross-talk between signaling pathways might be important to improve therapeutic outcomes.

8. Summary

This review describes research in the area of endothelial barrier integrity, which is critical for normal vascular function. We particularly focused on the regulation of endothelial junctions by S1PR1 and VE-cadherin (Figure 2).

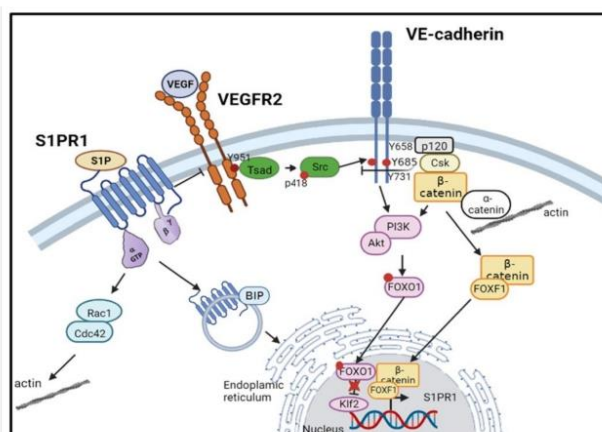


Figure 2. Dialogue between VE-cadherin and sphingosine-1-phosphate receptor 1 (S1PR1) for protecting endothelial functions.

Endothelial junctions have a major role in controlling the integrity of the endothelial barrier, and, thus, in maintaining the vascular tone, vascular permeability, and oxidative stress response for healthy blood and lymphatic vessels to avoid vascular diseases. VE-cadherin is the endothelial-specific adhesion protein at the center of this major role. Its potential structural modifications through growth factor pathways can regulate the reorganization of actin, cortactin, and other cytoskeletal proteins, and, thus, have a huge impact on EC junction integrity. Sphingolipids, such as S1P and its receptor S1PR1, have a strong effect on EC and vessel structure. S1P/S1PR1 signaling influences endothelial barrier

behavior by regulating cell–matrix and cell–cell adhesion, thus providing a lipid mediator signaling system of fundamental importance in human diseases. We have identified that the Y⁷³¹ site is unique to VE-cadherin, and, thus, we suggest that regulation of the Y⁷³¹ residue may implicate an endothelium-specific mechanism in response to sphingolipid signaling pathways. We suggest that the uncoupling process might be linked to the reprogramming of EC through several gene expressions (unpublished observations). This concept is supported by observations that the tyrosine phosphorylation of VE-cadherin at site Y⁷³¹ reduces β -catenin affinity, leading to an increased amount of cytoplasmic β -catenin molecules available for signaling to the nucleus, which, therefore, would influence gene expression [79,80]. Thus, further elucidation of the interplay between VE-cadherin EC junctions and lipid metabolism will be useful for future developmental insights into the search for efficient human therapeutics.

Author Contributions: O.G. and I.V. wrote the manuscript. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by the French National Institute of Health and Medical Research INSERM, the French Atomic Energy and Alternative Energies Commission (CEA), Fundamental Research Division/Interdisciplinary Research Institute of Grenoble/Department of Health/Biosciences et Bioingénierie pour la Santé (BGE) (UMRS 13), Ligue Nationale contre Le Cancer (Comité Savoie), and the Fédération Nationale des Centres de Lutte contre le Cancer (GEFLUC Grenoble-Dauphiné-Savoie). Olivia GARNIER received funding from Grenoble Alliance for Integrated Structural & Cell Biology Foundation (GRAL), a program from the Chemistry Biology Health (CBH) Graduate School of University Grenoble Alpes (ANR-17-EURE-0003).

Acknowledgments: We thank Helena POLENA for expertise in TEM. We thank Donald MARTIN (UGA-TIMC-IMAG-SyNABi team) for revising the English writing in the last version of this manuscript.

Conflicts of Interest: No conflict of interest, financial or otherwise, are declared by the authors.

References

- Breviario, F.; Caveda, L.; Corada, M.; Martin-Padura, I.; Navarro, P.; Golay, J.; Introna, M.; Gulino, D.; Lampugnani, M.G.; Dejana, E. Functional Properties of Human Vascular Endothelial Cadherin (7B4/Cadherin-5), an Endothelium-Specific Cadherin. *Arter. Thromb. Vasc. Biol.* **1995**, *15*, 1229–1239. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Breier, G.; Breviario, F.; Caveda, L.; Berthier, R.; Schnürch, H.; Gotsch, U.; Vestweber, D.; Risau, W.; Dejana, E. Molecular cloning and expression of murine vascular endothelial-cadherin in early stage development of cardiovascular system. *Blood* **1996**, *87*, 630–641. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Telo', P.; Breviario, F.; Huber, P.; Panzeri, C.; Dejana, E. Identification of a Novel Cadherin (Vascular Endothelial Cadherin-2) Located at Intercellular Junctions in Endothelial Cells. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 17565–17572. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Gory-Faure, S.; Prandini, M.; Pointu, H.; Roullot, V.; Paintrand, I.; Vernet, M.; Huber, P. Role of vascular endothelial-cadherin in vascular morphogenesis. *Development* **1999**, *126*, 2093–2102. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Carmeliet, P.; Lampugnani, M.-G.; Moons, L.; Breviario, F.; Compernelle, V.; Bono, F.; Balconi, G.; Spagnuolo, R.; Oosthuysen, B.; Dewerchin, M.; et al. Targeted Deficiency or Cytosolic Truncation of the VE-cadherin Gene in Mice Impairs VEGF-Mediated Endothelial Survival and Angiogenesis. *Cell* **1999**, *98*, 147–157. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Wallez, Y.; Huber, P. Endothelial adherens and tight junctions in vascular homeostasis, inflammation and angiogenesis. *Biochim. Biophys. Acta-Biomembr.* **2008**, *1778*, 794–809. [[CrossRef](#)]
- Bach, T.L.; Barsigian, C.; Chalupowicz, D.G.; Busler, D.; Yaen, C.H.; Grant, D.S.; Martinez, J. VE-Cadherin Mediates Endothelial Cell Capillary Tube Formation in Fibrin and Collagen Gels. *Exp. Cell Res.* **1998**, *238*, 324–334. [[CrossRef](#)]
- Liao, F.; Li, Y.; O'Connor, W.; Zanetta, L.; Bassi, R.; Santiago, A.; Overholser, J.; Hooper, A.; Mignatti, P.; Dejana, E.; et al. Monoclonal antibody to vascular endothelial-cadherin is a potent inhibitor of angiogenesis, tumor growth, and metastasis. *Cancer Res* **2000**, *60*, 6805–6810.
- Corada, M.; Liao, F.; Lindgren, M.; Lampugnani, M.G.; Breviario, F.; Frank, R.; Muller, W.A.; Hicklin, D.J.; Bohlen, P.; Dejana, E. Monoclonal antibodies directed to different regions of vascular endothelial cadherin extracellular domain affect adhesion and clustering of the protein and modulate endothelial permeability. *Blood* **2001**, *97*, 1679–1684. [[CrossRef](#)]
- Corada, M.; Zanetta, L.; Orsenigo, F.; Breviario, F.; Lampugnani, M.G.; Bernasconi, S.; Liao, F.; Hicklin, D.J.; Bohlen, P.; Dejana, E. A monoclonal antibody to vascular endothelial-cadherin inhibits tumor angiogenesis without side effects on endothelial permeability. *Blood* **2002**, *100*, 905–911. [[CrossRef](#)]

11. Liao, F.; Doody, J.F.; Overholser, J.; Finnerty, B.; Bassi, R.; Wu, Y.; Dejana, E.; Kussie, P.; Bohlen, P.; Hicklin, D.J. Selective targeting of angiogenic tumor vasculature by vascular endothelial-cadherin antibody inhibits tumor growth without affecting vascular permeability. *Cancer Res.* **2002**, *62*, 2567–2575.
12. May, C.; Doody, J.F.; Abdullah, R.; Balderes, P.; Xu, X.; Chen, C.P.; Zhu, Z.; Shapiro, L.; Kussie, P.; Hicklin, D.J.; et al. Identification of a transiently exposed VE-cadherin epitope that allows for specific targeting of an antibody to the tumor neovasculature. *Blood* **2005**, *105*, 4337–4344. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Dejana, E.; Orsenigo, F.; Lampugnani, M.G. The role of adherens junctions and VE-cadherin in the control of vascular permeability. *J. Cell Sci.* **2008**, *121*, 2115–2122. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Piedra, J.; Miravet, S.; Castaño, J.; Palmer, H.G.; Heisterkamp, N.; de Herreros, A.G.; Duñach, M. p120 Catenin-Associated Fer and Fyn Tyrosine Kinases Regulate β -Catenin Tyr-142 Phosphorylation and β -Catenin- α -Catenin Interaction. *Mol. Cell. Biol.* **2003**, *23*, 2287–2297. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Xu, G.; Craig, A.; Greer, P.; Miller, M.; Anastasiadis, P.Z.; Lilien, J.; Balsamo, J. Continuous association of cadherin with β -catenin requires the non-receptor tyrosine-kinase Fer. *J. Cell Sci.* **2004**, *117*, 3207–3219. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Baumeister, U.; Funke, R.; Ebnet, K.; Vorschmitt, H.; Koch, S.; Vestweber, D. Association of Csk to VE-cadherin and inhibition of cell proliferation. *EMBO J.* **2005**, *24*, 1686–1695. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Lambeng, N.; Wallez, Y.; Rampon, C.; Cand, F.; Christé, G.; Gulino-Debrac, D.; Vilgrain, I.; Huber, P. Vascular Endothelial-Cadherin Tyrosine Phosphorylation in Angiogenic and Quiescent Adult Tissues. *Circ. Res.* **2005**, *96*, 384–391. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Knezevic, N.; Tauseef, M.; Thennes, T.; Mehta, D. The G protein $\beta\gamma$ subunit mediates reannealing of adherens junctions to reverse endothelial permeability increase by thrombin. *J. Exp. Med.* **2009**, *206*, 2761–2777. [[CrossRef](#)]
19. Zhao, X.; Peng, X.; Sun, S.; Park, A.Y.; Guan, J.-L. Role of kinase-independent and -dependent functions of FAK in endothelial cell survival and barrier function during embryonic development. *J. Cell Biol.* **2010**, *189*, 955–965. [[CrossRef](#)]
20. Alcaide, P.; Martinelli, R.; Newton, G.; Williams, M.R.; Adam, A.; Vincent, P.A.; Lusinskas, F.W. p120-Catenin prevents neutrophil transmigration independently of RhoA inhibition by impairing Src dependent VE-cadherin phosphorylation. *Am. J. Physiol. Physiol.* **2012**, *303*, C385–C395. [[CrossRef](#)]
21. 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. USA* **1994**, *91*, 9680–9684. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Ukropec, J.A.; Hollinger, M.; Salva, S.M.; Woolkalis, M.J. SHP2 Association with VE-Cadherin Complexes in Human Endothelial Cells Is Regulated by Thrombin. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 5983–5986. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Holsinger, L.J.; Ward, K.; Duffield, B.; Zachwieja, J.; Jallal, B. The transmembrane receptor protein tyrosine phosphatase DEP1 interacts with p120ctn. *Oncogene* **2002**, *21*, 7067–7076. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Nottebaum, A.F.; Cagna, G.; Winderlich, M.; Gamp, A.C.; Linnepe, R.; Polaschegg, C.; Filippova, K.; Lyck, R.; Engelhardt, B.; Kamenyeva, O.; et al. VE-PTP maintains the endothelial barrier via plakoglobin and becomes dissociated from VE-cadherin by leukocytes and by VEGF. *J. Exp. Med.* **2008**, *205*, 2929–2945. [[CrossRef](#)]
25. Spring, K.; Chabot, C.; Langlois, S.; Lapointe, L.; Trinh, N.T.N.; Caron, C.; Hebda, J.K.; Gavard, J.; Elchebly, M.; Royal, I. Tyrosine phosphorylation of DEP-1/CD148 as a mechanism controlling Src kinase activation, endothelial cell permeability, invasion, and capillary formation. *Blood* **2012**, *120*, 2745–2756. [[CrossRef](#)]
26. Timmerman, I.; Hoogenboezem, M.; Bennett, A.M.; Geerts, D.; Hordijk, P.L.; van Bul, J.D. The tyrosine phosphatase SHP2 regulates recovery of endothelial adherens junctions through control of β -catenin phosphorylation. *Mol. Biol. Cell* **2012**, *23*, 4212–4225. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Takahashi, K.; Matafonov, A.; Sumarriva, K.; Ito, H.; Lauhan, C.; Zemel, D.; Tsuboi, N.; Chen, J.; Reynolds, A.; Takahashi, T. CD148 Tyrosine Phosphatase Promotes Cadherin Cell Adhesion. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e112753. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Dougher, M.; Terman, B.I. Autophosphorylation of KDR in the kinase domain is required for maximal VEGF-stimulated kinase activity and receptor internalization. *Oncogene* **1999**, *18*, 1619–1627. [[CrossRef](#)]
29. Sun, Z.; Li, X.; Massena, S.; Kutschera, S.; Padhan, N.; Gualandi, L.; Sundvold-Gjerstad, V.; Gustafsson, K.; Choy, W.W.; Zang, G.; et al. VEGFR2 induces e-Src signaling and vascular permeability in vivo via the adaptor protein TSA. *J. Exp. Med.* **2012**, *209*, 1363–1377. [[CrossRef](#)]
30. Wallez, Y.; Cand, F.; Cruzalegui, F.; Wernstedt, C.; Souchelnytskyi, S.; Vilgrain, I.; Huber, P. Src kinase phosphorylates vascular endothelial-cadherin in response to vascular endothelial growth factor: Identification of tyrosine 685 as the unique target site. *Oncogene* **2007**, *26*, 1067–1077. [[CrossRef](#)]
31. Wallez, Y.; Vilgrain, I.; Huber, P. Angiogenesis: The VE-Cadherin Switch. *Trends Cardiovasc. Med.* **2006**, *16*, 55–59. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Sidibé, A.; Polena, H.; Razanajatovo, J.; Mannic, T.; Chaumontel, N.; Bama, S.; Maréchal, I.; Huber, P.; Gulino-Debrac, D.; Bouillet, L.; et al. Dynamic phosphorylation of VE-cadherin Y685 throughout mouse estrous cycle in ovary and uterus. *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* **2014**, *307*, H448–H454. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Sidibé, A.; Polena, H.; Pernet-Gallay, K.; Razanajatovo, J.; Mannic, T.; Chaumontel, N.; Bama, S.; Maréchal, I.; Huber, P.; Gulino-Debrac, D.; et al. VE-cadherin Y685F knock-in mouse is sensitive to vascular permeability in recurrent angiogenic organs. *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* **2014**, *307*, H455–H463. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

34. Vilgrain, I.; Sidibé, A.; Polena, H.; Cand, F.; Mannic, T.; Arboleas, M.; Boccard, S.; Baudet, A.; Gulino-Debrac, D.; Bouillet, L.; et al. Evidence for Post-Translational Processing of Vascular Endothelial (VE)-Cadherin in Brain Tumors: Towards a Candidate Biomarker. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e80056. [[CrossRef](#)]
35. Monaghan-Benson, E.; Burrige, K. VE-Cadherin Status as an Indicator of Microvascular Permeability. *Methods Mol. Biol.* **2013**, *1046*, 335–342. [[CrossRef](#)]
36. Cain, R.J.; Vanhaesebroeck, B.; Ridley, A.J. The PI3K p110 α isoform regulates endothelial adherens junctions via Pyk2 and Rac1. *J. Cell Biol.* **2010**, *188*, 863–876. [[CrossRef](#)]
37. Potter, M.D.; Barbero, S.; Cheresh, D.A. Tyrosine Phosphorylation of VE-cadherin Prevents Binding of p120- and β -Catenin and Maintains the Cellular Mesenchymal State. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 31906–31912. [[CrossRef](#)]
38. Moolenaar, W.H.; Kranenburg, O.; Postma, F.R.; Zondag, G.C. Lysophosphatidic acid: G-protein signalling and cellular responses. *Curr. Opin. Cell Biol.* **1997**, *9*, 168–173. [[CrossRef](#)]
39. Hla, T.; Venkataraman, K.; Michaud, J. The vascular S1P gradient—Cellular sources and biological significance. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)—Mol. Cell Biol. Lipids* **2008**, *1781*, 477–482. [[CrossRef](#)]
40. Pappu, R.; Schwab, S.R.; Cornelissen, I.; Pereira, J.P.; Regard, J.B.; Xu, Y.; Camerer, E.; Zheng, Y.-W.; Huang, Y.; Cyster, J.G.; et al. Promotion of Lymphocyte Egress into Blood and Lymph by Distinct Sources of Sphingosine-1-Phosphate. *Science* **2007**, *316*, 295–298. [[CrossRef](#)]
41. Tauseef, M.; Kini, V.; Knezevic, N.N.; Brannan, M.; Ramchandaran, R.; Fyrst, H.; Saba, J.; Vogel, S.M.; Malik, A.B.; Mehta, D. Activation of Sphingosine Kinase-1 Reverses the Increase in Lung Vascular Permeability Through Sphingosine-1-Phosphate Receptor Signaling in Endothelial Cells. *Circ. Res.* **2008**, *103*, 1164–1172. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Liu, Y.; Wada, R.; Yamashita, T.; Mi, Y.; Deng, C.-X.; Hobson, J.P.; Rosenfeldt, H.M.; Nava, V.E.; Chae, S.-S.; Lee, M.-J.; et al. Edg-1, the G protein-coupled receptor for sphingosine-1-phosphate, is essential for vascular maturation. *J. Clin. Investig.* **2000**, *106*, 951–961. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Hla, T. Sphingosine 1-phosphate receptors. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* **2001**, *64*, 135–142. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Hla, T.; Maciag, T. An abundant transcript induced in differentiating human endothelial cells encodes a polypeptide with structural similarities to G-protein-coupled receptors. *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 9308–9313. [[CrossRef](#)]
45. Hla, T. Physiological and pathological actions of sphingosine 1-phosphate. *Semin. Cell Dev. Biol.* **2004**, *15*, 513–520. [[CrossRef](#)]
46. Chun, J. International Union of Pharmacology. XXXIV. Lysophospholipid Receptor Nomenclature. *Pharmacol. Rev.* **2002**, *54*, 265–269. [[CrossRef](#)]
47. Lee, M.-J.; Thangada, S.; Claffey, K.P.; Ancellin, N.; Liu, C.H.; Kluk, M.; Volpi, M.; Sha’Afi, R.I.; Hla, T. Vascular Endothelial Cell Adherens Junction Assembly and Morphogenesis Induced by Sphingosine-1-Phosphate. *Cell* **1999**, *99*, 301–312. [[CrossRef](#)]
48. Gaengel, K.; Niaudet, C.; Hagikura, K.; Laviña, B.; Muhl, L.; Hofmann, J.J.; Ebarasi, L.; Nyström, S.; Rymo, S.; Chen, L.L.; et al. The Sphingosine-1-Phosphate Receptor S1PR1 Restricts Sprouting Angiogenesis by Regulating the Interplay between VE-Cadherin and VEGFR2. *Dev. Cell* **2012**, *23*, 587–599. [[CrossRef](#)]
49. Rosenbaum, D.M.; Rasmussen, S.G.; Kobilka, B.K. The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature* **2009**, *459*, 356–363. [[CrossRef](#)]
50. Chavez, A.; Schmidt, T.T.; Yazbeck, P.; Rajput, C.; Desai, B.; Sukriti, S.; Giantsos-Adams, K.; Knezevic, N.N.; Malik, A.B.; Mehta, D. Role of Tyr143 phosphorylation of S1PR1 in downregulating endothelial cell surface S1PR1 expression and responsiveness. *J. Cell Sci.* **2015**, *128*, 878–887. [[CrossRef](#)]
51. Leonard, A.; Grose, V.; Paton, A.W.; Paton, J.C.; Yule, D.I.; Rahman, A.; Fazal, F. Selective Inactivation of Intracellular BiP/GRP78 Attenuates Endothelial Inflammation and Permeability in Acute Lung Injury. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 1–13. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Anwar, M.; Amin, R.; Ragunathrao, V.A.B.; Matsche, J.; Karginov, A.; Minshall, R.D.; Mo, G.C.; Komarova, Y.; Mehta, D. Tyrosine phosphorylation of S1PR1 leads to chaperone BiP-mediated import to the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* **2021**, *220*, e202006021. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Shao, X.; Liu, K.; Fan, Y.; Ding, Z.; Chen, M.; Zhu, M.; Weinstein, L.S.; Li, H.; Li, H. Gas Relays Sphingosine-1-Phosphate Receptor 1 Signaling to Stabilize Vascular Endothelial-Cadherin at Endothelial Junctions to Control Mouse Embryonic Vascular Integrity. *J. Genet. Genom.* **2015**, *42*, 613–624. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Zhao, Y.D.; Ohkawara, H.; Rehman, J.; Wary, K.; Vogel, S.M.; Minshall, R.D.; Zhao, Y.-Y.; Malik, A.B. Bone Marrow Progenitor Cells Induce Endothelial Adherens Junction Integrity by Sphingosine-1-Phosphate-Mediated Rac1 and Cdc42 Signaling. *Circ. Res.* **2009**, *105*, 696–704. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Volberg, T.; Romer, L.; Zamir, E.; Geiger, B. pp60c-src and related tyrosine kinases: A role in the assembly and reorganization of matrix adhesions. *J. Cell Sci.* **2001**, *114*, 2279–2289. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Vouret-Craviari, V.; Bourcier, C.; Boulter, E.; Van Obberghen-Schilling, E. Distinct signals via Rho GTPases and Src drive shape changes by thrombin and sphingosine-1-phosphate in endothelial cells. *J. Cell Sci.* **2002**, *115*, 2475–2484. [[CrossRef](#)]
57. Vilgrain, I.; Chinn, A.; Gaillard, I.; Chambaz, E.M.; Feige, J.-J. Hormonal regulation of focal adhesions in bovine adrenocortical cells: Induction of paxillin dephosphorylation by adrenocorticotrophic hormone. *Biochem. J.* **1998**, *332*, 533–540. [[CrossRef](#)]
58. McLean, G.W.; Carragher, N.O.; Avizienyte, E.; Evans, J.; Brunton, V.G.; Frame, M.C. The role of focal-adhesion kinase in cancer—A new therapeutic opportunity. *Nat. Rev. Cancer* **2005**, *5*, 505–515. [[CrossRef](#)]
59. Wang, F.; Nobes, C.D.; Hall, A.; Spiegel, S. Sphingosine 1-phosphate stimulates Rho-mediated tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase and paxillin in Swiss 3T3 fibroblasts. *Biochem. J.* **1997**, *324 Pt 2*, 481–488. [[CrossRef](#)]

60. Sanchez, A.M.; Flamini, M.I.; Zullino, S.; Gopal, S.; Genazzani, A.R.; Simoncini, T. Estrogen receptor- promotes endothelial cell motility through focal adhesion kinase. *Mol. Hum. Reprod.* **2011**, *17*, 219–226. [[CrossRef](#)]
61. Fu, P.; Usatyuk, P.V.; Jacobson, J.; Cress, A.E.; Garcia, J.G.N.; Salgia, R.; Natarajan, V. Role Played by Paxillin and Paxillin Tyrosine Phosphorylation in Hepatocyte Growth Factor/Sphingosine-1-Phosphate-Mediated Reactive Oxygen Species Generation, Lamellipodia Formation, and Endothelial Barrier Function. *Pulm. Circ.* **2015**, *5*, 619–630. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Jean, C.; Chen, X.L.; Nam, J.-O.; Tancioni, I.; Uryu, S.; Lawson, C.; Ward, K.K.; Walsh, C.T.; Miller, N.L.; Ghassemian, M.; et al. Inhibition of endothelial FAK activity prevents tumor metastasis by enhancing barrier function. *J. Cell Biol.* **2014**, *204*, 247–263. [[CrossRef](#)]
63. Wang, L.; Bittman, R.; Garcia, J.G.; Dudek, S.M. Junctional complex and focal adhesion rearrangement mediates pulmonary endothelial barrier enhancement by FTY720 S-phosphonate. *Microvasc. Res.* **2015**, *99*, 102–109. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Prager, B.; Spampinato, S.F.; Ransohoff, R.M. Sphingosine 1-phosphate signaling at the blood–brain barrier. *Trends Mol. Med.* **2015**, *21*, 354–363. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Hübner, K.; Cabochette, P.; Diéguez-Hurtado, R.; Wiesner, C.; Wakayama, Y.; Grassme, K.S.; Hubert, M.; Guenther, S.; Belting, H.-G.; Afolter, M.; et al. Wnt/ β -catenin signaling regulates VE-cadherin-mediated anastomosis of brain capillaries by counteracting Slpr1 signaling. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 4860. [[CrossRef](#)]
66. Xing, Y.; Takemaru, K.-I.; Liu, J.; Berndt, J.D.; Zheng, J.J.; Moon, R.T.; Xu, W. Crystal Structure of a Full-Length β -Catenin. *Structure* **2008**, *16*, 478. [[CrossRef](#)]
67. Bhattacharya, R.; SenBanerjee, S.; Lin, Z.; Mir, S.; Hamik, A.; Wang, P.; Mukherjee, P.; Mukhopadhyay, D.; Jain, M.K. Inhibition of Vascular Permeability Factor/Vascular Endothelial Growth Factor-mediated Angiogenesis by the Kruppel-like Factor KLF2. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 28848–28851. [[CrossRef](#)]
68. Kerdiles, Y.M.; Beisner, D.R.; Tinoco, R.; Dejean, A.S.; Castrillon, D.H.; DePinho, R.A.; Hedrick, S.M. Foxo1 links homing and survival of naive T cells by regulating L-selectin, CCR7 and interleukin 7 receptor. *Nat. Immunol.* **2009**, *10*, 176–184. [[CrossRef](#)]
69. Groenendijk, B.C.W.; Van Der Heiden, K.; Hierck, B.P.; Poelmann, R.E. The Role of Shear Stress on ET-1, KLF2, and NOS-3 Expression in the Developing Cardiovascular System of Chicken Embryos in a Venous Ligation Model. *Physiology* **2007**, *22*, 380–389. [[CrossRef](#)]
70. Dekker, R.J.; Van Soest, S.; Fontijn, R.D.; Salamanca, S.; De Groot, P.G.; van Bavel, E.; Pannekoek, H.; Horrevoets, A.J.G. Prolonged fluid shear stress induces a distinct set of endothelial cell genes, most specifically lung Krüppel-like factor (KLF2). *Blood* **2002**, *100*, 1689–1698. [[CrossRef](#)]
71. Wang, N.; Miao, H.; Li, Y.-S.; Zhang, P.; Haga, J.H.; Hu, Y.; Young, A.; Yuan, S.; Nguyen, P.; Wu, C.-C.; et al. Shear stress regulation of Krüppel-like factor 2 expression is flow pattern-specific. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2006**, *341*, 1244–1251. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Chlench, S.; Disassa, N.M.; Hohberg, M.; Hoffmann, C.J.; Pohlkamp, T.; Beyer, G.; Bongrazio, M.; Da Silva-Azevedo, L.; Baum, O.; Pries, A.R.; et al. Regulation of Foxo-1 and the angiopoietin-2/Tie2 system by shear stress. *FEBS Lett.* **2007**, *581*, 673–680. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Sun, X.; Mathew, B.; Sammani, S.; Jacobson, J.R.; Garcia, J.G.N. Simvastatin-induced sphingosine 1–phosphate receptor 1 expression is KLF2-dependent in human lung endothelial cells. *Pulm. Circ.* **2017**, *7*, 117–125. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Taddei, A.; Giampietro, C.; Conti, A.; Orsenigo, F.; Breviaro, F.; Pirazzoli, V.; Potente, M.; Daly, C.; Dimmeler, S.; Dejana, E. Endothelial adherens junctions control tight junctions by VE-cadherin-mediated upregulation of claudin-5. *Nature* **2008**, *10*, 923–934. [[CrossRef](#)]
75. Morini, M.F.; Giampietro, C.; Corada, M.; Pisati, F.; Lavarone, E.; Cunha, S.I.; Conze, L.L.; O'Reilly, N.; Joshi, D.; Kjaer, S.; et al. VE-Cadherin-Mediated Epigenetic Regulation of Endothelial Gene Expression. *Circ. Res.* **2018**, *122*, 231–245. [[CrossRef](#)]
76. Cai, Y.; Bolte, C.; Le, T.; Goda, C.; Xu, Y.; Kalin, T.V.; Kalinichenko, V.V. FOXF1 maintains endothelial barrier function and prevents edema after lung injury. *Sci. Signal.* **2016**, *9*, ra40. [[CrossRef](#)]
77. Ren, X.; Ustiyani, V.; Pradhan, A.; Cai, Y.; Havrilak, J.; Bolte, C.S.; Shannon, J.M.; Kalin, T.V.; Kalinichenko, V.V. FOXF1 Transcription Factor Is Required for Formation of Embryonic Vasculature by Regulating VEGF Signaling in Endothelial Cells. *Circ. Res.* **2014**, *115*, 709–720. [[CrossRef](#)]
78. Hecht, A.; Kemler, R. Curbing the nuclear activities of β -catenin. *EMBO Rep.* **2000**, *1*, 24–28. [[CrossRef](#)]
79. Xiao, K.; Allison, D.F.; Buckley, K.M.; Kottke, M.D.; Vincent, P.A.; Faundez, V.; Kowalczyk, A.P. Cellular levels of p120 catenin function as a set point for cadherin expression levels in microvascular endothelial cells. *J. Cell Biol.* **2003**, *163*, 535–545. [[CrossRef](#)]
80. Hatanaka, K.; Simons, M.; Murakami, M. Phosphorylation of VE-cadherin controls endothelial phenotypes via p120-catenin coupling and Rac1 activation. *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* **2011**, *300*, H162–H172. [[CrossRef](#)]
81. Ito, T.; Kuriyama, N.; Kato, H.; Matsuda, A.; Mizuno, S.; Usui, M.; Sakurai, H.; Isaji, S. Sinusoidal protection by sphingosine-1-phosphate receptor 1 agonist in liver ischemia-reperfusion injury. *J. Surg. Res.* **2018**, *222*, 139–152. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
82. Scotti, L.; Di Pietro, M.; Pascuali, N.; Irusta, G.; de Zúñiga, I.; Peña, M.G.; Pomilio, C.; Saravia, F.; Tesone, M.; Abramovich, D.; et al. Sphingosine-1-phosphate restores endothelial barrier integrity in ovarian hyperstimulation syndrome. *Mol. Hum. Reprod.* **2016**, *22*, 852–866. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Di Pietro, M.; Pascuali, N.; Scotti, L.; Irusta, G.; Bas, D.; May, M.; Tesone, M.; Abramovich, D.; Parborell, F. In vivo intrabursal administration of bioactive lipid sphingosine-1-phosphate enhances vascular integrity in a rat model of ovarian hyperstimulation syndrome. *Mol. Hum. Reprod.* **2017**, *23*, 417–427. [[CrossRef](#)]

84. Pi, J.; Tao, T.; Zhuang, T.; Sun, H.; Chen, X.; Liu, J.; Cheng, Y.; Yu, Z.; Zhu, H.H.; Gao, W.-Q.; et al. A MicroRNA302-367-Erk1/2-Klf2-S1pr1 Pathway Prevents Tumor Growth via Restricting Angiogenesis and Improving Vascular Stability. *Circ. Res.* **2017**, *120*, 85–98. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. Liu, S.; Ni, C.; Zhang, D.; Sun, H.; Dong, X.; Che, N.; Liang, X.; Chen, C.; Liu, F.; Bai, J.; et al. S1PR1 regulates the switch of two angiogenic modes by VE-cadherin phosphorylation in breast cancer. *Cell Death Dis.* **2019**, *10*, 200. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
86. Selkirk, J.V.; Dines, K.C.; Yan, Y.G.; Ching, N.; Dalvie, D.; Biswas, S.; Bortolato, A.; Schkeryantz, J.M.; Lopez, C.; Ruiz, I.; et al. Deconstructing the Pharmacological Contribution of Sphingosine-1 Phosphate Receptors to Mouse Models of Multiple Sclerosis Using the Species Selectivity of Ozanimod, a Dual Modulator of Human Sphingosine 1-Phosphate Receptor Subtypes 1 and 5. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2021**, *379*, 386–399. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
87. Han, C.; He, X.; Xia, X.; Guo, J.; Liu, A.; Liu, X.; Wang, X.; Li, C.; Peng, S.; Zhao, W.; et al. Sphk1/S1P/S1PR1 Signaling is Involved in the Development of Autoimmune Thyroiditis in Patients and NOD.H-2h4 Mice. *Thyroid* **2019**, *29*, 700–713. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
88. Zheng, Z.; Zeng, Y.-Z.; Ren, K.; Zhu, X.; Tan, Y.; Li, Y.; Li, Q.; Yi, G.-H. S1P promotes inflammation-induced tube formation by HLECs via the S1PR1/NF-κB pathway. *Int. Immunopharmacol.* **2018**, *66*, 224–235. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

I.5. Conclusion de l'article et perspectives

Dans cette étude, nous avons décrit pour la première fois un nouveau mécanisme par lequel la mutation du site Y685 de la VE-cadhérine a la capacité de réguler l'expression de plus de 800 gènes endothéliaux notamment ceux impliqués dans l'angiogenèse et l'adhésion cellulaire de la vasculature pulmonaire. Parmi les gènes dérégulés par la mutation, nous avons sélectionné un gène fortement exprimé dans la cellule endothéliale et retrouvé surexprimé chez les KI: S1pr1. Comme il a été largement énoncé dans la revue, S1PR1 est décrit comme une protéine protectrice permettant la stabilisation des vaisseaux, le maintien des jonctions et donc de l'intégrité et possède des caractéristiques anti-angiogéniques. S1PR1 est notamment connu pour stabiliser la VE-cadhérine à la membrane et inhiber VEGFR2 et son action (Garnier et Vilgrain 2023).

La mutation Y685F sur la VE-cadhérine favorise la liaison du facteur de transcription FOXF1 sur le promoteur S1pr1 conduisant à la surexpression de S1pr1. Ces deux acteurs ont été largement décrits dans la littérature comme étant capable de restaurer les fonctions de la barrière endothéliale. Ces données nous montrent que Y685F de la VE-cadhérine promeut l'intégrité de la barrière par l'augmentation de la fixation de FOXF1 sur le promoteur S1PR1.

De plus la β -caténine, un partenaire majeur de la VE-cadhérine, est décrite comme un régulateur d'expression génique via son interaction avec des protéines pouvant elles, se lier à l'ADN. Dans notre cas, nous avons pu démontrer que β -caténine se délocalisait dans les noyaux et pouvait ainsi conduire à la reprogrammation des gènes endothéliaux. Bien que notre étude soit principalement centrée sur l'étude de S1pr1, d'autres gènes retrouvés dérégulés par la mutation sont impliqués dans le contrôle de l'angiogenèse et l'adhésion cellulaire suggèrent un rôle plus large de la mutation sur 685 dans la stabilisation des vaisseaux. Parmi ces gènes, certains sont des phosphatases, des tyrosines kinases et des régulateurs de l'activité de ces protéines dont leur étude nous permettrait d'avoir un point de vue plus approfondi sur la régulation des voies de signalisation autour de la VE-cadhérine et sur l'état de phosphorylation de ses partenaires. Ces gènes présentent un intérêt tout aussi important et pourraient être sous le contrôle direct de β -caténine. Etant donné que la β -caténine a besoin d'une protéine pour se fixer à l'ADN, il serait intéressant de savoir si cette protéine pourrait être FOXF1. Notre théorie serait que la perte de l'interaction de β -caténine avec VE-cadhérine conduit à la délocalisation de β -caténine dans le noyau qui formerait un complexe avec FOXF1 et ciblerait l'expression de S1pr1.

En termes mécanistiques, nous avons caractérisé les potentielles voies de signalisation régulées par la mutation. Nous avons analysé la voie VEGF-VEGFR2 qui est largement décrite comme un régulateur de VE-cadhérine notamment par sa capacité à activer Src qui, lui, phosphoryle la VE-cadhérine sur Y685. Nos données transcriptomiques ont montré une sous-expression de VEGFR2 chez les souris mutées. Ce résultat est en accord avec la surexpression de S1PR1 qui peut inhiber VEGFR2 (Gaengel et al. 2012), d'autant plus que nous avons démontré que cette inhibition était VEGF-A indépendante. De manière surprenante, nous avons constaté que l'activité de Src était augmentée chez les souris mutées. Ce résultat pourrait s'expliquer l'absence de son inhibition par Csk qui ne peut plus se lier à Y685 phosphorylé de la VE-cadhérine. Étant donné que Src ne peut plus phosphoryler son site de prédilection Y685, elle va phosphoryler Y731 à la place, conduisant à la perte d'interaction de la β -caténine. Il serait pertinent de regarder la phosphorylation Y951 de VEGFR2 impliquée dans l'activation de Src. Enfin il serait tout aussi intéressant d'étudier l'effet de la mutation sur la régulation des phosphatases comme VE-PTP, mais il est

également possible de s'intéresser au cas de Yes qui est connue pour phosphoryler Y685 ainsi que son mécanisme d'action suite à cette mutation.

Les études in vitro nous ont montré une diminution de la migration, de la capacité de bourgeonnement, et de prolifération mais un maintien de la VE-cadhérine à la membrane et une plus forte adhésion au substrat chez les cellules endothéliales mutées. Tous ces critères altérés nous suggèrent que la cellule endothéliale perd ses capacités angiogéniques induite par la mutation. Ces résultats pourraient être expliqués par l'action de S1PR1 et l'inhibition de VEGFR2 et de son site Y1173 impliqué dans la migration. Nous pourrions le vérifier par un siRNA de S1pr1 sur les cellules endothéliales mutés et les comparer au WT et au KI.

Au niveau in vitro, nous avons pu constater une diminution du dépôt de collagène autour des vaisseaux, et pas de différence de perméabilité au niveau de l'espace alvéolaire. Ces données mettent en évidence que la phénylalanine de VE-cadhérine en position 685 augmente l'intégrité de la barrière endothéliale dans le poumon. Aucune différence n'avait pu être décelée entre les souris WT et les souris KI car elles étaient viables et fertiles. De ce fait, il serait intéressant de voir si en termes de capacité respiratoire des altérations pouvaient être dénombrées en condition physiologique. Il serait tout aussi logique de faire la mutation sur Y685 de la VE-cadhérine sur les cellules endothéliales en condition pathologique par exemple IPF, et regarder si cette mutation pourrait induire une diminution des symptômes, de la fibrose et de la perméabilité.

En conclusion, ce travail introduit un nouveau rôle de la VE-cadhérine mutée sur un seul acide aminé dans la reprogrammation endothéliale en termes d'adhésion cellulaire, d'angiogenèse, de migration, de prolifération et dans l'intégrité de la barrière. Il semble donc essentiel d'étudier comment cet unique site est à l'origine de la régulation de nombreuses voies de signalisation jusqu'à la transcription des gènes pour favoriser les études en des conditions pathologiques et peut-être identifier des cibles thérapeutiques potentielles.

CHAPITRE II :

Les sphéroïdes de microtumeur fournissent un modèle pour l'étude des molécules impliquées dans l'organisation vasculaire : le cas de la VE-cadhérine.

II.1. Contexte et objectif d'étude.

Étant donné que chaque endothélium est dépendant d'un organe, il est important de bien définir le rôle de la VE-cadhérine dans chacune des conditions, et notamment son rôle en condition pathologique. Dans ce chapitre, nous allons nous intéresser à l'angiogenèse tumorale du cancer du sein triple négative (TNBC). Le TNBC est une sous-catégorie du cancer du sein dans lequel les cellules n'expriment pas les récepteurs œstrogène, progestérone et epidermal growth factor 2 (EGF-2). Ce sous-type est l'un des plus agressifs du fait de sa haute capacité métastatique et de son angiogenèse tumorale (Dent et al. 2007). L'angiogenèse pathologique implique un déséquilibre entre les facteurs pro et anti-angiogéniques présents dans le microenvironnement et est observée dans les tumeurs dont les vaisseaux sont mal formés, ont un débit très lent, et sont perméables. Les cellules présentes dans le microenvironnement cancéreux peuvent sécréter ces facteurs angiogéniques et induire l'angiogenèse qui va fournir aux tumeurs tous les nutriments nécessaires à leur croissance. Dans le cas de TNBC, les vaisseaux formés sont qualifiés d'immatures car ils sont désorganisés, très hétérogènes et avec une grande perméabilité, conduisant à la résistance aux médicaments (Malekian et al. 2020). Ces caractéristiques anormales pourraient provoquer des modifications au niveau de la VE-cadhérine. En effet, comme il a été dit dans le chapitre précédent et dans l'introduction, sous l'expression de facteur angiogéniques comme VEGF, la VE-cadhérine a été retrouvée clivée et une partie soluble de 90 kDa a pu être identifiée comme biomarqueur chez des patients atteints de glioblastome, de cancer du rein, de cancer du sein et d'arthrose rhumatoïde (Sidibé et al. 2012) (Polena et al. 2018) (Rochefort et al. 2017).

Dans notre cas nous avons étudié les modifications de la VE-cadhérine dans un modèle 3D de TNBC. La mise au point de ce modèle de sphéroïdes de microtumeurs 3D comprenant des cellules endothéliales et des cellules cancéreuses de sein nous permettra de reproduire un microenvironnement tumoral minimal suffisant pour analyser les effets du microenvironnement sur la VE-cadhérine. Nous pourrions déterminer si ce modèle pourrait être utilisé pour tester l'efficacité d'un médicament et in fine si ce modèle représente une bonne alternative au modèle animal.

Les objectifs de cette étude seront :

- Mettre au point un modèle 3D mimant le microenvironnement tumoral. Pour cela il faudra d'abord déterminer le ratio cellule endothéliale et cellule tumorale en co-culture nécessaire pour obtenir une sécrétion de facteurs pro-angiogéniques suffisante et observer des modifications sur la VE-cadhérine.
- Déterminer si ce microenvironnement induit une modification de la VE-cadhérine et de l'angiogénèse.
- Déterminer si ce modèle 3D est pertinent pour l'étude de l'efficacité des médicaments en utilisant comme exemple l'analyse de l'efficacité d'un inhibiteur de tyrosine kinase sunitinib.

II.2. Les principaux résultats

L'étude de la co-culture de cellule endothéliales humaines (HUVECs) en présence de cellules cancéreuses de sein (MDA-MB-231) était suffisante pour activer les voies de signalisations conduisant la phosphorylation de la Y685 de la VE-cadhérine. Afin de déterminer également la forme clivée de la VE-cadhérine, les cellules en co-culture ont été mises en contact avec un facteur angiogénique VEGF. Il a pu être observé la présence de VE-cadhérine soluble dans les cellules en co-culture et de manière plus importante que les HUVECs seules. Ces résultats confirment que les cellules tumorales sécrètent des facteurs conduisant au clivage de la VE-cadhérine.

Afin d'être en conditions plus représentatives des conditions tumorales, un modèle de sphéroïde 3D a été mis au point avec les cellules tumorales et les HUVECs. Ce modèle nous a permis de vérifier la présence de la VE-cadhérine dans les sphéroïdes. De plus, ce système en 3D nous a permis de mettre en évidence la phosphorylation de la VE-cadhérine sur le site Y685. Ce résultat nous suggère que le modèle mis au point reproduit correctement un microenvironnement tumoral. Par la suite, nous nous sommes intéressés à l'effet de ce microenvironnement sur l'organisation du réseau endothélial. En présence du sphéroïde de cellules tumorales, il a été constaté un réseau beaucoup plus développé. Ces résultats démontrent que les sphéroïdes favorisent la réorganisation du réseau et donc l'angiogénèse, et confirment la pertinence de ce modèle car ces résultats correspondent à ceux retrouvés dans une autre étude *in vivo*. Par la suite, nous avons voulu confirmer si ce système 3D pouvait avoir une application clinique. Pour cela, nous avons testé l'efficacité du sunitinib, un inhibiteur de tyrosine kinases, sur les sphéroïdes. Les résultats nous ont confirmé une inhibition dose-dépendante de la phosphorylation sur Y685 de la VE-cadhérine ce qui en fait une cible du sunitinib. Ce test a ainsi mis en évidence la pertinence du modèle 3D dans l'étude de l'efficacité des médicaments sur les microenvironnements tumoraux et pourrait devenir une alternative à l'utilisation de modèle animal.

II.3. Article:

Microtumor Spheroids Provide a Model for Studying Molecules Involved in Vascular Organization: An Illustrative Study for VE-cadherin

Microtumor Spheroids Provide a Model for Studying Molecules Involved in Vascular Organization: An Illustrative Study for VE-cadherin

PAUL DEMBÉLÉ^{1,2,3}, OLIVIA GARNIER^{1,2,3}, DONALD K. MARTIN^{2,4} and ISABELLE VILGRAIN^{1,2,3}

¹French Institute of Health and Medical Research, U1292 Biology and Biotechnology for Health (Biosanté), Grenoble, France;

²University Grenoble Alpes, Biology and Biotechnology for Health (Biosanté), Grenoble, France;

³The French Alternative Energies and Atomic Energy Commission (CEA),

Department of Fundamental Research, Institute of Interdisciplinary

Research of Grenoble/Department of Health, Grenoble, France;

⁴University Grenoble Alpes, French National Centre for Scientific Research,

VetAgro Sup, Institute of Engineering University,

Translational Innovation in Medicine and Complexity-SyNaBi UMR 5525, Grenoble, France

Abstract. *Background/Aim:* A growing body of research is contributing to the development of three-dimensional (3D) tissue models to close the gap between two-dimensional (2D) cell culture and animal models. Here, we report fundamental studies to confirm the modification of vascular endothelial (VE)-cadherin by a tumor microenvironment using 2D and 3D in vitro models of triple-negative breast cancer cells co-cultured with endothelial cells. *Materials and Methods:* Breast cancer cells were cultivated as a monolayer (2D) on plates for 5 days or as microtumor spheroids (3D) with endothelial cells for up to 6 days. Phosphotyrosine-containing protein panels were analyzed in both cell types and upon co-culture. Microtumor spheroid size was evaluated via phase contrast microscopy. The content of VE-cadherin and phospho-VE-cadherin was determined. The effect of microtumor spheroid on the capillary network formed by endothelial cells was quantified by ImageJ Angiogenesis Analyzer. Sunitinib was used to determine drug efficacy in this model. *Results:* The activity of signaling pathways in endothelial cells, including phosphorylation of Y⁶⁸⁵-VE-cadherin, was increased by the presence of breast cancer cells. In the 3D co-culture system,

we established a ratio of the two cell types which allowed viability for 6 days. As a proof-of-concept of the 3D co-culture system for the process of drug discovery and development, we used the system to quantify the efficacy of sunitinib on the phosphorylation of VE-cadherin. *Conclusion:* In summary, we established 2D and 3D breast cancer-endothelial cell test systems compatible for detection of minimally tyrosine-phosphorylated proteins including VE-cadherin. The systems are capable of quantifying the effect of drugs on a tissue model of angiogenesis. This is a step towards developing tools for drug-efficacy testing that do not rely on live animals.

Breast cancer is the most common cancer among women and the second-leading cause of cancer-related death in women (1). Triple-negative breast cancer (TNBC) is a subset of breast cancer that accounts for the majority of breast cancer deaths due to a lack of specific treatment targets (2, 3). TNBC cells do not express estrogen receptors, progesterone receptors, nor the human epidermal growth factor receptor-2. Furthermore, TNBC has one of the highest metastatic potentials of all breast cancer subtypes, and this prevalence for metastasis contributes to the recurrence of tumors and cancer-associated mortality (4). Indeed, the high metastatic potential of TNBC is tightly associated with the high degree of vascularity feeding the tumor, which is characterized by the intratumor microvascular density (4). Factors secreted from cancer cells to the tumor microenvironment can cause induction of new blood vessels and tumor cell dissemination (5). The development of new blood vessels in the tumor microenvironment is an essential component of tumor progression (6). In comparison to mature vasculature, the new vessels formed in TNBC tumors are

Correspondence to: Dr. Isabelle Vilgrain, Interdisciplinary Institute Research of Grenoble (IRIG), Biology and Biotechnology for Health (Biosanté), Mixed Unit INSERM/CEA/UGA U1292, CEA Grenoble, 17 avenue des Martyrs, 38054 Grenoble Cedex 09, France. E-mail: isabelle.vilgrain@cea.fr

Key Words: Three-dimensional model, breast cancer cells, endothelial cells, in vivo mimicking.

typically immature and characterized by disorganization, high heterogeneity, and high permeability, which cause drug resistance (7-10). Such a disorganized angiogenesis suggests a disruption to the establishment and maintenance of endothelial integrity, and consequently a modification in the function of vascular endothelial (VE)-cadherin. VE-cadherin is expressed exclusively in endothelial cells, where it has important roles in angiogenesis, cell-to-cell adhesion, and transduction of the vascular endothelial growth factor (VEGF) pathway (11). VE-cadherin is a 125-kDa transmembrane glycoprotein composed of five extracellular cadherin repeats (552 amino acids) involved in calcium-dependent homophilic adhesion; a transmembrane region (21 amino acids); and a cytoplasmic domain (164 amino acids,) comprising the juxtamembrane domain that binds p120 catenin, and the carboxyl-terminal domain that interacts with β -catenin or plakoglobin (11). The extracellular domain of VE-cadherin can be cleaved under pathological conditions to produce a soluble VE-cadherin protein of 90 kDa that is found in the blood. We and others have determined that soluble VE-cadherin is a human blood biomarker of rheumatoid arthritis, hereditary angioedema, glioblastoma, breast, and kidney cancer (12-18). The cytoplasmic domain of VE-cadherin contains nine tyrosines that are potential target sites for tyrosine kinases. We have demonstrated that tumor necrosis factor α (12) and VEGF (19) both induced the activation of the tyrosine kinase Src which belongs to the family of non-receptor tyrosine kinases. As a consequence, it induces the tyrosine phosphorylation of VE-cadherin and leads to endothelial cell-to-cell dissociation. This does not occur in normal healthy vessels where endothelial cells are tightly bound to each other. We were the first to identify that one tyrosine (Y⁶⁸⁵) in the cytoplasmic domain of VE-cadherin is a highly specific target for Src tyrosine kinase. We confirmed this target in experiments with human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) *in vitro* and mouse ovary and uterus during the estrus cycle *in vivo* (20, 21). Importantly, we also confirmed that tyrosine Y⁶⁸⁵ is the target for Src-dependent phosphorylation in human tumor samples from patients with glioblastoma (15). These studies suggest that the tumor microenvironment is responsible for VE-cadherin phosphorylation at Y⁶⁸⁵ and the cleavage of the extracellular domain.

The use of three-dimensional (3D) tissue models is closing the gap between two-dimensional (2D) cell culture and animal models (22-25). Here, in that context, we report fundamental studies confirming the modification of VE-cadherin by a tumor microenvironment using 2D and 3D *in vitro* models of TNBC cells co-cultured with endothelial cells. The 2D model established the ratio of endothelial to TNBC cells that was necessary to quantify the modification of VE-cadherin induced by the presence of TNBC cells. Then we developed a 3D microtumor spheroid model comprised of breast cancer cells and endothelial cells capable of mimicking tumor growth *in vitro*. This 3D spheroid model

reproduced the minimal tumor microenvironmental conditions that are required to analyze the molecular events leading to VE-cadherin modification and to vascular network maturation. Finally, we used the tyrosine kinase inhibitor sunitinib (Sutent[®]) to demonstrate the usefulness of these 3D microtumor spheroid models to perform high-throughput screening of therapeutic molecules for anti-angiogenic activities, particularly through modifications to VE-cadherin.

Materials and Methods

Antibodies. We used the following commercially available antibodies: mouse monoclonal antibody to human VE-cadherin (clone BV9; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), monoclonal anti-phosphotyrosine (clone 4G10; Millipore, Paris, France), rabbit anti-phospho Y⁶⁸⁵-VE-cadherin (produced in the laboratory) and the mouse polyclonal anti- β -actin (clone AC-15; Sigma-Aldrich, St Quentin-Fallavier, France). As secondary antibodies, we used horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse and anti-goat immunoglobulin G antibodies (Bio-Rad Laboratories, Marnes la Coquette, France).

Cell culture in 2D. Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were obtained from Lonza (Levallois-Perret, France) and were used until passage 4. MDA-MB-231 TNBC cells (European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC 92020424), Salisbury, UK) were grown in P100 culture dishes in Gibco[®] Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) plus GlutaMAX 4.5 g D-glucose plus pyruvate culture medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS). Subculturing was performed three times a week at a subculturing ratio of about 1:3 to 1:6. For co-culture in 2D, 10 000 MDA-MB-231 cells were added on top of a monolayer of HUVECs.

Production of microtumor spheroids. The production and culture of the spheroids were performed in 96-well plates. Noble Agar (ThermoFisher Scientific, Illkirch-Graffenstaden, France) was dissolved in sterile water (1.42 g/30 ml) and then 15 ml of this medium was diluted in 37.5 ml of DMEM without serum. Sixty microliters of the mixture were quickly added to each well of the 96-well plates. These plates were then stored at 4°C until use. MDA-MB-231 cells were cultured in tissue culture dishes (P100) containing DMEM supplemented with 10% FBS and 1% penicillin-streptomycin. HUVECs were cultured in complete medium which comprised M199 containing 20% FBS, 0.1% antibiotic-antimycotic and 0.2% low serum growth supplement. HUVECs were grown until 80% confluence, and then were incubated in 10 μ g/ml of 5-chloromethyl fluorescein diacetate (CellTracker[™] Green CMFDA (ThermoFisher Scientific) for 30 min. The cells were then rinsed with phosphate-buffered saline (PBS) without CaCl₂/MgCl₂ then kept in complete medium for half a day before trypsinization. The cells were rinsed with PBS, and treated with 0.05% trypsin/ethylene diamine tetraacetic acid for 10 min. The spheroids were produced by adding 50 μ l of M199 medium containing 750 HUVECs and 750 MDA-MB-231 cells to each well of a 96-well plate. The plate was centrifuged at 400 \times g for 5 min, and then incubated at 37°C for 2 h. A volume of 50 μ l of 20% growth factor-reduced Matrigel was added to each well and the cells were allowed to form tumor spheroids overnight at 37°C. The next day, 90 μ l of medium (50% DMEM/50% M199, 10% FBS, 1% penicillin-

streptomycin) was added to each well. The growth of the microtumor spheroids was followed by fluorescence microscopy.

Influence of microtumor spheroids on 3D endothelial cell networks. Endothelial cell networks were allowed to self-assemble in a Matrigel microenvironment enclosed in each well of a 48-well plate. The networks were formed by first plating 150 μ l of Matrigel into each well, incubating at 37°C for 1 h, and then adding 2×10^5 HUVECs labeled with CellTracker™ on top of the Matrigel. The HUVECs started to form endothelial tube-like networks after 2 h, and then one MDA-MB-231 microtumor spheroid (formed as described above and allowed to grow for 5 days) was transferred onto HUVECs in the 48-well plate. The reorganization of the vascular network in the presence of a microtumor spheroid was then followed by fluorescence microscopy. Images were captured using a fluorescence microscope and analyzed using the Angiogenesis analyzer developed for ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, MA, USA) (26).

Cell lysates, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and western blotting. The cells were lysed on ice in a lysis buffer that contained 20 mM Tris HCl (pH 7.0), 0.27 M sucrose, 1% Triton X-100, 1 mM dithiothreitol, 1 mM Ethylene diamine tetraacetic acid, 1 mM ethylene glycol-bis(2-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid, 2 mM Na₂VO₄, 1 mM benzamide and 25 μ g/ml leupeptin. The cell suspension was then homogenized with using a Potter-Elvehjem apparatus for 2 min and then sonicated for 30 s before centrifugation for 10 min at 20,800 \times g at 4°C. The protein concentration in the cell lysates was determined using a micro-bicinchoninic acid protein assay reagent kit (Fisher Scientific SAS, Illkirch, France). Laemmli buffer (2X)-dithiothreitol (0.5M v/v) was added to the cell lysate. Precast Mini Protean gel TGX stain Free Tm (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) 7.5% and 10% acrylamide were used with Bio-Rad migration buffer (25 mM Tris, 192 mM glycine, 0.1% SDS, pH 8.3). After migration, the proteins were transferred onto nitrocellulose for 1 h and were either stained with Ponceau Red or incubated with PBS/Tween-0.05%/milk 5% for 20 min, labeled with primary antibody and then revealed with horseradish peroxidase-labeled secondary antibody. The immunoreactive proteins were detected with ECL™ substrate (Western Lighting Plus Perkin Elmer, Villebon/Yvette, France) and visualized in ChemiDoc™ (Bio-Ra. Band intensity was quantified using ImageJ software and normalized against a loading control.

Effect of Suten® on VE-cadherin phosphorylation in microtumor spheroids. The microtumor spheroids were produced as described above. After serum starvation for 4 h, the microtumor spheroids were pretreated with 10 μ M Na₂VO₄ as mentioned above and Suten® was added at two different concentrations (10 and 20 μ M) for 30 min at 37°C. Then the cells were lysed in 100 μ l of lysis buffer on ice. After centrifugation at 20,800 \times g for 10 min, the proteins extracted were assayed using a micro-bicinchoninic acid protein assay. Lysates were analyzed by SDS-PAGE on 10% polyacrylamide gels with western blotting (5 μ g of total protein lysate per lane).

Soluble VE-cadherin analysis in 2D co-culture conditioned medium. After 3 days of culture, 60 co-cultured spheroids were placed in each well of a 6-well plate and stimulated for 60 min with 3 ml of medium containing 100 ng/ml VEGF (PromCell, Rocky Hill, NJ, USA). The medium was then collected, centrifuged at 50 \times g for 5 min to remove all debris then concentrated approximately 15-fold using an Amicon® Ultra-15 Centrifugal Filter Unit (Merck KGaA,

Darmstadt, Germany). All media were then analyzed by SDS-PAGE and western blotting with VE-cadherin antibody.

Statistical analysis. The experiments were performed at least three times under identical conditions with similar results. Continuous variables are presented as the mean with standard error of the mean and compared with the use of Student's *t*-test when normally distributed, and as median with interquartile range and compared with two-tailed Mann-Whitney *U*-test when non-normally distributed. A value of *p* < 0.05 was considered significant.

Results

Cell culture in 2D. We first utilized a 2D cell culture system with HUVECs and MDA-MB-231 TNBC cells (Figure 1A) to establish a point of reference in analyzing the influence of tumor cells on endothelial cell signaling. These experiments targeted tyrosine phosphorylation of proteins since this is a major cell signaling process that is dysregulated in cancer. We identified the tyrosine-containing proteins in HUVECs and in MDA-MB-231 cells (Figure 1B) using either 5, 10, or 15 μ g of cell proteins. Although we observed only a few such proteins in HUVECs, in MDA-MB-231 cells, several proteins with apparent molecular weights ranging between 220 and 37 kDa clearly displayed enhanced tyrosine phosphorylation. Then we tested the 2D co-culture system in which MDA-MB-231 cells were added to HUVECs (Figure 1C). The co-cultured cells were lysed, and tyrosine phosphorylation was analyzed in HUVECs alone compared to when co-cultured with MDA-MB-231 cells. As shown in Figure 1D, tyrosine phosphorylation was barely detectable in HUVECs alone, compared to a large increase in tyrosine phosphorylation in those co-cultured with MDA-MB-231 cells. No specific phosphorylation of the site Y⁶⁸⁵ site of VE-cadherin was observed in HUVECs when cultured alone, compared to clear phosphorylation of Y⁶⁸⁵ of VE-cadherin detected in HUVECs co-cultured with MDA-MB-231 cells (Figure 1E). We conclude that the presence of breast cancer cells induces signaling in adjacent endothelial cells that phosphorylates the tyrosine Y⁶⁸⁵ site in the cytoplasmic domain of VE-cadherin. Since phosphorylation of VE-cadherin is a hallmark of endothelial cell instability, our results suggest that the vascular network in organs and tumors might be subjected to modifications due to the close interaction between cell types.

Microtumor spheroid model. *In vitro* culture of microtumor spheroids allows the study of growth of breast tumor cells under 3D conditions which are closer to the 'normal' conditions of a developing tumor compared to *in vitro* 2D culture. Figure 2A shows the appearance of the microtumor spheroids during 6 days of growth in culture. At the start of the co-culture of the microtumor spheroids with endothelial cells, the two cell types were cohesive (Figure 2A, D1). During the following 5 days in culture, growth was

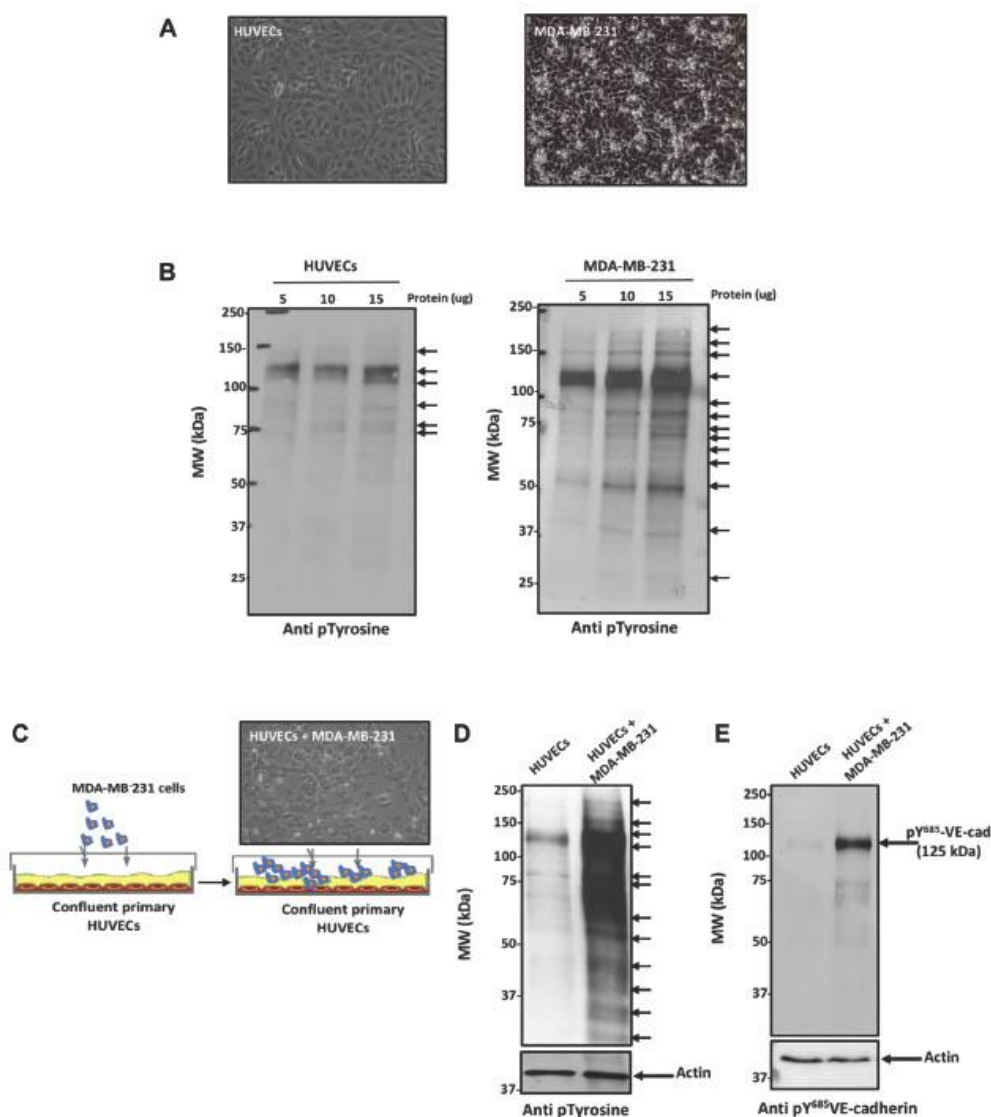


Figure 1. Cell signaling in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) and MDA-MB-231 cells, and their co-culture. A: Representative image of HUVECs and MDA-MB-231 cells grown on fibronectin-coated 6-well plates for 2 days until confluency. B: Analysis of tyrosine-phosphorylation of proteins extracted from HUVECs and MDA-MB-231 cells using antibody to phosphotyrosine (4G10 clone, 1 µg/ml). Exposure was 30 s. C: Illustration of the co-culture of MDA-MB-231 onto HUVECs. HUVECs were grown on fibronectin-coated 6-well plates for 2 days until confluency. Then 10,000 MDA-MB-231 cells were added onto the monolayer and the cells were grown for 2 more days. D: Assessment of tyrosine-phosphorylated proteins (5 µg) in co-cultured HUVECs and MDA-MB-231 cells using antibody to phosphotyrosine (4G10 clone, 1 µg/ml). Exposure was 30 s. E: Detection of tyrosine phosphorylation of vascular endothelial (VE)-cadherin in co-cultured HUVECs and MDA-MB-231 using antibody to pY⁶⁸⁵-VE-cadherin (2 µg/ml). Actin was used as a loading control. This was a representative experiment of three individual experiments.

4692

quantified by measuring the surface area of the microtumor spheroid using ImageJ software; the surface area of these microtumor spheroids increased up to 7-fold (Figure 2B). The HUVECs were marked using CellTracker™ and the cells stayed grouped in the center of the spheroid even after 6 days of culture. However, on day 6, the fluorescence was slightly dispersed, which suggests that the HUVECs migrated within the spheroid. The survival of the tumor cells and endothelial cells together in the same microspheroid was long enough to provide the opportunity to perform drug screening.

Detection of tyrosine-phosphorylated proteins and VE-cadherin in the microtumor spheroid model. Since vascularization is an important process in tumor development, it is of major importance to determine whether the *in vitro* tumor microenvironment disturbs the adhesive properties of endothelial cell and promotes VE-cadherin Y⁶⁸⁵ phosphorylation and release of soluble VE. Hence, we analyzed the biochemical signaling from a number of spheroids. Extracts from either one, two or three spheroids were loaded onto a gel for SDS-PAGE and then transferred onto a nitrocellulose membrane. The protein content was identified by staining with Ponceau red (Figure 3A). Analysis of the conditioned medium showed that proteins were detected in the spheroids, including serum albumin, and a range of other proteins. To determine whether some of those proteins were phosphorylated, the spheroids were pre-treated with 10 μ M Na₃VO₄ for 10 min to inhibit tyrosine phosphatases and thus increase the detection of tyrosine-phosphorylated proteins and tyrosine kinases. As shown in Figure 3B, treatment with Na₃VO₄ increased PO₄ incorporation by the proteins when the extracts from two or three spheroids were analyzed; phosphorylation was barely visible when extract was taken from only one spheroid. The extracts from greater number of spheroids allowed the detection of major proteins of around 200, 130, 75 and 50 kDa. This shows that a minimum of two microtumor spheroids are needed to allow the detection of phosphorylated proteins. The detection of VE-cadherin was performed with the clone BV9, which is a mouse monoclonal antibody directed against the extracellular domain of the protein. VE-cadherin was detected by western blotting in all extracts from microtumor spheroids (Figure 3C). Moreover, since VE-cadherin was present in the microtumor spheroids, we examined whether it was phosphorylated using an antibody to p^{Y685}-VE-cadherin. Indeed, while p^{Y685}-VE-cadherin was barely detectable in one spheroid, it was clearly detected when the proteins from two or three microtumor spheroids were analyzed by western blotting (Figure 3D). This supports the results obtained in 2D culture. Altogether, these data demonstrate that the microtumor spheroids provide a sensitive minimal-cell *in vitro* model to study cell signaling in a 3D system that mimics the tumor microenvironment.

Microtumor spheroids modify the 3D vascular endothelial network. A hallmark of endothelial cell function is the capacity to form capillary-like networks in a 3D context. To determine whether the microtumor spheroid microenvironment is able to modify the endothelial network, we performed an experiment with HUVECs seeded onto a Matrigel layer in the absence and in the presence of an MDA-MB-231 microtumor spheroid (Figure 4A). The endothelial network became well established after 2 days of culture. The network of the control was well organized and branched. The presence of a microtumor spheroid modified the network of endothelial cells so that it was more condensed and exhibited thin projections protruding towards the microtumor spheroid (Figure 4B). This suggests that the presence of an MDA-MB-231 spheroid changed the morphology of the endothelial network, and this was most likely due to interactions between HUVECs and tumor cells as is observed for *in vivo* tumors. Figure 4B indicates the angiogenic parameters of sprouting, segments, branches, nodes, and junctions that were quantified using ImageJ software (26). The presence of the microtumor spheroid induced an increase in all these angiogenic parameters, which is in agreement with the well-documented angiogenic effect of TNBC *in vivo* (27). The reorganization of the vascular network resulting from the presence of the micro TNBC spheroid highlights the advantage of this microtumor spheroid model to provide an *in vitro* system, using a minimal number of cells, that mimics the *in vivo* angiogenic effects of tumor cells on endothelial cell networks.

TNBC cells induce cleavage of VE-cadherin. Our observation that the microtumor spheroids increased the angiogenic parameters of the capillary network prompted us to examine whether the TNBC cells could destabilize adherens junctions by affecting the extracellular domain of VE-cadherin. The adhesive properties of the extracellular domain of VE-cadherin are necessary to allow endothelial cells to connect and form a stable capillary network. In the case of tumors, abnormal connections produce a capillary network which is leaky. We thus examined whether the presence of TNBC cells led to cleavage of VE-cadherin. Using the 2D system, we analyzed the effect of 100 ng/ml VEGF, which is a concentration reported to induce a rapid tyrosine phosphorylation of VE-cadherin and VE-cadherin cleavage. Soluble VE-cadherin was readily detectable in both control and co-cultured cells and was more abundant in the presence of MDA-MB-231 cells (Figure 4C). This suggests that the process of tumor invasion involves the release from tumor cells of factors that influence endothelial cell signaling, which promotes the cleavage of the extracellular domain of VE-cadherin and leads to endothelial cell instability. The cleaved soluble VE-cadherin represents a blood-based biomarker for these events, as we have shown in our previous clinical experiments (15-17).

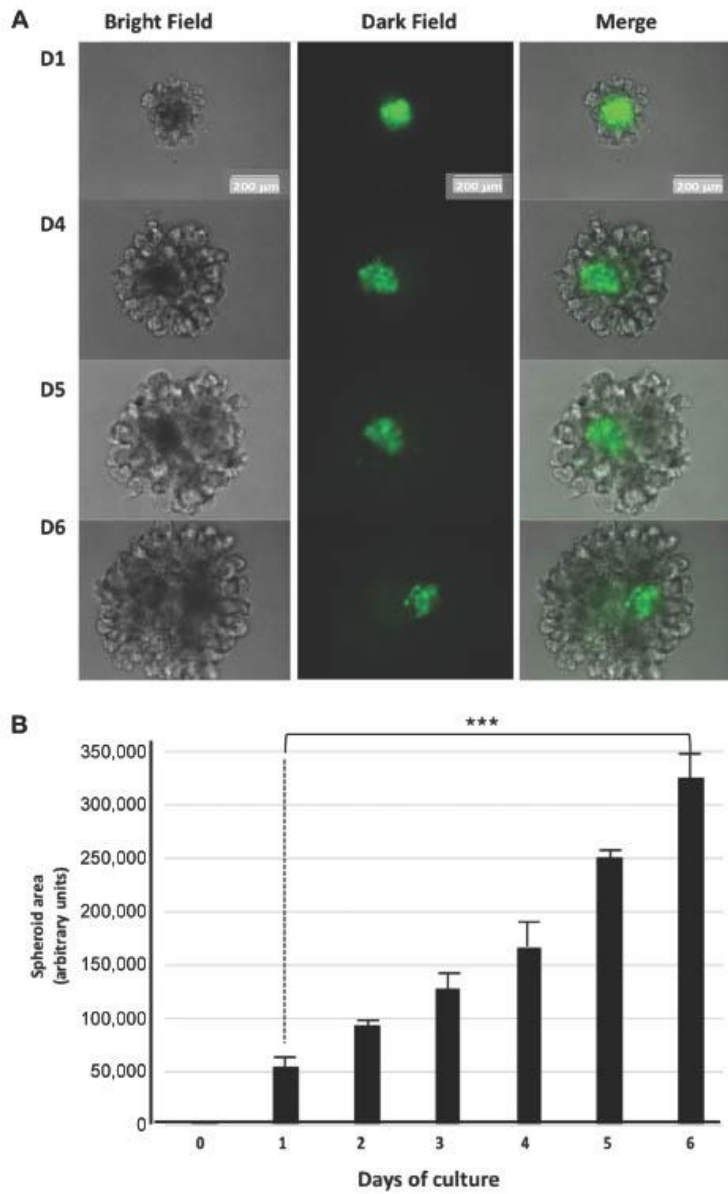


Figure 2. Establishment of a microtumor spheroid. A: Time course of the development of MDA-MB-231 microtumor spheroids growing with human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) that were labeled with CellTracker Green CMFDA. A total of 750 cells of each cell type were mixed to form spheroids in the presence of Matrigel and monitored for 6 days. Scale bars represent 200 μ m. B: Spheroid area was measured using ImageJ software (n=4 spheroids). *** Statistically significant change (p<0.001) calculated using two-tailed t-tests.

4694

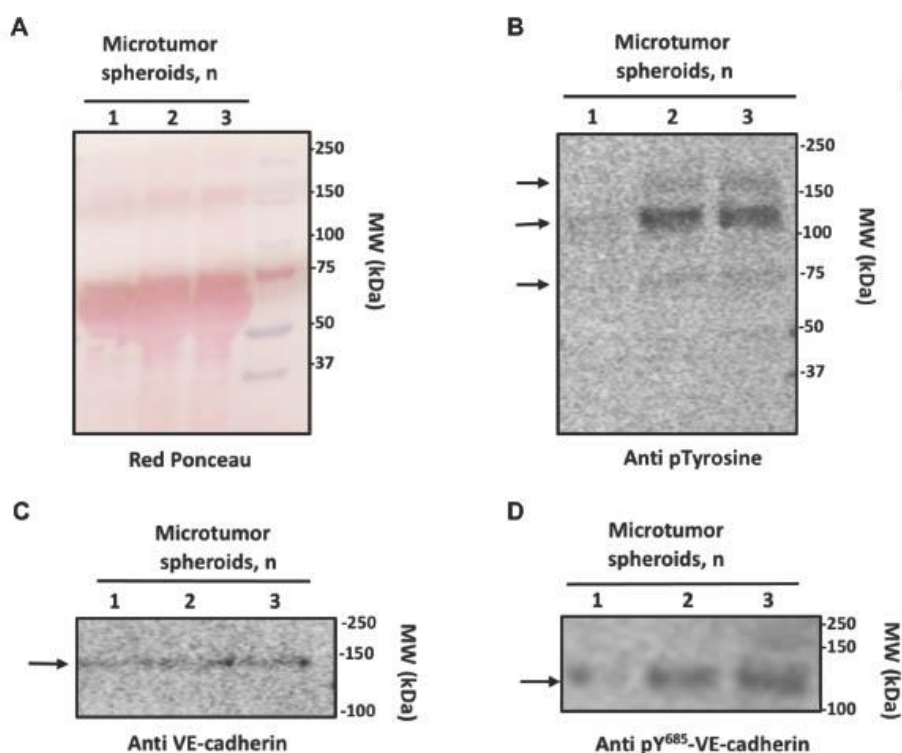


Figure 3. Detection of phosphotyrosine-containing proteins and vascular endothelial (VE)-cadherin in microtumor spheroids. A: Microtumor spheroids were prepared as described in the Materials and Methods. Proteins from one to three microtumor spheroids were stained using red Ponceau dye after electrotransfer onto nitrocellulose was performed. B: Detection of tyrosine-phosphorylated proteins in microtumor spheroids was performed using antibody to phosphotyrosine (#G10 clone, 1 $\mu\text{g/ml}$). C: Detection of VE-cadherin in microtumor spheroids using the antibody BV9 (2 $\mu\text{g/ml}$). D: The detection of pY685-VE-cadherin in microtumor spheroids was performed with the anti-phospho Y685-VE-cadherin (2 $\mu\text{g/ml}$). All experiments were repeated three times in a similar manner.

Effect of Sutent[®] on MDA-MB-231 microtumor spheroids. Sutent[®] contains the principal active chemical sunitinib, which is a tyrosine kinase inhibitor. Sunitinib is mainly an inhibitor of VEGF. We have recently shown that inhibition of the phosphorylation of VE-cadherin by sunitinib impaired cleavage of the extracellular domain of VE-cadherin, thus improving endothelial cell stability (16). We thus used our microtumor spheroid 3D model as an assay to detect the efficacy of Sutent[®]. To that end, we added Sutent[®] for 30 min at two different concentrations, 10 μM and 20 μM , and the effect on tyrosine-phosphorylated proteins was analyzed using SDS-PAGE and western blotting. As shown in Figure 5A, a dose-dependent inhibition of tyrosine phosphorylation of the two major proteins detected in microtumor spheroids

was observed (220 and 125 kDa). Moreover, phosphoY685-VE-cadherin was found to be a target of Sutent[®] since its phosphorylation was inhibited in a dose-dependent manner (Figure 5B). These results corroborate our previous findings (16), and importantly highlight the relevance of the MDA-MB-231 microtumor spheroid model as an *in vitro* assay platform for performing drug screening.

Discussion

Abnormal angiogenesis is the main mechanism involved in tumor growth and metastasis in TNBC. The pivotal role of VE-cadherin in angiogenesis has been extensively described and the regulation of its biological activity by tyrosine phosphorylation

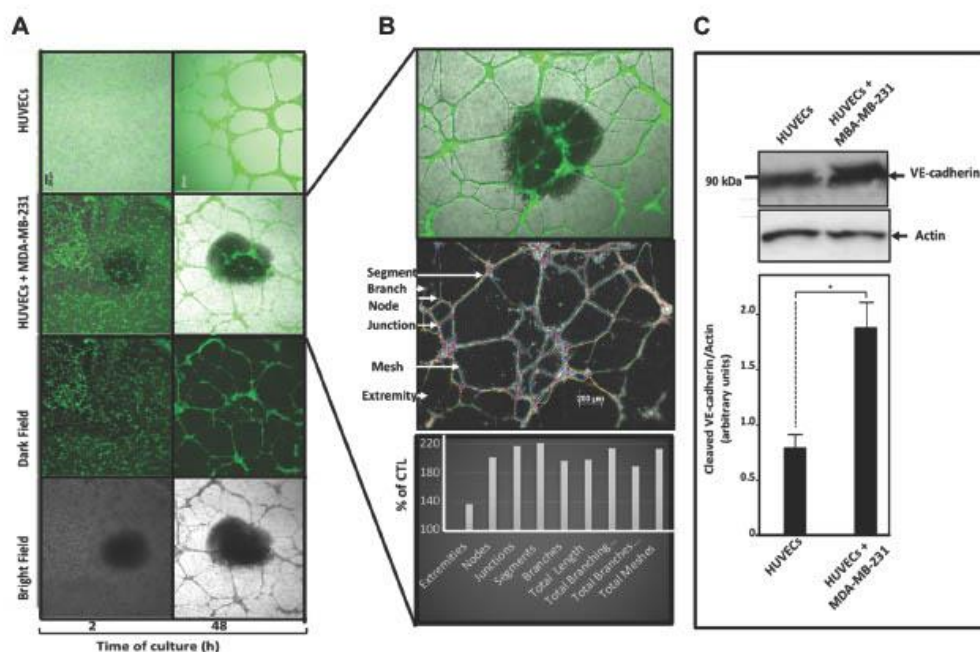


Figure 4. Microtumor spheroids modify the 3D vascular endothelial network. A: human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were grown within Matrigel in the absence (CTL) or in the presence of one spheroid of MDA-MB-231 cells. Photographs were taken after 2 h and 2 days of cell culture. Scale bars represent 200 μ m. B: Image J analysis of the co-culture cells versus the control after 2 days of culture. Data for vascular parameters are expressed as a percentage of the control. Representative image out of five. C: Analysis of soluble vascular endothelial (VE)-cadherin in 20 μ l of medium from HUVECs cultured alone and with MDA-MB-231 cells in 2D. Actin was used as a loading control. Error bars represent standard deviations of four experiments. *Statistically significant change ($p < 0.05$) calculated using two-tailed *t*-tests.

strongly influences angiogenic processes (11, 20). In the present study we provide new tools using 2D and 3D cell culture to study these mechanisms in TNBC angiogenesis.

Because 2D cell culture methods are still appropriate for assessment of numerous bioactivities, we first determined whether endothelial cells were able to grow in the presence of TNBC cells. As a result, we demonstrated that TNBC did activate several tyrosine phosphorylation pathways, including VE-cadherin on the site Y⁶⁸⁵. It is well known that cancer cells exhibit a high level of tyrosine kinase activity, and this is why tyrosine kinase inhibitors have been developed. But, to our knowledge, we are the first to report the level of phosphorylation of VE-cadherin on tyrosine Y⁶⁸⁵ in a 2D *in vitro* model of TNBC cells co-cultured with endothelial cells. This new method provides a good opportunity to assess this process, which might represent a new therapeutic target, especially considering that the 2D co-culture provides a relatively cheap and reproducible tool (22, 23). As an example,

the inhibition of VEGF-dependent VE-cadherin tyrosine phosphorylation might potentially stabilize endothelial cell-cell junctions and thus might limit angiogenic diseases. One inhibitor of tyrosine kinases, Sutent[®], which is already used in clinical practice, was shown to have an important activity in inhibiting VE-cadherin structural modifications (16). Thus, our 2D co-culture model would provide a quantitative tool in the design and development of new drugs (28-32).

Despite the unquestionable importance of traditional 2D models, they do not mimic real breast tissue complexity. This has led to efforts to develop more complex platforms including 3D models to study tumor vasculature, which remains a major challenge for the development of new anticancer drugs (33-35). Here, we have demonstrated the feasibility of an *in vitro* microtumor spheroid model that provides the possibility to analyze the effect of tumor cells on endothelial cells under controlled conditions. Indeed, in the tumor tissue, tumor cells stimulate endothelial cells from

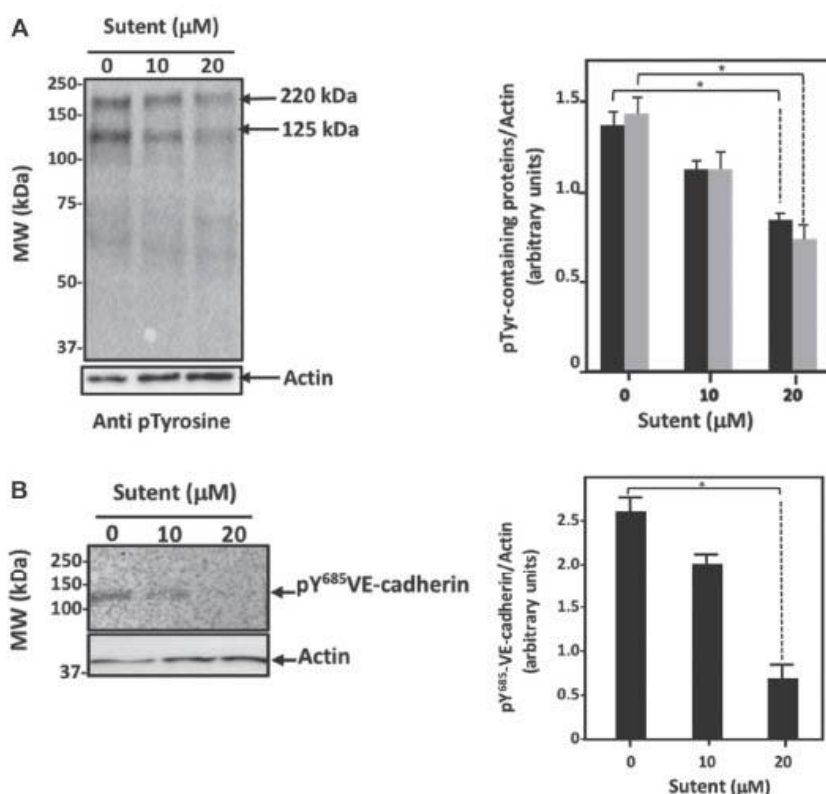


Figure 5. Effect of Sunitinib[®] on tyrosine phosphorylation in MDA-MB-231 microtumor spheroids. MDA-MB-231 microtumor spheroids growing with human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were treated with Sunitinib[®] as described in the Material and Methods. A: Assessment of the two major tyrosine-phosphorylated proteins (220 and 125 kDa) observed in microtumor spheroids using antibody to phosphotyrosine (4G10 clone, 1 μg/ml). Actin was used as a loading control. B: Detection of pY⁶⁸⁵-VE-cadherin in microtumor spheroids was performed with anti-pY⁶⁸⁵-VE-cadherin (2 μg/ml). Actin was used as a loading control. Results from a representative experiment carried out three times are shown. Data are the mean ± standard deviation. *Statistically significantly different at $p < 0.05$.

new blood vessels to receive oxygen and nutrients in order to grow beyond a relatively small size. Interestingly, we observed that the size (surface area) of the microtumor spheroid was able to increase 6-fold during 6 days of culture *in vitro*. These results agree with previous studies which have highlighted the role of the tumor microenvironment in mediating TNBC progression and affecting treatment efficacy (36, 37). It noteworthy that long-term survival of endothelial cells in heterotypic tumor spheroid models is a limitation. However, in our 3D model, the lifetime of endothelial cells was long enough to study the growth factor-activated tyrosine kinase pathway leading to the activation of VE-cadherin

phosphorylation, which is a very rapid reaction. A recent study tried to elucidate why TNBC preferentially metastasizes to bone and engineered a 3-D vascularized breast cancer tissue co-cultured together with osteoblasts with a fully formed vasculature. The authors observed that the inclusion of TNBC led to detrimental alterations in the surrounding vasculature after 7 days of culture in a scaffold-free system (38). So, the long-term survival of endothelial cells might depend on the cell line, on the presence of fibroblasts and also on the medium used. A major conclusion from our study is that under our conditions, the 3D microtumor spheroid system provides an *in vitro* model for quantifying the role of the endothelial

network using HUVECs and MDA-MB-231 cells for at least 4 to 6 days. Moreover, the detection of VE-cadherin in a small number of spheroids relies on the sensitivity of the antibody used (clone BV9). The detection of the phosphorylation of VE-cadherin on tyrosine Y⁶⁸⁵ relies on the use of Na₃VO₄ pretreatment, which blocks tyrosine phosphatase activity and increases the sensitivity of detection. Indeed, the finding of VE-cadherin tyrosine phosphorylation in our 3D microtumor spheroids concurs with the increased receptor tyrosine kinase signaling pathways that regulate many aspects of tumorigenesis (22). Endothelial cells are sensitive to the presence of neighboring cells of similar or different type and often use dynamic heterotypic cell communication pathways. Our 3D microtumor spheroid system demonstrates the feasibility of mimicking *in vitro* the architecture of a real tumor vascular network that may be helpful in understanding cell-cell adhesion mediated by VE-cadherin. Altogether, this 3D system offers a better platform than 2D cell culture for recapitulating the *in vivo* characteristics of cancer cells and endothelial cells, therefore facilitating the translation of preclinical findings into clinical applications (23, 24).

As TNBC is known to be highly vascularized, it is interesting to note that our microtumor spheroid system allows the measurement of angiogenic parameters developed by the endothelial cells in making a capillary-like network. Significantly, we demonstrated that the network was reorganized by the presence of a microtumor spheroid, which highlights the activation of endothelial cells and their capacity to respond to angiogenic factors. This agrees with previous studies showing that expression of VEGFs and their receptor (VEGFRs) is high in TNBC (28). The VEGF signaling pathway is positively correlated with the formation of blood vessels. Hence, angiogenesis is an important process in the regulation of TNBC progression and metastasis. Twenty years ago, the use of monoclonal antibodies directed against the extracellular domain of VE-cadherin was proposed to inhibit angiogenesis and to target tumoral vasculature without affecting normal vasculature (39-42). However, the use of these antibodies did not reach clinical trials due to their effects being dependent on the specific endothelial cells used. The inhibition of angiogenesis in TNBC is therefore still an issue. Ongoing research is focusing on how to improve blood protein biomarkers in TNBC, which will hopefully improve outcomes in TNBC (43). In normal healthy adult tissue, blood vessels are lined by quiescent endothelial cells. When adversely stimulated, endothelial adherens junctions are modified and VE-cadherin is cleaved in its extracellular domain, which renders the endothelial cells mobile. Then to reconnect to each other, the cells need the adhesive properties of VE-cadherin. In 2017, we demonstrated that soluble VE-cadherin was an independent prognostic factor in metastatic breast cancer (17). Another group identified soluble VE-cadherin as a biomarker that distinguished patients with recurrent breast cancer from those with complete remission (18). Here our results

in 2D culture system identify the increase of soluble VE-cadherin by the presence of TNBC. It thus reinforces a role for our 2D co-culture system as a means to quantify the influence of potential therapeutic drugs by measuring the levels of soluble VE-cadherin. Unfortunately, the detection of soluble VE-cadherin was not possible in our experiments using 3D microtumor spheroids. Several hypotheses can explain this: (i) the time of treatment with VEGF might not have been long enough; (ii) the accessibility of endothelial cells to VEGF was impeded by the HUVECs present mainly in the center of the spheroid; or (iii) the amount of soluble VE released might be under the limit of detection by western blotting. For the future, an alternative method of detection might be to use mass spectrometry to increase the sensitivity of the detection of secreted proteins in the media from the 3D microtumor spheroids. Nevertheless, our 3D microtumor spheroid system provided the opportunity to quantify the effect of a tyrosine kinase inhibitor (sunitinib) that is already used in oncology to inhibit the phosphorylation of VE-cadherin (16). This is encouraging for the future, since multiple-drug screening assays might include endothelial cells in their test systems to allow the determination of the status of VE-cadherin phosphorylation to provide insights into new potential markers for unexpected side-effects on capillary networks (44).

Conclusion

We demonstrate that a 2D co-culture model, as well as a 3D microtumor spheroid system, allow the study of the mechanisms of regulations of VE-cadherin and cell-cell interactions, as well as the effects of potential therapeutic agents. These models only require a limited number of tumor and endothelial cells but provide sensitive tests. These models will likely be of significant use in delineating the biological mechanisms that govern the pathological abnormalities observed in cancer. They also will serve as more reliable platforms for generating predictive results in *in vivo* evaluation of chemotherapeutic agents and their delivery systems. However, further studies are needed to determine whether targeting cadherin will be a novel therapeutic strategy for multiple types of cancer and metastasis.

Conflicts of Interest

The Authors declare no conflicts of interest.

Authors' Contributions

Study conception, design, and conducted the project: IV. Acquisition of data: PD and OG. Writing original draft: PD, OG, DKM and IV. Writing – review and editing: DKM and IV. All Authors were involved in revising the article. All Authors approved the final version to be published. IV had full access to all of the data in the study and takes responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis.

Acknowledgements

This work was supported by the French National Institute of Health and Medical Research INSERM (UMRS 1292), the French Atomic Energy and Alternative Energies Commission (CEA), Institut de Recherche Interdisciplinaires de Grenoble (IRIG), Grenoble University Hospital, French Association against Cancer (ARC Foundation), Ligue Foundation against the Cancer (Savoie), Fédération Nationale des Centres de Lutte contre le Cancer (GEFLUC Grenoble-Dauphiné-Savoie). Paul Dembélé was a recipient from Ligue contre le cancer Comité Savoie. Olivia Garnier was a PhD student from GRAL (Alliance Grenobloise pour la Biologie Structurale et Cellulaire Intégrée).

References

- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA and Jemal A: Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 68(6): 394-424, 2018. PMID: 30207593. DOI: 10.3322/caac.21492
- Foulkes WD, Smith IE and Reis-Filho JS: Triple-negative breast cancer. *N Engl J Med* 363(20): 1938-1948, 2010. PMID: 21067385. DOI: 10.1056/NEJMra1001389
- Mediratta K, El-Sahli S, D'Costa V and Wang L: Current progresses and challenges of immunotherapy in triple-negative breast cancer. *Cancers (Basel)* 12(12): 3529, 2020. PMID: 33256070. DOI: 10.3390/cancers12123529
- Dent R, Trudeau M, Pritchard KI, Hanna WM, Kahn HK, Sawka CA, Lickley LA, Rawlinson E, Sun P and Narod SA: Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. *Clin Cancer Res* 13(15 Pt 1): 4429-4434, 2007. PMID: 17671126. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-06-3045
- Weidner N, Semple JP, Welch WR and Folkman J: Tumor angiogenesis and metastasis – correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med* 324(1): 1-8, 1991. PMID: 1701519. DOI: 10.1056/NEJM199101033240101
- Uzzan B, Nicolas P, Cuherat M and Perret GY: Microvessel density as a prognostic factor in women with breast cancer: a systematic review of the literature and meta-analysis. *Cancer Res* 64(9): 2941-2955, 2004. PMID: 15126324. DOI: 10.1158/0008-5472.can-03-1957
- Folkman J: Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 285(21): 1182-1186, 1971. PMID: 4938153. DOI: 10.1056/NEJM197111182852108
- Potente M, Gerhardt H and Carmeliet P: Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. *Cell* 146(6): 873-887, 2011. PMID: 21925313. DOI: 10.1016/j.cell.2011.08.039
- Hanahan D: Hallmarks of cancer: new dimensions. *Cancer Discov* 12(1): 31-46, 2022. PMID: 35022204. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-21-1059
- Malekian S, Rahmati M, Sari S, Kazemimanesht M, Kheirbakhsh R, Muhammadnejad A and Amanpour S: Expression of diverse angiogenesis factor in different stages of the 4T1 tumor as a mouse model of triple-negative breast cancer. *Adv Pharm Bull* 10(2): 323-328, 2020. PMID: 32373503. DOI: 10.34172/apb.2020.039
- Lampugnani MG, Dejana E and Giampietro C: Vascular endothelial (VE)-cadherin, endothelial adherens junctions, and vascular disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 10(10): a029322, 2018. PMID: 28851747. DOI: 10.1101/cshperspect.a029322
- Sidibé A, Mannic T, Arboles M, Subileau M, Gulino-Debrac D, Bouillet L, Jan M, Vandhuick T, Le Loët X, Vittecoq O and Vilgrain I: Soluble VE-cadherin in rheumatoid arthritis patients correlates with disease activity: evidence for tumor necrosis factor α -induced VE-cadherin cleavage. *Arthritis Rheum* 64(1): 77-87, 2012. PMID: 21905018. DOI: 10.1002/art.33336
- Bouillet L, Mannic T, Arboles M, Subileau M, Massot C, Drouot C, Huber P and Vilgrain I: Hereditary angioedema: key role for kallikrein and bradykinin in vascular endothelial-cadherin cleavage and edema formation. *J Allergy Clin Immunol* 128(1): 232-234, 2011. PMID: 21439626. DOI: 10.1016/j.jaci.2011.02.017
- Bouillet L and Vilgrain I: VE-cadherin, a potential marker for endothelial cell activation during hereditary angioedema attacks. *J Allergy Clin Immunol* 134(1): 241, 2014. PMID: 24875615. DOI: 10.1016/j.jaci.2014.04.016
- Vilgrain I, Sidibé A, Polena H, Cand F, Mannic T, Arboles M, Boccard S, Baudet A, Gulino-Debrac D, Bouillet L, Quesada JL, Mendoza C, Lebas JF, Pelletier L and Berger F: Evidence for post-translational processing of vascular endothelial (VE)-cadherin in brain tumors: towards a candidate biomarker. *PLoS One* 8(12): e80056, 2013. PMID: 24358106. DOI: 10.1371/journal.pone.0080056
- Polena H, Creuzet J, Dufies M, Sidibé A, Khalil-Mgharbel A, Salomon A, Deroux A, Quesada JL, Roelants C, Filhol O, Cochet C, Blanc E, Ferlay-Segura C, Borchiellini D, Ferrero JM, Escudier B, Négrier S, Pages G and Vilgrain I: The tyrosine-kinase inhibitor sunitinib targets vascular endothelial (VE)-cadherin: a marker of response to antitumoural treatment in metastatic renal cell carcinoma. *Br J Cancer* 118(9): 1179-1188, 2018. PMID: 29563634. DOI: 10.1038/s41416-018-0054-5
- Rocheffort P, Chabaud S, Pierga JY, Tredan O, Brain E, Bidard FC, Schiffler C, Polena H, Khalil-Mgharbel A, Vilgrain I and Bachelot T: Soluble VE-cadherin in metastatic breast cancer: an independent prognostic factor for both progression-free survival and overall survival. *Br J Cancer* 116(3): 356-361, 2017. PMID: 28056463. DOI: 10.1038/bjc.2016.427
- Fry SA, Robertson CE, Swann R and Dwek MV: Cadherin-5: a biomarker for metastatic breast cancer with optimum efficacy in oestrogen receptor-positive breast cancers with vascular invasion. *Br J Cancer* 114(9): 1019-1026, 2016. PMID: 27010749. DOI: 10.1038/bjc.2016.66
- Wallez Y, Cand F, Cruzalegui F, Wernstedt C, Souchehlynskyi S, Vilgrain I and Huber P: Src kinase phosphorylates vascular endothelial-cadherin in response to vascular endothelial growth factor: identification of tyrosine 685 as the unique target site. *Oncogene* 26(7): 1067-1077, 2007. PMID: 16909109. DOI: 10.1038/sj.onc.1209855
- Lambeng N, Wallez Y, Rampon C, Cand F, Christé G, Gulino-Debrac D, Vilgrain I and Huber P: Vascular endothelial-cadherin tyrosine phosphorylation in angiogenic and quiescent adult tissues. *Circ Res* 96(3): 384-391, 2005. PMID: 15662029. DOI: 10.1161/01.RES.0000156652.99586.9f
- Sidibé A, Polena H, Razaanajato J, Mannic T, Chaumontel N, Bama S, Maréchal I, Huber P, Gulino-Debrac D, Bouillet L and Vilgrain I: Dynamic phosphorylation of VE-cadherin Y685 throughout mouse estrous cycle in ovary and uterus. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 307(3): H448-H454, 2014. PMID: 24858855. DOI: 10.1152/ajpheart.00773.2013

- 22 Tevis KM, Colson YL and Grinstaff MW: Embedded spheroids as models of the cancer microenvironment. *Adv Biosyst* 1(10): 1700083, 2017. PMID: 30221187. DOI: 10.1002/adbi.201700083
- 23 Zanoni M, Cortesi M, Zamagni A, Arienti C, Pignatta S and Tesi A: Modeling neoplastic disease with spheroids and organoids. *J Hematol Oncol* 13(1): 97, 2020. PMID: 32677979. DOI: 10.1186/s13045-020-00931-0
- 24 Weiswald LB, Bellet D and Dangles-Marie V: Spherical cancer models in tumor biology. *Neoplasia* 17(1): 1-15, 2015. PMID: 25622895. DOI: 10.1016/j.neo.2014.12.004
- 25 Candarlioglu PL, Dal Negro G, Hughes D, Balkwill F, Harris K, Screen H, Morgan H, David R, Beken S, Guenet O, Rowan W and Amour A: Organ-on-a-chip: current gaps and future directions. *Biochem Soc Trans* 50(2): 665-673, 2022. PMID: 35437569. DOI: 10.1042/BST20200661
- 26 Carpentier G: Angiogenesis Analyzer for ImageJ. Available at: <https://imagej.nih.gov/ij/macros/toolsets/Angiogenesis%20Analyzer.txt> [Last accessed on September 1, 2022]
- 27 Chung AS, Lee J and Ferrara N: Targeting the tumour vasculature: insights from physiological angiogenesis. *Nat Rev Cancer* 10(7): 505-514, 2010. PMID: 20574450. DOI: 10.1038/nrc2868
- 28 Shiau JP, Wu CC, Chang SJ, Pan MR, Liu W, Ou-Yang F, Chen FM, Hou MF, Shih SL and Luo CW: FAK regulates VEGFR2 expression and promotes angiogenesis in triple-negative breast cancer. *Biomedicines* 9(12): 1789, 2021. PMID: 34944605. DOI: 10.3390/biomedicines9121789
- 29 Alcaraz LB, Mallavialle A, David T, Derocq D, Delolme F, Dieryckx C, Mollevi C, Boissière-Michot F, Simony-Lafontaine J, Du Manoir S, Huesgen PF, Overall CM, Tartare-Deckert S, Jacot W, Chardès T, Guiu S, Roger P, Reinheckel T, Moali C and Liaudet-Coopman E: A 9-kDa matricellular SPARC fragment released by cathepsin D exhibits pro-tumor activity in the triple-negative breast cancer microenvironment. *Theranostics* 11(13): 6173-6192, 2021. PMID: 33995652. DOI: 10.7150/thno.58254
- 30 Hegde M, Bhat SM, Guruprasad KP, Moka R, Ramachandra L, Satyamorthy K and Joshi MB: Human breast tumor derived endothelial cells exhibit distinct biological properties. *Biol Cell* 114(2): 73-85, 2022. PMID: 34755911. DOI: 10.1111/boc.202100015
- 31 Lopes-Coelho F, Martins F, Hipólito A, Mendes C, Sequeira CO, Pires RF, Almeida AM, Bonifácio VDB, Pereira SA and Serpa J: The activation of endothelial cells relies on a ferroptosis-like mechanism: novel perspectives in management of angiogenesis and cancer therapy. *Front Oncol* 11: 656229, 2021. PMID: 34041026. DOI: 10.3389/fonc.2021.656229
- 32 Chen X, Zhang S, Du K, Zheng N, Liu Y, Chen H, Xie G, Ma Y, Zhou Y, Zheng Y, Zeng L, Yang J and Shen L: Gastric cancer-secreted exosomal X26nt increases angiogenesis and vascular permeability by targeting VE-cadherin. *Cancer Sci* 112(5): 1839-1852, 2021. PMID: 33205567. DOI: 10.1111/cas.14740
- 33 Goel S, Ferreira CA, Dogra P, Yu B, Kuttyreff CJ, Siamof CM, Engle JW, Barnhart TE, Cristini V, Wang Z and Cai W: Size-optimized ultrasmall porous silica nanoparticles depict vasculature-based differential targeting in triple negative breast cancer. *Small* 15(46): e1903747, 2019. PMID: 31565854. DOI: 10.1002/smll.201903747
- 34 Xu X, Farach-Carson MC and Jia X: Three-dimensional *in vitro* tumor models for cancer research and drug evaluation. *Biotechnol Adv* 32(7): 1256-1268, 2014. PMID: 25116894. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2014.07.009
- 35 Guillaume L, Rigal L, Fehrenbach J, Severac C, Ducommun B and Lobjois V: Characterization of the physical properties of tumor-derived spheroids reveals critical insights for pre-clinical studies. *Sci Rep* 9(1): 6597, 2019. PMID: 31036886. DOI: 10.1038/s41598-019-43090-0
- 36 Franchi-Mendes T, Lopes N and Brito C: Heterotypic tumor spheroids in agitation-based cultures: a scaffold-free cell model that sustains long-term survival of endothelial cells. *Front Bioeng Biotechnol* 9: 649949, 2021. PMID: 34178955. DOI: 10.3389/fbioe.2021.649949
- 37 Dias AS, Almeida CR, Helguero LA and Duarte IF: Metabolic crosstalk in the breast cancer microenvironment. *Eur J Cancer* 121: 154-171, 2019. PMID: 31581056. DOI: 10.1016/j.ejca.2019.09.002
- 38 Rimal R, Desai P, Marquez AB, Sieg K, Marquardt Y and Singh S: 3-D vascularized breast cancer model to study the role of osteoblast in formation of a pre-metastatic niche. *Sci Rep* 11(1): 21966, 2021. PMID: 34754042. DOI: 10.1038/s41598-021-01513-x
- 39 Liao F, Li Y, O'Connor W, Zanetta L, Bassi R, Santiago A, Overholser J, Hooper A, Mignatti P, Dejana E, Hicklin DJ and Bohlen P: Monoclonal antibody to vascular endothelial-cadherin is a potent inhibitor of angiogenesis, tumor growth, and metastasis. *Cancer Res* 60(24): 6805-6810, 2000. PMID: 11156369.
- 40 Corada M, Liao F, Lindgren M, Lampugnani MG, Breviario F, Frank R, Muller WA, Hicklin DJ, Bohlen P and Dejana E: Monoclonal antibodies directed to different regions of vascular endothelial cadherin extracellular domain affect adhesion and clustering of the protein and modulate endothelial permeability. *Blood* 97(6): 1679-1684, 2001. PMID: 11238107. DOI: 10.1182/blood.v97.6.1679
- 41 Liao F, Doody JF, Overholser J, Finnerty B, Bassi R, Wu Y, Dejana E, Kussie P, Bohlen P and Hicklin DJ: Selective targeting of angiogenic tumor vasculature by vascular endothelial-cadherin antibody inhibits tumor growth without affecting vascular permeability. *Cancer Res* 62(9): 2567-2575, 2002. PMID: 11980651.
- 42 Corada M, Zanetta L, Orsenigo F, Breviario F, Lampugnani MG, Bernasconi S, Liao F, Hicklin DJ, Bohlen P and Dejana E: A monoclonal antibody to vascular endothelial-cadherin inhibits tumor angiogenesis without side effects on endothelial permeability. *Blood* 100(3): 905-911, 2002. PMID: 12130501. DOI: 10.1182/blood.v100.3.905
- 43 Sukumar J, Gast K, Quiroga D, Lustberg M and Williams N: Triple-negative breast cancer: promising prognostic biomarkers currently in development. *Expert Rev Anticancer Ther* 21(2): 135-148, 2021. PMID: 33198517. DOI: 10.1080/14737140.2021.1840984
- 44 Huang L, Hu C, Di Benedetto M, Varin R, Liu J, Jin J, Wang L, Vannier JP, Janin A, Lu H and Li H: Cross-drug resistance to sunitinib induced by doxorubicin in endothelial cells. *Oncol Lett* 9(3): 1287-1292, 2015. PMID: 25663899. DOI: 10.3892/ol.2014.2819

Received July 19, 2022
 Revised August 29, 2022
 Accepted September 1, 2022

II.4. Conclusion et perspectives

L'angiogenèse pathologique est l'un des mécanismes fondamentaux dans la croissance tumorale et le développement des métastases. Du fait de son fort potentiel angiogénique, TNBC est l'un des sous-types de cancer du sein les plus agressifs avec un faible taux de survie. L'étude du rôle de la VE-cadhérine dans ce cas pourrait contribuer à mieux comprendre les mécanismes régulant l'angiogenèse tumorale.

Dans cette étude, l'établissement de nouveaux outils utilisant des systèmes 2D et 3D permet d'étudier le rôle de la VE-cadhérine dans les TNBC. La co-culture de cellules endothéliales avec des cellules cancéreuses du sein nous a permis de mettre en évidence que les TNBC induisaient le clivage de la VE-cadhérine. Afin de reproduire la complexité de l'environnement tumoral, il était nécessaire d'apporter une dimension 3D afin de retrouver *in vivo* les forces et les interactions qui existent entre ces deux types cellulaires. Ce modèle 3D était d'autant plus nécessaire pour étudier la complexité de l'angiogenèse au sein de la tumeur. De ce fait, nous avons pu démontrer que le microenvironnement des TNBC favorisait fortement le développement du réseau vasculaire et que ce modèle confirmait le haut potentiel angiogénique des TNBC. De plus, ce système 3D pourrait être utilisé comme un outil clinique puissant pour tester l'efficacité de divers médicaments sur la progression tumorale et sur l'angiogenèse. En effet, l'efficacité de l'utilisation de l'inhibiteur tyrosine kinase nous a été montrée dans les sphéroïdes où la diminution de la phosphorylation sur Y685 de la VE-cadhérine était observée de manière dose dépendantes. Nous pourrions également suivre l'évolution de l'angiogenèse et de la croissance du sphéroïde mais pour le moment nous ne sommes pas parvenus à dépasser les 6 jours du maintien du sphéroïde.

Cette étude nous a permis de mettre en avant la modification de la tyrosine Y685 de la VE-cadhérine dans le cas de TNBC. Elle nous a conduit à établir la pertinence d'un modèle 3D dans l'étude de pathologies comme le cancer. Nous pourrions ainsi le transposer pour d'autres cancers et étudier la modification de la VE-cadhérine comme pour le cancer du poumon. De plus, ce modèle représente une excellente solution pour conduire des études directement sur des cellules humaines et dépasser les divergences inter espèces comme c'est le cas avec le modèle murin. Ainsi, l'étude de l'efficacité des médicaments sera d'autant plus pertinente. Par la suite, nous pourrions complexifier ce modèle afin de le rendre encore plus proche de la physiologie tumorale en y introduisant d'autres types cellulaires comme les cellules immunitaires qui jouent un rôle très important dans le développement de la tumeur et ainsi regarder la véritable efficacité d'un médicament sur la croissance du sphéroïde.

CHAPITRE III:

Mécanisme moléculaire de la dysfonction endothéliale dans l'infection par SARS-COV-2 : évidence du clivage de la VE-cadhérine par ACE2.

III.1 Contexte et objectifs d'étude

Coronavirus 2019 (COVID-19) a eu un impact mondial depuis sa découverte en Chine en 2019. Il entraîne des modifications vasculaires dans différents organes comme des altérations endothéliales, une thrombose répandue et de l'angiogenèse dans les poumons. En effet, il a notamment été rapporté que l'infection par le virus conduisait à une tempête de cytokines responsable de l'augmentation de la perméabilité au niveau des capillaires et d'un fort recrutement des cellules immunitaires dans les poumons. Certains patients présentent encore des symptômes ou des complications bien après l'infection par le virus, ce qui se nomme le « COVID long ». Dans ce cas, les patients continuent à souffrir d'une dérégulation des cytokines associée à des modifications vasculaires pulmonaires. Étant donné l'importance de la VE-cadhérine dans le maintien des jonctions, nous avons émis l'hypothèse que la VE-cadhérine serait impactée par cette infection et provoquerait l'apparition de ces symptômes. L'une des théories émises était le clivage de la VE-cadhérine par une protéase Angiotensine Converting Enzyme-2 (ACE2). Cette protéine exprimée par les cellules endothéliales entre autres peut cliver des protéines via la reconnaissance de la séquence bien spécifique PMKP-L. Notre hypothèse de travail est que ACE2 aurait la capacité de reconnaître ces sites consensus de clivage sur la VE-cadhérine et induire le clivage de la partie extracellulaire de la VE-cadhérine, dont la partie soluble serait détectée dans le sang comme un biomarqueur. Ce clivage induirait les modifications vasculaires.

Les objectifs de cet article :

- Examiner les effets d'ACE2 sur la VE-cadhérine.
- Analyser la présence d'ACE2 et la VE-cadhérine soluble chez les patients atteints de COVID sévère ou aux symptômes plus légers.
- Déterminer si la VE-cadhérine et ACE2 sont des bons biomarqueurs chez les patients atteints de COVID long.

III.2. Les principaux résultats

Afin d'étudier le clivage par ACE2, la partie extracellulaire de la VE-cadhérine humaine a été purifiée (fragment de 90 kDa). Plusieurs anticorps ont été testés afin de déterminer lequel reconnaît uniquement l'ectodomaine. L'anticorps dirigé contre le domaine EC1 a pu être validé et est capable d'identifier l'ectodomaine 1 parmi les 5 ectodomains présents dans la partie extracellulaire de la VE-cadhérine. Il est important de noter que c'est par ce domaine seulement que la VE-cadhérine forme ses liaisons homophiles entre les cellules endothéliales.

ACE2 est un ectopeptidase exprimé par les cellules endothéliales qui peut être retrouvé sous forme circulante suite à son clivage au niveau membranaire par une ectoenzyme ADAM17 (A disintegrin and metalloprotease) et garde son activité enzymatique de clivage. L'étude de la séquence de la VE-cadhérine a montré qu'elle contenait deux séquences consensus (266P-F267) et (321PMKP-L325) capables d'être reconnues comme cible par ACE2. Pour tester cette hypothèse, un recombinant humain de ACE2 commercial fut mis en contact avec la partie extracellulaire de la VE-cadhérine. Il a pu être constaté une diminution de la partie extracellulaire de la VE-cadhérine de manière dose dépendante d'ACE2. Ces données confirment que VE-cadhérine peut être une cible pour ACE2.

Nous avons ensuite vérifié notre hypothèse dans le cas de la pathologie. Étant donné que la concentration d'ACE2 circulante est corrélée à l'inflammation systémique, nous avons voulu déterminer si elle était présente dans le plasma des patients atteints de COVID. La comparaison a été faite entre les patients atteints de COVID bénin ne nécessitant qu'une hospitalisation sans assistance respiratoire, et d'autres atteints de COVID sévère associé à un défaut respiratoire et pour qui l'assistance respiratoire est requise. Les résultats ont montré la forte présence de la forme circulante d'ACE2 chez les patients atteints de COVID sévère. Ainsi, nous avons voulu détecter la présence de la protéine VE-cadhérine soluble. De manière surprenante, plusieurs fragments de différente taille furent dénombrés dans le plasma de patients atteints de COVID sévère : 70 kDa, 62 kDa, 54 kDa, tandis que seule la forme 54 kDa était détectée chez les patients de COVID bénins. Ces données suggèrent que les formes solubles sont corrélées à la gravité de la pathologie.

III.3. Article: *Molecular Mechanisms of Endothelialitis in SARS-CoV-2 Infection: Evidence for VE-Cadherin Cleavage by ACE2.*



Article

Molecular Mechanisms of Endothelialitis in SARS-CoV-2 Infection: Evidence for VE-Cadherin Cleavage by ACE2

Laurence Bouillet ^{1,2,3}, Alban Deroux ², Meryem Benmarce ⁴, Chloé Guérin ^{3,5}, Laura Bouvet ¹, Olivia Garnier ⁵, Donald K. Martin ⁴ and Isabelle Vilgrain ^{5,*}

¹ University Grenoble Alpes, CNRS, TIMC-IMAG/T-RAIG (UMR 5525), 38000 Grenoble, France; lbouillet@chu-grenoble.fr (L.B.)

² Grenoble Hospital Grenoble Alpes (CHUGA), University Grenoble Alpes, 38000 Grenoble, France; aderoux@chu-grenoble.fr

³ Internal Medicine, University Hospital Centre Grenoble Alpes, CEDEX 9, 38043 Grenoble, France; cguerin@chu-grenoble.fr

⁴ University Grenoble Alpes, CNRS, TIMC-IMAG/SyNaBi (UMR 5525), 38000 Grenoble, France; donald.martin@univ-grenoble-alpes.fr (D.K.M.)

⁵ University Grenoble Alpes, INSERM U13, CEA, Institute of Interdisciplinary Research of Grenoble (IRIG), Laboratory of Biosciences et Bioingénierie Pour la Santé (BGE)-Biomics, 38000 Grenoble, France

* Correspondence: isabelle.vilgrain@cea.fr

Abstract: Long COVID-19 syndrome appears after Severe Acute Respiratory Syndrome-Corona Virus (SARS-CoV-2) infection with acute damage to microcapillaries, microthrombi, and endothelialitis. However, the mechanisms involved in these processes remain to be elucidated. All blood vessels are lined with a monolayer of endothelial cells called vascular endothelium, which provides a the major function is to prevent coagulation. A component of endothelial cell junctions is VE-cadherin, which is responsible for maintaining the integrity of the vessels through homophilic interactions of its Ca⁺⁺-dependent adhesive extracellular domain. Here we provide the first evidence that VE-cadherin is a target in vitro for ACE2 cleavage because its extracellular domain (hrVE-ED) contains two amino acid sequences for ACE2 substrate recognition at the positions ²⁵⁶P-F²⁵⁷ and ³²¹PMKP³²⁵L. Indeed, incubation of hrVE-ED with the active ectopeptidase hrACE2 for 16 hrs in the presence of 10 μM ZnCl₂ showed a dose-dependent (from 0.2 ng/μL to 2 ng/μL) decrease of the VE-cadherin immunoreactive band. In vivo, in the blood from patients having severe COVID-19 we detected a circulating form of ACE2 with an apparent molecular mass of 70 kDa, which was barely detectable in patients with mild COVID-19. Of importance, in the patients with severe COVID-19 disease, the presence of three soluble fragments of VE-cadherin (70, 62, 54 kDa) were detected using the antiEC1 antibody while only the 54 kDa fragment was present in patients with mild disease. Altogether, these data clearly support a role for ACE2 to cleave VE-cadherin, which leads to potential biomarkers of SARS-CoV-2 infection related with the vascular disease in “Long COVID-19”.

Keywords: endothelium; VE-cadherin; ACE2; SARS-CoV-2 infection; long COVID syndrome



Citation: Bouillet, L.; Deroux, A.; Benmarce, M.; Guérin, C.; Bouvet, L.; Garnier, O.; Martin, D.K.; Vilgrain, I. Molecular Mechanisms of Endothelialitis in SARS-CoV-2 Infection: Evidence for VE-Cadherin Cleavage by ACE2. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 12525. <https://doi.org/10.3390/ijms241512525>

Academic Editor: Catherine Davis

Received: 7 June 2023

Revised: 24 July 2023

Accepted: 28 July 2023

Published: 7 August 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

The world continues to deal with successive waves of the Coronavirus disease 2019 (COVID-19), for which often disabling sequelae are called “post-COVID-19 syndrome” [1]. It has a worldwide impact and was first diagnosed in 2019, in Wuhan, China [2]. Up to now, more than 280 million cases have been confirmed, leading to over 5.4 million deaths in the world [3]. Among the distinctive features of COVID-19 are the associated vascular changes, which are due to direct endothelial infection. Several studies have reported the onset of vasculitis syndromes in COVID-19 patients, with histologic evidence also in the liver, lung, skin, or kidney. The first evidence was reported by Varga et al. [4] who found viral bodies in endothelial cells (ECs) from glomerular capillary loops of the transplanted kidney of a patient, and endothelialitis in an additional

two patients. Meanwhile, Ackermann et al. [5] have observed morphologic and molecular changes in the peripheral lung of patients who died from COVID-19, which consisted of severe endothelial injury, widespread thrombosis with microangiopathy, and vascular angiogenesis. Chhetri et al. [6] showed that many COVID-19 patients exhibited severe metabolic acidosis, which indicated possible microcirculation dysfunction. Therefore, understanding the mechanism of endothelial dysfunction in COVID-19 would help to understand the basis for vascular damage during long COVID syndrome and so lead to better clinical care for patients.

The integrity of the dense vascular network surrounding small pulmonary alveoli depends upon endothelial adherens junctions (EJ) and the pericyte coverage of the small capillaries. As far as endothelial cells are concerned, the role of the transmembrane protein called VE-cadherin is crucial in maintaining the tight association between ECs. The whole VE-cadherin structure maintains adhesion of ECs by homotypic interactions involving the hydrophobic two amino acids (W49 and W51) of the EC1 domain (110 residues) [7,8]. The cytoplasmic domain of the protein is bound with the catenins that form the structural bridges with the actin cytoskeleton to enhance adhesion. Because of these VE-cadherin interactions, the EJ are extremely stable in adults except upon challenge by inflammatory mediators, such as histamine, thrombin, VEGF, TNF- α , and platelet-activating factor [9–13]. In previous studies we and others have demonstrated that disruption of cell-cell junctions depends on intracellular kinases and/or phosphatases [8]. VE-cadherin tyrosine phosphorylation is a mechanism involved in weakening the endothelial cell barrier resulting from cell stimulation by growth factors and inflammatory cytokines. Indeed, the post-translational modification creates structural changes in the protein conformation, which is more sensitive to proteases and thus the phosphorylation precedes the cleavage of its extracellular domain (sVE) that is found in the human blood [13].

A clinical example is Hereditary Angioedema (HAE), which is characterized by recurrent episodes of edema that can be life-threatening if not treated properly [14,15]. HAE is an autosomal-dominant inherited disease caused by C1 inhibitor deficiency as a result of mutations in the SERPING1 gene. Because of C1 inhibitor deficiency in HAE, the plasma proteolytic cascades are activated during an attack (plasma Kallikrein and coagulation factor XIIa) and kinins are generated. Among these, Bradykinin has been shown to be the predominant mediator of enhanced vascular permeability in HAE attacks where the patients present recurrent swellings. Exploring whether VE-cadherin was involved in the pathogenesis of HAE, we demonstrated that Bradykinin and Kallikrein induced a release of the 90 and 75-Da fragments [14]. The direct proteolytic action of Kallikrein occurred at two consensus sites of cleavage at the peptide bonds $^{411}\text{R-T}^{412}$ and $^{565}\text{R-T}^{566}$ in the VE-cadherin extracellular adhesive domain (sequence identifier, P03952). The 90 kDa VE-cadherin extracellular domain was detected in the patient's serum during the attack, whereas it was barely detectable before and after the attack. Altogether, these data collectively support that the detection of a soluble VE-cadherin fragment might have clinical interest as a potential biomarker for the diagnosis. As reported by Mehta et al. and others [16,17], a cytokine storm results from the SARS-CoV-2 infection, leading to increased capillary leakage of fluid, and recruitment of immune-inflammatory cells in lungs. Studies of Long COVID patients have shown persistent deregulation of a broad range of cytokines long after infection [1] and many vascular changes affect the entire pulmonary vascular tree, from large-calibre vessels to capillaries. Altogether, these data suggest that the EJ and VE-cadherin might have a role in the pathogenesis of Long COVID.

To support this hypothesis, the major protease Angiotensin Converting Enzyme-2 (ACE2) is a potential candidate to have a direct proteolytic action on VE-cadherin. Indeed ACE2 was shown to be expressed in different cell types including ECs [18–20]. Of great significance, ACE2 is an ecto-metallopeptidase orientated with its catalytic site facing the extracellular space. Its site of cleavage has been mapped and corresponds to the amino acid sequence PMKP-L, where the bond P-L is cleaved [21]. Furthermore, an active soluble ACE2 has been detected in the plasma of patients with heart failure [22,23]. To the best

of our knowledge, VE-cadherin cleavage has never been studied in COVID-19 disease. Importantly, we found two consensus sites of cleavage for ACE2 at the peptide bonds (²⁶⁶PF²⁶⁷) and (³²¹PMKP-L³²⁵) in the VE-cadherin adhesive extracellular domain. Thus, the goal of this study was to examine the effect of ACE2 on VE-cadherin extracellular domain, and to analyze ACE2 and VE-cadherin in blood from COVID-19 patients with mild or severe disease in relation to disease activity score. These data shed light on the possible enigma of the microcirculation dysfunction in COVID-19 disease.

2. Results

2.1. The EJ Are Cohesive Due to the Adhesive Properties of the Extracellular Domain of VE-Cadherin

Severe Acute Respiratory Syndrome-Corona Virus (SARS-CoV-2) infection causes endothelial cell injury in the COVID-19 disease leading to pulmonary pneumonia and acute respiratory distress syndrome. The pulmonary circulation is composed of pulmonary arteries and veins. Within the alveolar walls, the terminal arterioles break into a network of pulmonary capillaries. As illustrated in Figure 1a, a small capillary which can be composed of only 3 ECs maintains the blood flow through the integrity of EJ and also pericyte coverage. The ECs have pro-coagulant properties and one of the important compounds is the Von Willebrand factor, which is located in the small vesicles called Weibel-Palade bodies in the ECs (Figure 1a). The strength of ECs is due to the overlap of two ECs that can be seen in transmission electron microscopy (Figure 1b). An EJ is delineated by the dashed white line and the length of the EC junction is visualized by the red dashed line (Figure 1b). The cohesion between ECs is maintained by the adhesive transmembrane protein VE-cadherin specifically expressed in all ECs, which has a structure that allows homotypic interactions between the EC1 homologous repeats due to the presence of 2 conserved tryptophan residues in the N-terminal sequence [24] (Figure 1c). To study the protein, we next purified the human recombinant VE-cadherin ectodomain as described in Methods. It is a 90 kDa protein recognized by the monoclonal mouse anti-human VE-cadherin antibody (clone BV9) (Figure 1d, left panel). The presence of significant glycosylation sites can modify its predicted molecular mass. To further confirm this possibility the protein was subjected to a treatment with PGNase-F, which is the enzyme used for deglycosylation assays. As shown on Figure 1d, right panel, the molecular mass of the VE-cadherin was 75 kDa, which confirmed the sites of glycosylation that were mapped in the human VE-cadherin ectodomain [24]. Figure 1e illustrates the epitopes for several antibodies that can recognize this human recombinant VE-cadherin extracellular domain (hrED of VE-cadherin). These antibodies have been tested by western blot using hrED of VE-cadherin (Figure 1f). The mouse monoclonal anti-human VE-cadherin (clone BV9) recognized the recombinant protein in a dose-dependent manner (Figure 1f, left panel), which was further confirmed with the antibody directed against the domain EC1 (Figure 1f, right panel). Altogether, these tools were used to study whether VE-cadherin extracellular domain was a substrate for ACE2 in vitro.

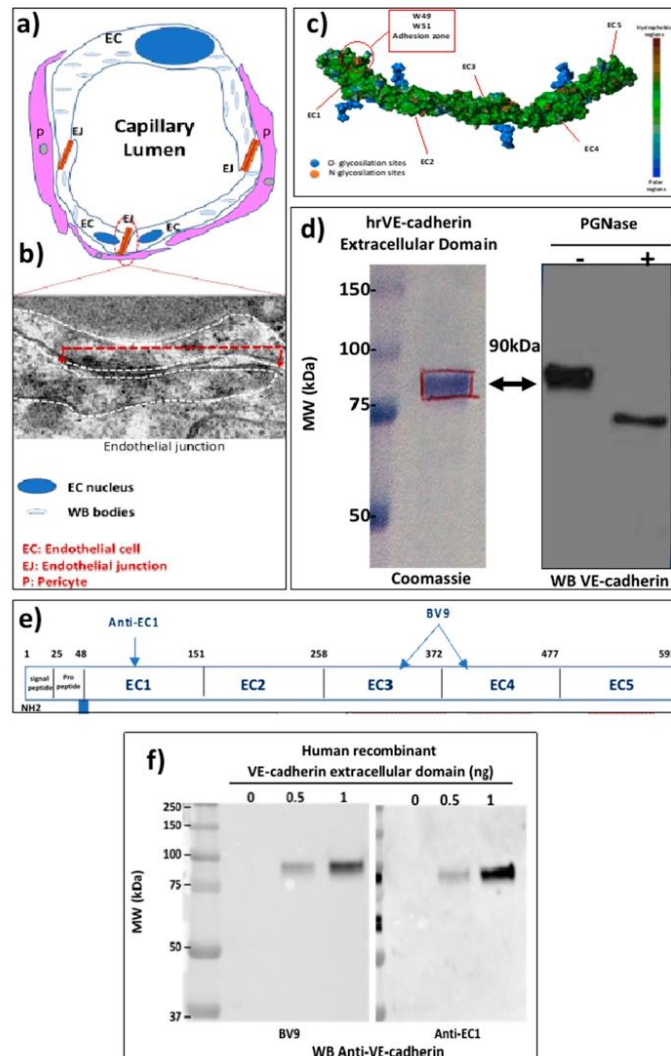


Figure 1. The EJ are composed of a transmembrane protein (VE-cadherin). (a) Schematic representation of a capillary composed of three ECs. The capillary is surrounded by pericytes. The overlap of two ECs is the EJ. (b) Electron microscopy of the endothelial junction. The dashed white line delineates two ECs. (c) Extracellular domain of VE-cadherin showing the hydrophobic amino acid W49 and W51 responsible for cohesion of ECs. (d) Coomassie-stained SDS-PAGE showing that human recombinant extracellular domain of VE-cadherin with an apparent mass of 90 kDa and immunoblotted with VE-cadherin antibody (clone BV9) not treated (left lane) or treated (right lane) with PGNase-F. (e) Schematic representation of VE-cadherin extracellular domain with the epitopes of the antibodies (Anti-EC1 and the clone BV9) against human VE-cadherin. (f) Immunoblotting of human recombinant VE-cadherin with the antibodies clone BV9 and anti-EC1. The positions of molecular mass standards (in kDa) are shown at the left. These experiments were repeated at least four times in a similar configuration.

2.2. VE-Cadherin Is a Direct Substrate for Angiotensin-Converting Enzyme-2 (ACE2)

ACE2 is a transmembrane zinc-containing metalloenzyme of 805 amino acid residues, with seven N-glycosylation sites and three disulfide bridges (Swiss-Prot code Q9BYF1). It is a single-pass type I integral membrane glycoprotein, orientated with the N-terminus and the catalytic site facing the extracellular space as an ectoenzyme. ADAM17, a member of the “A Disintegrin And Metalloproteases” (ADAMs) family, is known to cleave a variety of membrane-anchored proteins including ACE2. The cleaved form of ACE2 is called circulating ACE2 (cACE2), and is released as an enzymatically active ectodomain of ACE2 into the plasma that requires zinc cation for its activity [25]. The amino acid residues hydrolyzed by the peptidase reveals a potential consensus sequence, $P-X_{1-3}residue-P-\downarrow-X$ (hydrophobic/basic). The sequence of the VE-cadherin is depicted in Figure 2a and its adhesive extracellular domain is highlighted in yellow. We analyzed the potential sites of cleavage by ACE2 and found two consensus sites of cleavage at the peptide bonds ($^{266}P-F^{267}$) and ($^{321}PMKP-L^{325}$) that are highlighted in red in Figure 2a. Therefore, we hypothesized that VE-cadherin could represent a target for ACE2.

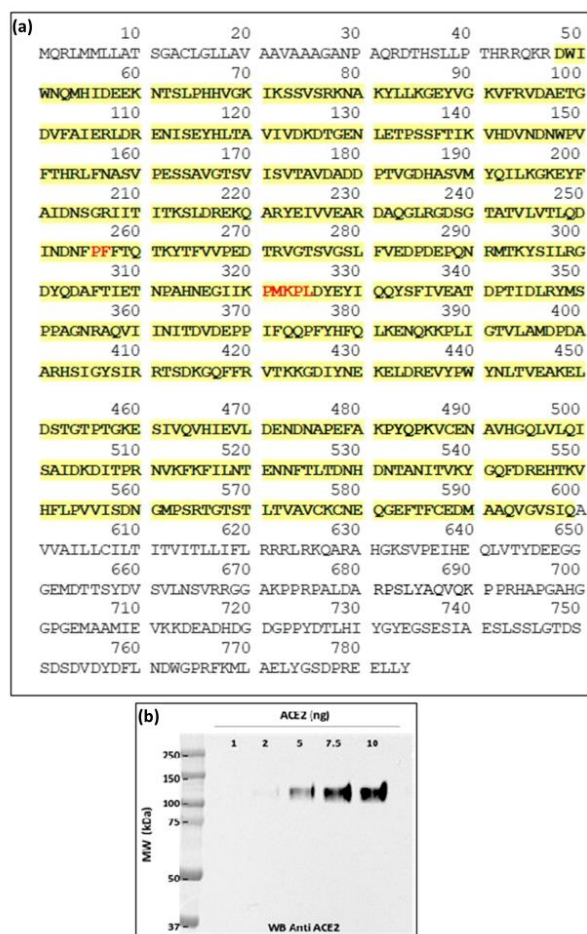


Figure 2. Cont.

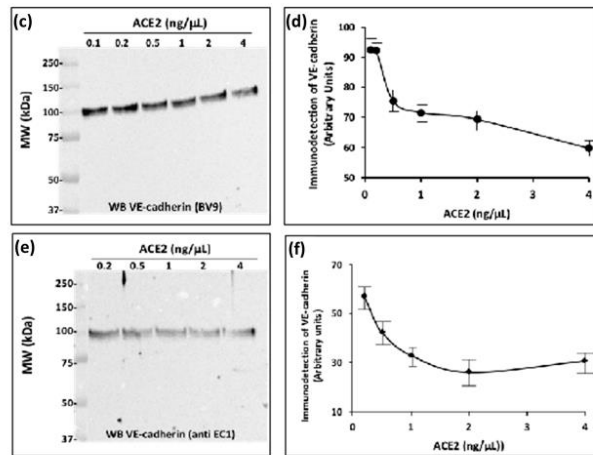


Figure 2. The extracellular domain of VE-cadherin is a substrate for the ectopeptidase ACE2: (a) VE-cadherin sequence. The yellow color highlights the amino acid sequence of the extracellular domain of the protein. The putative consensus site for the ACE2 cleavage is highlighted in red. (b) Representative western blot showing the human recombinant ACE2 (hrACE2) analyzed with the antibody directed against ACE2 extracellular domain. The positions of molecular mass standards (in kDa) are shown at the left (c,d). Representative western blots of VE-cadherin extracellular domain incubated overnight at room temperature with increasing concentrations of hrACE2 (0.1 to 4 ng/mL) in 50 mM 2-(N-Morpholino)-ethane sulfonic acid (MES), 300 mM NaCl, 10 μ M ZnCl₂, 0.01% Brig 35, pH 6.5). The samples were analyzed by SDS-PAGE and immunoblotting. The immunoreactive band was detected with the monoclonal anti VE-cadherin antibody (BV9) or the rabbit polyclonal anti-EC1 antibody (anti EC1). (e,f) Densitometric analysis of the 90 kDa band using ImageJ software showed a dose-dependent decrease in VE-cadherin band intensity. This experiment was performed four times (n = 4) under similar conditions with comparable results.

To investigate this possibility, we used a commercially available human recombinant ACE2 enzyme (hrACE2) and the hrED of VE-cadherin purified as described above. As shown in Figure 2b, the analysis of the hrACE2 ectoenzyme by SDS-PAGE and immunoblotting using the antibody directed against the ectodomain of the enzyme showed that one band was detected with the predicted molecular mass of 110 kDa. The purified protein rACE2 was then applied to the hrED of VE-cadherin *in vitro*, in the recommended conditions using the prediluted rACE2 in 50 mM 2-(N-Morpholino)-ethane sulfonic acid (MES), pH 6.5, 300 mM NaCl, 10 μ M ZnCl₂, 0.01% Brij 35. Increasing concentrations of hrACE2 were added to the extracellular domain of VE-cadherin overnight at room temperature. The mixture was then analyzed by SDS-PAGE and westernblotted with the mouse monoclonal antibody (BV9) and the rabbit polyclonal EC1 antibody directed against the extracellular domain of VE-cadherin (Figure 2c,d). The results show that after rACE2 incubation the intensity of the immunoreactive band detected either with the clone BV9 or with the anti-EC1 antibody decreased in a dose-dependent manner from 0.1 to 4 ng/mL. We quantified the densitometric absorption of the immunoreactive band using Image J software 1.54f (Figure 2e,f). The minimum threshold concentration of hrACE2 ectoenzyme required for the partial cleavage of VE-cadherin was 0.5 ng/mL, which corresponds to the concentration found in blood.

As expected, we found that VE-cadherin was a substrate for hrACE2 while the probability for hrACE2 to cleave VE-cadherin was unlikely because it is a carboxypeptidase. But we can speculate that during the cytokine storm induced by SARS-CoV-2 infection, VE-cadherin undergoes conformational rearrangements such as those described for phos-

phoproteins. Indeed, we have previously shown that VE-cadherin became a phosphoprotein in response to several cytokines, a process that is associated with disruption of cell-cell junctions [13]. Because phosphate groups are highly negatively charged, phosphorylation of VE-cadherin altered charge and thus conformational changes in the protein that favor its proteolytic cleavage [26]. Overall, the data from the present study suggest that the extracellular adhesive domain of VE-cadherin can be an unusual target for the ecto-metalloproteinase ACE2.

2.3. Circulating ACE2 Was Detected in Blood Samples from COVID-19 Patients

In order to know if such a process could occur *in vivo*, we first assessed the presence of cACE2 in COVID-19 patients with a mild or severe COVID-19 disease, since it was reported that the concentrations of cACE2 correlate with the systemic inflammation [27]. All nine patients studied here had COVID-19 infection that was confirmed by nasal reverse transcription coupled to gene-specific polymerase chain reaction. Blood samples were taken under fasting conditions at the diagnosis of infection, before systemic treatment was proposed. Severe forms of COVID-19 ($n = 5$) were defined as respiratory failure requiring mechanical ventilatory assistance, while mild forms ($n = 4$) were defined as patients requiring hospitalization but without mechanical ventilatory assistance. Patient characteristics are described in Table 1. The first group comprises 4 patients without admission to the intensive care unit (ICU) while in the other group, there were 5 patients admitted to ICU with respiratory failure at admission, O₂-supplementation and orotracheal intubation.

Table 1. Characteristics of COVID-19 patients with either a mild form (1, 2, 3, 9) that required only oxygen therapy or a severe form (4, 5, 6, 7, 8) that required resuscitation and intubation and admission to ICU (ICUA). The age, background and existing treatments of the patients are also summarized. For patients 1, 2, 3, 9 no mechanical ventilatory assistance was required. For patient 5, the prior treatment was not known.

Patients	Age	Management Protocol	ICUA	Background	Treatments
1	88	-	No	Hypertension, hyperuricaemia, Benine Prostate Hypertrophnia, chronic renal failure	Allopurinol, bétaxolol, fénofibrate, lercanidipine, alfuzosine
2	80	-	No	Hypertension, hyperuricaemia, Benine Prostate Hypertrophnia, chronic renal failure	bisoprolol, amiloride
3	67	-	No	OSAS, Benine Prostate Hypertrophnia, Rotator cuff surgery, sigmoidectomy for diverticular disease	none
9	63	-	No	Appendicitis	none
4	65	Mechanical ventilatory assistance, Prone position, NO/Pulmonary embolism thrombolysis	Yes	Deep vein thrombosis, obesity, OSAS, Umbilical hernia with prosthesis	none
5	86	Atrial Fibrillation, Pneumopathy (S aureus and enterobacter)	Yes	Hypertension, Atrial fibrillation treated with anti-clotting medication	-
6	52	Mechanical ventilatory assistance, Prone position, Pumonary embolism	Yes	Hiatal hernia, clavicle fracture	none
7	53	Mechanical ventilatory assistance, Prone position, Cardiopulmonary bypass	Yes	Hypertension, dyslipidemia, obesity	none
8	73	Mechanical ventilatory assistance, Prone position	Yes	Hypertension, diabetes	bisoprolol, vildagliptine/metformine, gliclazide, kardegic, pravastatine

The blood serum samples were diluted serially in a detergent-containing buffer according to our published protocol [13]. We chose to analyze the samples by western blot because we wanted to determine the apparent molecular mass of the expected cACE2. The diluted sera were analyzed on a 10% SDS-PAGE and immunoblotting with the anti-human ACE2 ectodomain monoclonal antibody. Figure 3a depicted the immunoblot for the ectodomain of cACE2 using the serum of patients with SARS-CoV-2 infection. The presence of only one species of cACE2 with a molecular mass of 75 kDa was highly detectable in patients with severe infection while it was weak in patients with mild disease. Densitometry analysis of the immunoreactive band corresponding to cACE2 showed a significant difference between the group of severe infection ($n = 5$) (24.08 ± 3.62) compared to the group with mild infection (6.67 ± 0.59) ($n = 4$) ($p = 0.014$) (Figure 3b). These data are consistent with the literature that showed a soluble form of ACE2 was detected in blood from COVID-19 patients with a severe infection [27].

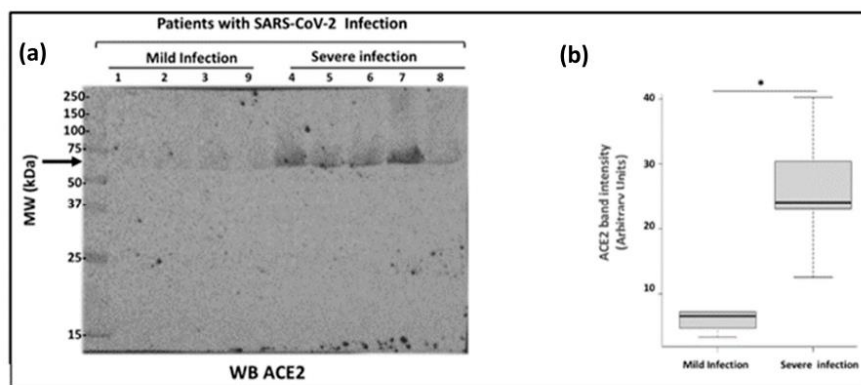


Figure 3. Analysis of circulating ACE2 in blood from patients with SARS-CoV-2 infection. (a) Blood samples from COVID-19 patients were analyzed by SDS-PAGE and immunoblotting. Blood samples were diluted serially from 1 to 10 followed by a dilution of 1 to 2.5. 15 μ L of sample preparations were loaded onto an SDS-PAGE and then transferred onto a nitrocellulose membrane. Proteins on the blots were visualized by Ponceau staining. The positions of molecular mass standards (in kDa) are shown at the left. The membranes were incubated with the anti-ACE2 antibody (5 μ g/mL) followed by incubation with the anti-mouse peroxidase antibody. The arrow on the left-hand side shows the immunoreactive band corresponding to cACE2. (b) Densitometry analysis of the immunoreactive band corresponding to cACE2 to compare the groups ($n = 4$ for mild infection and $n = 5$ for severe infection). Error bars represent mean \pm SE of means. p values from analysis of variance were assessed using the Mann-Whitney test ($* p < 0.05$). These experiments were repeated at least four times in a similar configuration.

2.4. Analysis of Soluble VE-Cadherin in Blood Samples from COVID-19 Patients

Next, we investigated if soluble VE-cadherin could be detected in the patient's blood and if yes, we wanted to determine its molecular weight. We thus analyzed the sera from the same patients (Table 1) by westernblotting using the antibody directed against VE-cadherin extracellular domain EC1. As a result, we demonstrated that several forms of soluble VE-cadherin were detected in patients with severe disease while only one form was found in patient's blood with mild disease (Figure 4a). In the blood from patients having a severe infection, the apparent molecular masses of VE-cadherin were 70 kDa (4.14 ± 0.56 vs. 26.51 ± 3.72 ; $p = 0.015$), 62 kDa (6.89 ± 1.45 vs. 24.33 ± 3.53 ; $p = 0.015$), and 54 kDa (26.44 ± 3.83 vs. 36.64 ± 7.76 ; $p = 0.015$) (Figure 4b). The immunoreactive band with an apparent molecular mass of 54 kDa was the only one expressed in the patients with mild infection. Our data provide evidence for multiple forms of the truncated VE-cadherin

depending on the severity of the disease. In rheumatoid arthritis and HAE, we previously showed a 90 kDa band corresponding to the full length of the extracellular domain of the protein which was a marker related to disease activity score [9,14]. The results presented here need further investigations to better understand whether these different soluble forms of VE-cadherin might represent good clinical biomarkers to classify the patients.

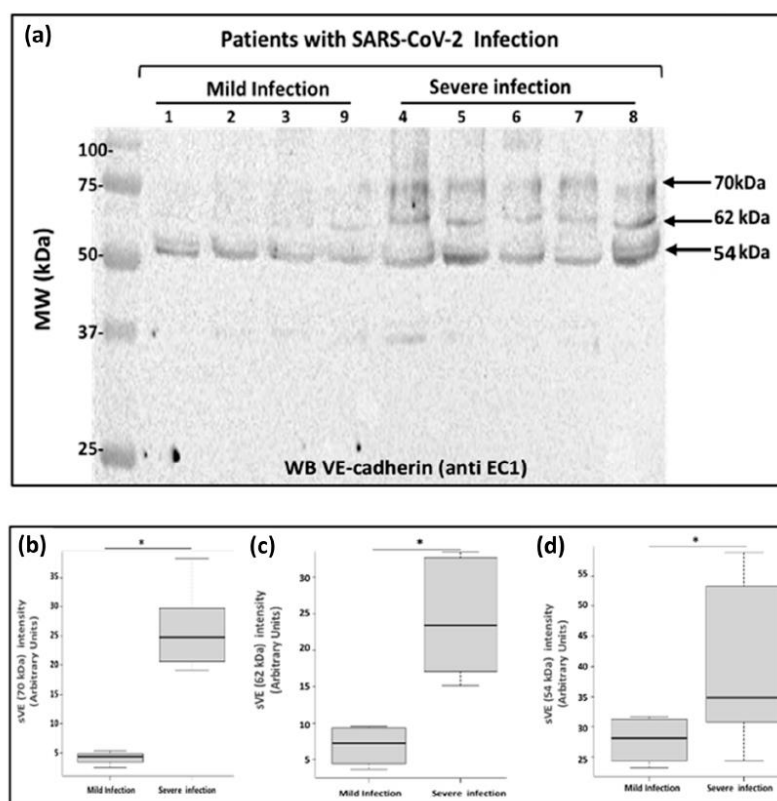


Figure 4. Analysis of the soluble forms of VE-cadherin in COVID-19 patient blood. (a) Blood samples from COVID-19 patients were analyzed by SDS-PAGE and immunoblotting. Proteins on the blots were visualized by Ponceau staining. Blood samples were diluted serially from 1 to 10 followed by a dilution of 1 to 5 (total dilution 1:50). 15 μ L of sample preparations were loaded onto the gel and then immunoblotted with the anti-VE-cadherin antibody (EC1 1:250) overnight at 4 $^{\circ}$ C followed by an incubation with the goat anti-rabbit peroxidase antibody (1:2000). Arrows indicate the apparent molecular masses of the immunoreactive VE-cadherin. The positions of molecular mass standards (in kDa) are shown at the left. This experiment is representative of three independent experiments. (b–d). Densitometry analysis to compare the groups ($n = 4$ for mild infection and $n = 5$ for severe infection) for the three different forms of soluble VE-cadherin 70 kDa (b), 62 kDa (c), 54 kDa (d). The differences between patient groups were assessed as being significant using Mann-Whitney analysis ($* p < 0.05$). These experiments were repeated at least four times in a similar configuration.

2.5. Proposed Model Scheme for Endothelial Dysfunction following SARS-CoV-2 Infection

We have illustrated in Figure 5 a proposed scheme of the COVID-19 microenvironment at the pulmonary level. The very close interaction between pneumocytes (P1, P2), alveolar macrophages, and EC of pulmonary capillaries led us to propose that the infection

by the virus creates an environment where several molecules (cytokines, proteases) can induce structural changes in the cytoplasmic domain of VE-cadherin (e.g., TNF) such as by phosphorylation processes. Tyrosine phosphorylation will change the charge of the protein, resulting in alterations of the affinity of VE-cadherin homophilic interactions of the extracellular domain [7]. This post-translational modification renders the protein more susceptible to proteases such as for cell-surface associated receptor tyrosine kinases [26]. Thus, it is tempting to suggest that the protease ACE2 could be released from the membrane of ECs by ADAM17, to further cleave the extracellular adhesive domain of VE-cadherin at the two sites for active cACE2.

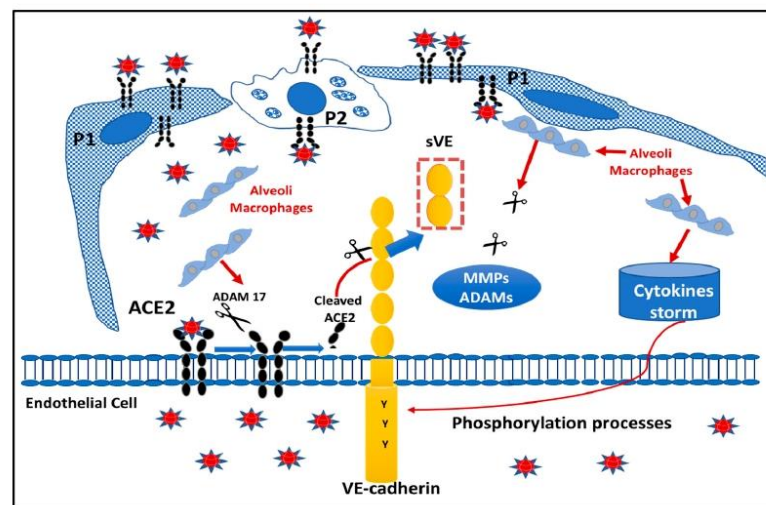


Figure 5. Proposed model of Pulmonary Endothelial dysfunction in COVID patients: In the pulmonary environment, the ECs are surrounded by pneumocytes (P1, and P2) and macrophages that are responsible for the cytokine storm. ACE2 is present on ECs as a transmembrane protein whose catalytic site is outside the cells (ectopeptidase). ACE2 can be cleaved by ADAM 17 and leads to the generation of a circulating active form of ACE2. VE-cadherin is a transmembrane protein exclusively expressed in ECs, which can be subjected to post-translational modifications including tyrosine phosphorylation upon cytokine challenge. This covalent modification will lead to a conformational change in the protein structure, which presents a high sensitivity to proteases. Thus, the ACE2 enzyme will act directly to its potential site of cleavage generating the fragments of VE-cadherin seen in the patient's blood.

3. Discussion

Recent clinical reports [4,5] coupled with previous publications [5,6] provide strong evidence to consider that the EJ structure is a central target that leads to damage to ECs, endothelialitis, coagulopathy and microcirculation dysfunction in SARS-CoV-2 infection. The findings presented here demonstrate for the first time that VE-cadherin, a ubiquitous endothelial cell marker expressed at the adherens junctions of ECs, is modulated in vitro by the angiotensin-converting enzyme-2 (ACE2). The most compelling results arise from our studies showing the two sites of cleavage at the positions ²⁵⁶P-F²⁵⁷ and ³²¹PMKP-³²⁵L in VE-cadherin adhesive ectodomain. The accessibility of these sites of cleavage by the ectoenzyme ACE2 requires conformational changes in the structure of VE-cadherin, which are a consequence of phosphorylation by cytokines (i.e., TNF alpha; Bradykinin, VEGF, etc., ...) released following SARS-CoV-2 infection [6]. Of interest, previous studies have shown that ACE2 can also hydrolyze several peptides such as dynorphin A (1–13), apelin-13,

des-Arg⁹ bradykinin, β -casomorphin and ghrelin [28]. The capacity of ACE2 to hydrolyze substrates other than Ang II suggests that ACE2 may have other functions that remain to be explored [28]. Varga et al. showed that SARS-CoV-2 infection causes vascular inflammation in different organs [4]. In contrast to normal conditions, the endothelium and more precisely VE-cadherin become activated by circulating inflammatory mediators, which could account for the vascular symptoms observed in patients having a mild or severe forms of COVID-19 disease. Given the central role of ACE2 in SARS-CoV-2 infection, and the central role of VE-cadherin in the integrity of the endothelium, we hypothesize that the vascular symptoms in the “Long COVID” might be due to VE-cadherin attack. Our hypothesis is supported by our measurements of several soluble forms of VE-cadherin in the blood of patients with COVID-19. Indeed, we detected for the first time three different fragments of truncated VE-cadherin with apparent molecular mass of 70, 62, and 54 kDa in the blood of patients presenting severe COVID-19 disease. In comparison, only the 54 kDa was found in patients with mild COVID-19 disease. The putative sites for ACE2 cleavage located in EC2 and EC3 ectodomain of VE-cadherin could produce the 62 and 54 kDa forms that we identified [29]. However, we cannot exclude the involvement of other proteases such as neutrophil elastase, which was recently published in COVID-19 patients [30], as well as serine proteases such as proteinase 3, cathepsins, and ADAMs from neutrophils [31]. Our description of VE-cadherin cleavage in COVID patients is original and novel and the future quantification of soluble VE-cadherin fragments will provide a blood test for personalized COVID-19 patient care, management and follow-up. The soluble VE-cadherin has already been recognized as a marker of different vascular pathologies including atherosclerosis, rheumatoid arthritis and more recently in Obstructive Sleep Apnea Syndrome [32–34]. Further investigations will be of major importance to determine the association between several forms of soluble VE-cadherin, vascular endothelial dysfunctions and coagulopathies in Long COVID-19 [1].

Taking into account the local pulmonary environment and the damage to other organs in COVID-19, we hypothesize that the combined actions of ACE2 and/or other proteases might be at the origin of vascular lesions. ACE2 has been described as a transmembrane enzyme [35], whose role was perfectly described as being the receptor for SARS-CoV-2 but its functions as a soluble effector remain to be defined [36]. Previous studies have shown soluble form of ACE2 in human, murine fluids and airways and its shed ectodomain comprises its carboxypeptidase activity [37]. This cACE2 form is normally found in the blood of healthy donors at low levels. Here we demonstrate that cACE2 was detected in blood from COVID-19 patients at a higher level in patients with severe infection. These results are in agreement with previous data reporting that cACE2 was correlated with the severity of COVID-19 disease [23,38]. In recent reports from the literature, cACE2 is more considered as a prognostic marker in monitoring diseases as it can be a potential therapeutic target to inhibit SARS-CoV-2 entry into cells [39] as well as the therapeutic use of human recombinant ACE2 [40,41]. In those publications, the quantification of cACE2 in plasma or serum is based on enzyme activity (relative fluorescence units), with the conversion to a concentration of enzyme by reference to a standard curve [42]. In comparison, here we demonstrate directly the presence of cACE2 in blood from COVID-19 patients using western blot. Indeed, this technique uses denaturing conditions. Furthermore, the blood samples were treated according to our patent that provided a method to increase the sensitivity of detection of serum protein biomarkers by diluting the serum in a detergent-containing buffer to remove the masking influence of the lipoproteins and other lipids [43]. The antibody used for the detection of cACE2 in the blood was the commercially available antibody used for recognition of hrACE2 (see Figure 2). All the samples were analyzed on the same gel so the exposure was the same and it was possible to compare the two groups of patients with the immunodetection of only one band associated with severe infections. To the best of our knowledge, this is the first description of cACE2 detection in blood in which the apparent molecular mass corresponds to the 740 amino acid sequence of the ectodomain of ACE2 [44]. Nonetheless, the amount of cACE2 has not been quantified in

our study because the specificity of the antibodies might differ based on the glycosylation processes. In future studies, in addition to western blots, it would be of interest to develop immunoquantification of cACE2 based on different antibodies that could recognize all the forms of the enzyme in patient's blood.

To conclude, future fundamental research is still needed to explore whether SARS-CoV-2 targets VE-cadherin through proteases or other activated pathways within the SARS-CoV-2 environment. However, the results provided in this study regarding the detection of both cACE2 and soluble VE-cadherin in blood are very encouraging for predicting gradations in the severity of SARS-CoV-2 infection. Continuing efforts to elucidate whether the size of sVE fragments in the blood of COVID-19 patients would be of prime significance to provide clinicians with quantifiable information on which to base decision-making to precisely target the actors of "infection" and "damage" caused by COVID-19 to allow "personalized" medicine. Altogether, these data shed light on the possible vascular "Long COVID-19" disease.

4. Materials and Methods

4.1. Antibodies

Recombinant Human ACE2 Protein (933-ZN) was purchased from R&D Systems (Minneapolis, MN, USA) and stored in a buffer according to the manufacturer's instructions. Monoclonal mouse anti-human ACE2 Antibody (MAB933) was purchased from R&D Systems (Minneapolis, MN, USA). Human recombinant VE-cadherin extracellular domain (EC1-5) was produced in the laboratory. Peroxidase AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (H + L) (AB-2338447), Peroxidase AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (H + L) (AB-2307391), and Cy3TM AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (H + L) (AB-2338680) were all purchased from Jackson ImmunoResearch (Ely, Cambridgeshire, UK). Hoechst solution (33,258) was purchased from Sigma Aldrich. The mouse monoclonal anti-human VE-cadherin antibody (clone BV9) and the rabbit polyclonal anti-EC1 anti-human VE-cadherin antibody were produced in the laboratory.

4.2. Cell Culture

Human embryonic kidney cells (HEK293-EBTNA) were grown as described in [13].

4.3. Protein Extracts Analysis

Protein extraction, SDS-PAGE and Immunoblotting were performed according to [13]. Briefly, the human glycosylated VE-cadherin extracellular domain was produced from human embryonic kidney cells (HEK293-EBTNA) according to a previously published protocol [24]. Proteins were subjected to electrophoresis on SDS-PAGE 10%, and then transferred onto a 0.45 μ m nitrocellulose membrane. Membranes were blocked with milk, incubated with primary antibodies and corresponding HRP-conjugated secondary antibodies. Immunoreactive proteins were visualized by Bio-Rad ChemiDocTM with ECL reagent (Bio-Rad Laboratories, 92430 Marnes-la-Coquette, FRANCE) and were quantified using densitometry with Image-J software (NIH, Bethesda, MD, USA). All Western blots were representative of at least three to four independent experiments with similar findings.

4.4. Patient Sera

Samples were taken from a serum bank that was available at Grenoble University Hospital. Analyses were performed on samples from 9 patients with COVID-19. Five of them had a severe form of COVID-19 with a passage in resuscitation and intubation. The other 4 patients had mild forms, requiring only oxygen therapy (see Table 1).

4.5. Statistical Analysis

All the experiments were repeated at least three times. Data are expressed in arbitrary units as the mean \pm SD of at least 3 identical experiments and were com-

pared using Mann-Whitney test. For all tests, p values less than or equal to 0.05 were considered significant.

Author Contributions: Conceptualization, L.B. (Laurence Bouillet), D.K.M. and I.V.; experimentation, I.V., C.G., M.B., L.B. (Laura Bouvet) and O.G., formal analysis, A.D., C.G. and L.B. (Laurence Bouillet); writing—original draft preparation, I.V.; writing—review and editing, I.V. and D.K.M.; supervision, I.V.; funding acquisition, L.B. (Laurence Bouillet) and I.V. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by the French National Institute of Health and Medical Research (INSERM), the French Atomic Energy and Alternative Energies Commission (CEA), Fundamental Research Division/Interdisciplinary Research Institute of Grenoble/Department of Health/Biosciences et Bioingénierie pour la Santé (BGE) (UMRS 13), and the Internal Medicine department. M Benmarce and O Garnier received funding from Grenoble Alliance for Integrated Structural & Cell Biology Foundation (GRAL), a program from the Chemistry Biology Health (CBH) Graduate School of University Grenoble Alpes (ANR-17-EURE-0003). C Guérin was an Interne from the internal medicine division and had one year of research that was supported by University Grenoble Alpes. L Bouvet was funded by the internal research budget of the internal medicine department.

Institutional Review Board Statement: Study was conducted on patient samples from the biological collection #DC-2020-4034 that is maintained at the Grenoble University Hospital.

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: Not applicable.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Zanini, G.; Selleri, V.; Roncati, L.; Coppi, F.; Nasi, M.; Farinetti, A.; Manenti, A.; Pinti, M.; Mattioli, A.V. Vascular “Long COVID”: A new vessel disease? *Angiology* **2023**, *33*, 197231153204. [CrossRef]
- Wu, C.; Chen, X.; Cai, Y.; Xia, J.; Zhou, X.; Xu, S.; Huang, H.; Zhang, L.; Zhou, X.; Du, C.; et al. Risk factors associated with acute respiratory distress syndrome and death in patients with Coronavirus disease 2019 pneumonia in Wuhan, China. *JAMA Intern. Med.* **2020**, *180*, 934–943. [CrossRef]
- WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard. Available online: <https://covid19.who.int> (accessed on 1 January 2020).
- Varga, Z.; Flammer, A.J.; Steiger, P.; Haberecker, M.; Andermatt, R.; Zinkernagel, A.S.; Mehra, M.R.; Schuepbach, R.A.; Ruschitzka, F.; Moch, H. Endothelial cell infection and endotheliitis in COVID-19. *Lancet* **2020**, *395*, 1417–1418. [CrossRef] [PubMed]
- Ackermann, M.; Verleden, S.E.; Kuehnel, M.; Haverich, A.; Welte, T.; Laenger, F.; Vanstapel, A.; Werlein, C.; Stark, H.; Tzankov, A.; et al. Pulmonary vascular endothelialitis, thrombosis, and angiogenesis in COVID-19. *N. Engl. J. Med.* **2020**, *383*, 120–128. [CrossRef] [PubMed]
- Chhetri, S.; Khamis, F.; Pandak, N.; Al Khalili, H.; Said, E.; Petersen, E. A fatal case of COVID-19 due to metabolic acidosis following dysregulate inflammatory response (cytokine storm). *IDCases* **2020**, *21*, e00829. [CrossRef]
- Lampugnani, M.G.; Dejana, E.; Giampietro, C. Vascular Endothelial (VE)-Cadherin, endothelial adherens junctions, and vascular disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2018**, *10*, a029322. [CrossRef] [PubMed]
- Gory-Fauré, S.; Prandini, M.H.; Pointu, H.; Roullot, V.; Pignot-Paintrand, I.; Vernet, M.; Huber, P. Role of vascular endothelial-cadherin in vascular morphogenesis. *Development* **1999**, *126*, 2093–2102. [CrossRef]
- Sidibé, A.; Mannic, T.; Arboleas, M.; Subileau, M.; Gulino-Debrac, D.; Bouillet, L.; Jan, M.; Vandhuick, T.; Le Loët, X.; Vittecoq, O.; et al. Soluble VE-cadherin in rheumatoid arthritis patients correlates with disease activity: Evidence for tumor necrosis factor α -induced VE-cadherin cleavage. *Arthritis Rheum* **2012**, *64*, 77–87. [CrossRef]
- Hudry-Clergeon, H.; Stengel, D.; Ninio, E.; Vilgrain, I. Platelet-activating factor increases VE-cadherin tyrosine phosphorylation in mouse endothelial cells and its association with the PtdIns3'-kinase. *FASEB J.* **2005**, *19*, 512–520. [CrossRef]
- Wallez, Y.; Vilgrain, I.; Huber, P. Angiogenesis: The VE-cadherin switch. *Trends Cardiovasc. Med.* **2006**, *16*, 55–59. [CrossRef]
- Lambeng, N.; Wallez, Y.; Rampon, C.; Cand, F.; Christé, G.; Gulino-Debrac, D.; Vilgrain, I.; Huber, P. Vascular endothelial-cadherin tyrosine phosphorylation in angiogenic and quiescent adult tissues. *Circ. Res.* **2005**, *96*, 384–391. [CrossRef] [PubMed]
- Vilgrain, I.; Sidibé, A.; Polena, H.; Cand, F.; Mannic, T.; Arboleas, M.; Bocard, S.; Baudet, A.; Gulino-Debrac, D.; Bouillet, L.; et al. Evidence for post-translational processing of vascular endothelial (VE)-cadherin in brain tumors: Towards a candidate biomarker. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e80056. [CrossRef]
- Bouillet, L.; Mannic, T.; Arboleas, M.; Subileau, M.; Massot, C.; Drouet, C.; Huber, P.; Vilgrain, I. Hereditary angioedema: Key role for kallikrein and bradykinin in vascular endothelial-cadherin cleavage and edema formation. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2011**, *128*, 232–234. [CrossRef] [PubMed]

15. Bouillet, L.; Vilgrain, I. VE-cadherin, a potential marker for endothelial cell activation during hereditary angioedema attacks. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2014**, *134*, 241. [\[CrossRef\]](#)
16. Mehta, P.; McAuley, D.F.; Brown, M.; Sanchez, E.; Tattersall, R.S.; Manson, J.J. COVID-19: Consider cytokine storm syndromes and immunosuppression. *Lancet* **2020**, *395*, 1033–1034. [\[CrossRef\]](#)
17. Channappanavar, R.; Perlman, S. Pathogenic human coronavirus infections: Causes and consequences of cytokine storm and immunopathology. *Semin. Immunopathol.* **2017**, *39*, 529–539. [\[CrossRef\]](#)
18. Beyerstedt, S.; Casaro, E.B.; Rangel, E.B. COVID-19: Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) expression and tissue susceptibility to SARS-CoV-2 infection. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **2021**, *40*, 905–919. [\[CrossRef\]](#)
19. Kuba, K.; Imai, Y.; Rao, S.; Gao, H.; Guo, F.; Guan, B.; Huan, Y.; Yang, P.; Zhang, Y.; Deng, W.; et al. A crucial role of angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) in SARS coronavirus-induced lung injury. *Nat. Med.* **2005**, *11*, 875–879. [\[CrossRef\]](#)
20. Hamming, I.; Timens, W.; Bulthuis, M.L.; Lely, A.T.; Navis, G.; van Goor, H. Tissue distribution of ACE2 protein, the functional receptor for SARS coronavirus. A first step in understanding SARS pathogenesis. *J. Pathol.* **2004**, *203*, 631–637. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
21. Vickers, C.; Hales, P.; Kaushik, V.; Dick, L.; Gavin, J.; Tang, J.; Godbout, K.; Parsons, T.; Baronas, E.; Hsieh, F.; et al. Hydrolysis of biological peptides by human angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 14838–14843. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
22. Sama, I.E.; Ravera, A.; Santema, B.T.; van Goor, H.; Ter Maaten, J.M.; Cleland, J.G.F.; Rienstra, M.; Friedrich, A.W.; Samani, N.J.; Ng, L.L.; et al. Circulating plasma concentrations of angiotensin-converting enzyme 2 in men and women with heart failure and effects of renin-angiotensin-aldosterone inhibitors. *Eur. Heart J.* **2020**, *41*, 181017. [\[CrossRef\]](#)
23. Kragstrup, T.W.; Singh, H.S.; Grundberg, I.; Nielsen, A.L.; Rivellese, F.; Mehta, A.; Goldberg, M.B.; Filbin, M.R.; Qvist, P.; Bibby, B.M. Plasma ACE2 predicts outcome of COVID-19 in hospitalized patients. *PLoS ONE* **2021**, *16*, e0252799. [\[CrossRef\]](#)
24. Brasch, J.; Harrison, O.J.; Ahlsen, G.; Carnally, S.M.; Henderson, R.M.; Honig, B.; Shapiro, L. Structure and binding mechanism of vascular endothelial cadherin: A divergent classical cadherin. *J. Mol. Biol.* **2011**, *408*, 57–73. [\[CrossRef\]](#)
25. Grobe, N.; Di Fulvio, M.; Kashkari, N.; Chodavarapu, H.; Somnineni, H.K.; Singh, R.; Elased, K.M. Functional and molecular evidence for expression of the renin angiotensin system and ADAM17-mediated ACE2 shedding in COS7 cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **2015**, *308*, C767–C777. [\[CrossRef\]](#)
26. Tompa, P. The principle of conformational signaling. *Chem. Soc. Rev.* **2016**, *45*, 4252–4284. [\[CrossRef\]](#)
27. Komilov, S.A.; Lucas, I.; Jade, K.; Dai, C.L.; Lovejoy, J.C.; Magis, A.T. Plasma levels of soluble ACE2 are associated with sex, Metabolic Syndrome, and its biomarkers in a large cohort, pointing to a possible mechanism for increased severity in COVID-19. *Crit. Care* **2020**, *24*, 452. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
28. Warner, F.J.; Smith, A.I.; Hooper, N.M.; Turner, A.J. Angiotensin-converting enzyme-2: A molecular and cellular perspective. *Cell. Mol. Life Sci.* **2004**, *61*, 2704–2713. [\[CrossRef\]](#)
29. Vassiliou, A.G.; Keskinidou, C.; Jahaj, E.; Gallos, P.; Dimopoulou, I.; Kotanidou, A.; Orfanos, S.E. ICU Admission Levels of Endothelial Biomarkers as Predictors of Mortality in Critically Ill COVID-19 Patients. *Cells* **2021**, *10*, 186. [\[CrossRef\]](#)
30. Montanari, M.; Canonico, B.; Nordi, E.; Vandini, D.; Barocci, S.; Benedetti, S.; Carlotti, E.; Zamai, L. Which ones, when and why should renin-angiotensin system inhibitors work against COVID-19? *Adv. Biol. Regul.* **2021**, *81*, 100820. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
31. D'Amato, M.; Vertui, V.; Pandolfi, L.; Bozzini, S.; Fossali, T.; Colombo, R.; Aliberti, A.; Fumagalli, M.; Iadarola, P.; Didò, C.; et al. Investigating the link between Alpha-1 Antitrypsin and human neutrophil elastase in bronchoalveolar lavage fluid of COVID-19 patients. *Curr. Issues Mol. Biol.* **2022**, *44*, 2122–2138. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
32. Flemming, S.; Burkard, N.; Renschler, M.; Vielmuth, F.; Meir, M.; Schick, M.A.; Wunder, C.; Germer, C.T.; Spindler, V.; Waschke, J.; et al. Soluble VE-cadherin is involved in endothelial barrier breakdown in systemic inflammation and sepsis. *Cardiovasc. Res.* **2015**, *107*, 32–44. [\[CrossRef\]](#)
33. Harki, O.; Tamisier, R.; Pépin, J.L.; Bailly, S.; Mahmani, A.; Gonthier, B.; Salomon, A.; Vilgrain, I.; Faury, G.; Briancon-Marjollet, A. VE-cadherin cleavage in sleep apnea: New insights into intermittent hypoxia-related endothelial permeability. *Eur. Respir. J.* **2021**, *58*, 2004518. [\[CrossRef\]](#)
34. Blaise, S.; Polena, H.; Vilgrain, I. Soluble vascular endothelial-cadherin and auto-antibodies to human vascular endothelial-cadherin in human diseases: Two new biomarkers of endothelial dysfunction. *Vasc. Med.* **2015**, *20*, 557–565. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
35. Hooper, N.M. Angiotensin converting enzyme: Implications from molecular biology for its physiological functions. *Int. J. Biochem.* **1991**, *23*, 641–647. [\[CrossRef\]](#)
36. Patel, V.B.; Clarke, N.; Wang, Z.; Fan, D.; Parajuli, N.; Basu, R.; Putko, B.; Kassiri, Z.; Turner, A.J.; Oudit, G.Y. Angiotensin II induced proteolytic cleavage of myocardial ACE2 is mediated by TACE/ADAM-17: A positive feedback mechanism in the RAS. *J. Mol. Cell Cardiol.* **2014**, *66*, 167–176. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
37. Jia, H.P.; Look, D.C.; Tan, P.; Shi, L.; Hickey, M.; Gakhar, L.; Chappell, M.C.; Wohlford-Lenane, C.; McCray, P.B., Jr. Ectodomain shedding of angiotensin converting enzyme 2 in human airway epithelia. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **2009**, *297*, L84–L96. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
38. Ramchand, J.; Burrell, L.M. Circulating ACE2: A novel biomarker of cardiovascular risk. *Lancet* **2020**, *396*, 937–939. [\[CrossRef\]](#)
39. Scialo, F.; Daniele, A.; Amato, F.; Pastore, L.; Matera, M.G.; Cazzola, M.; Castaldo, G.; Bianco, A. ACE2: The Major Cell Entry Receptor for SARS-CoV-2. *Lung* **2020**, *198*, 867–877. [\[CrossRef\]](#)

40. Monteil, V.; Kwon, H.; Prado, P.; Hagelkrüys, A.; Wimmer, R.A.; Stahl, M.; Leopoldi, A.; Garreta, E.; Hurtado Del Pozo, C.; Prosper, F.; et al. Inhibition of SARS-CoV-2 Infections in Engineered Human Tissues Using Clinical-Grade Soluble Human ACE2. *Cell* **2020**, *181*, 905–913. [[CrossRef](#)]
41. Allison, S. Soluble ACE2 in SARS-CoV-2 infection. *Nat. Rev. Nephrol.* **2021**, *17*, 297. [[CrossRef](#)]
42. Epelman, S.; Tang, W.H.; Chen, S.Y.; Van Lente, F.; Francis, G.S.; Sen, S. Detection of soluble angiotensin-converting enzyme 2 in heart failure: Insights into the endogenous counter-regulatory pathway of the renin-angiotensin-aldosterone system. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2008**, *52*, 750–754. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Vilgrain, I.; Cand, F.; Pelletier, L. Circulating VE-Cadherin as a Predictive Marker of Sensitivity or Resistance to Anti-Tumoral Treatment and Improved Method for the Detection of soluble Proteins. U.S. Patent 20100121171A10, 23 November 2006.
44. Lambert, D.W.; Yarski, M.; Warner, F.J.; Thornhill, P.; Parkin, E.T.; Smith, A.I.; Hooper, N.M.; Turner, A.J. Tumor necrosis factor- α convertase (ADAM17) mediates regulated ectodomain shedding of the severe-acute respiratory syndrome-coronavirus (SARS-CoV) receptor, angiotensin-converting enzyme-2 (ACE2). *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 30113–30119. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

III.4. Conclusion et perspectives

L'altération des jonctions endothéliales engendre des dommages aux cellules endothéliales, l'endothelialitis et le dysfonctionnement de la microcirculation suite à une infection par le COVID.

Dans cette étude, nous avons démontré l'implication de la VE-cadhérine, exprimée au niveau des jonctions d'adhérence dans cette pathologie. En effet, il a été démontré le clivage de la partie extracellulaire par ACE2 de la VE-cadhérine chez les patients atteints de COVID. De manière intéressante, cette étude a révélé la présence de plusieurs formes clivées. La présence de certaines formes de tailles 70, 62 et 54 kDa serait associée à des formes graves de la pathologie alors que la 54 kDa seule serait quant à elle présente dans les cas de COVID bénin. Les séquences reconnues par ACE2 se situent au niveau de l'ectodomaine 2 et 3 pouvant ainsi produire les formes solubles de 62 et 54 kDa. On peut expliquer la troisième forme par la possibilité que d'autres protéases présentes parmi toutes les cytokines circulantes au cours de l'infection. Le clivage ne serait possible que si la conformation de la VE-cadhérine est modifiée suite aux phosphorylations, ce qui a été montré pour d'autres phosphoprotéines. D'autres études seront nécessaires pour confirmer ces résultats sur de plus grandes cohortes.

Cette étude montre pour la première fois l'action d'ACE2 circulants chez les patients atteints de COVID sévère, induisant principalement le clivage de diverses formes de VE-cadhérine. Ces différentes formes de VE-cadhérine soluble seraient des biomarqueurs de la gravité de pathologie, tout comme la présence d'ACE2 dans le plasma des patients pourrait également servir de biomarqueur. Il serait intéressant d'étudier l'effet de l'inhibition du clivage d'ACE2 par une désintégrine et métalloprotéase 17 (ADAM17) afin de déterminer si on observe la présence de la forme à 74 kDa et ainsi confirmer que le clivage provient d'une autre protéase. Il serait tout aussi pertinent de regarder l'effet de cette inhibition sur l'angiogenèse et la morphologie du poumon, afin de déterminer si on constate une amélioration des symptômes et si l'absence de clivage de la VE-cadhérine est suffisant pour rétablir l'intégrité des vaisseaux.

PARTIE 3

**Discussions générales et
perspectives de la thèse**

La modification de l'état de phosphorylation de la VE-cadhérine entraîne des altérations majeures dans l'intégrité de l'endothélium associées à de nombreuses pathologies. En effet, une mutation sur Y731 de la VE-cadhérine impacte fortement la diapédèse des leucocytes, tandis que la phosphorylation sur Y658 de la VE-cadhérine induit l'endocytose de la VE-cadhérine contribuant à une perte de la stabilité des jonctions. En ce qui concerne Y685 de la VE-cadhérine, sa phosphorylation induit un clivage de la VE-cadhérine et une augmentation de la perméabilité. La partie extracellulaire de la VE-cadhérine a d'ailleurs été détectée dans le sang des patients atteints de cancer du sein, de cancer du rein et de glioblastome. Par conséquent, étudier le rôle exact de ce site Y685 de la VE-cadhérine et son effet sur les différentes fonctions de la cellule endothéliale est primordial pour parvenir à une compréhension plus profonde de la vasculature en conditions physiologique et pathologique.

En ce sens, nous nous sommes intéressés à un organe hautement vascularisé, le poumon, dont une perturbation de la VE-cadhérine est synonyme de nombreuses pathologies allant de ARDS à l'IPF. Notre étude en condition physiologique a permis pour la première fois de mettre en évidence un tout nouvel aspect de Y685 de la VE-cadhérine. Elle a souvent été décrite comme cible des protéines angiogéniques comme VEGFR2, des phosphatases VE-PTP et des tyrosines kinases Src et Yes. Mais ici, nous avons démontré qu'elle possédait aussi une capacité de régulation. Y685 de la VE-cadhérine contrôle l'expression d'un grand nombre de gènes qui sont reliés à ses fonctions : l'angiogenèse et l'adhésion cellulaire. Elle va ainsi influencer sur le comportement même de la cellule endothéliale en altérant son caractère angiogénique et sa capacité d'adhésion, jusqu'à augmenter la stabilité des vaisseaux endothéliaux. En termes mécanistiques, Y685 de la VE-cadhérine régule l'expression des gènes par la délocalisation nucléaire d'un de ses partenaires, la β -caténine connue comme modulateur de l'expression génique. Elle favorise aussi la liaison du facteur de transcription FOXF1 sur le promoteur S1PR1 amenant à la surexpression de cette dernière. S1PR1 est une protéine impliquée dans la stabilisation des vaisseaux et l'inhibition de l'angiogenèse corrélant nos résultats. Des précédentes études ont mis en évidence le rôle de protection de la barrière endothéliale par FOXF1 et S1PR1 car une délétion d'une des deux protéines conduisait à une augmentation de la perméabilité, l'apparition de fibrose et une angiogenèse aberrante dans le poumon physiologique (Gaengel et al. 2012) (Cai et al. 2016b). Ces données suggèrent que Y685 de la VE-cadhérine contribue au maintien de l'intégrité de la barrière par la régulation de FOXF1 et S1PR1. Nos résultats mettent en évidence que l'unique site Y685 de la VE-cadhérine peut réguler l'expression génique de la cellule endothéliale et induire la stabilisation des vaisseaux.

Au cours de cette thèse, il a pu être mis en évidence l'étude de la modification de la VE-cadhérine dans des contextes pathologiques. Dans le cas du cancer triple négatif du sein, nous avons mis au point un système 3D de co-culture avec les cellules tumorales et les cellules endothéliales afin d'étudier l'effet du microenvironnement sur l'angiogenèse et la VE-cadhérine. Les données obtenues démontrent que le microenvironnement tumoral engendre la phosphorylation sur Y685 de la VE-cadhérine et conduit au clivage de la VE-cadhérine et à un remodelage du réseau vasculaire. L'efficacité de l'action de l'inhibiteur de la tyrosine kinase a pu être testé dans ce modèle 3D par une diminution dose dépendante de la phosphorylation de la VE-cadhérine. Cette étude démontre la pertinence du modèle 3D pour étudier l'effet du microenvironnement sur la VE-cadhérine en condition pathologique, comme ici le TNBC, et ainsi étudier l'efficacité des médicaments. Dans un autre contexte pathologique, nous sommes intéressés au COVID où nous avons démontré pour la première fois que la partie circulante d'ACE2 était capable de cliver la VE-cadhérine. La vague de cytokines inflammatoires issue de l'infection par le virus conduit à la phosphorylation de la VE-cadhérine sur Y685 et induit le changement de conformation de cette dernière, rendant ces sites de clivage accessibles par ACE2. De manière intéressante, différentes formes solubles

de VE-cadhérine furent retrouvées dans le sang des patients dont 62 , 54 kDa et 74kDa étaient corrélées aux patients atteints de COVID sévère tandis que la présence de la seule forme 54 kDa était retrouvée dans les COVID dit bénins. Ce travail suggère qu'ACE2 est impliqué dans le clivage de la VE-cadhérine qui serait un biomarqueur du COVID associé à la gravité de la pathologie.

Au-delà de ce travail, de nombreuses questions restent à être abordées :

- Nous avons défini le rôle de Y685 de la VE-cadhérine en condition physiologique ainsi que la présence de sa forme phosphorylée et clivée dans le cancer triple négatif et le COVID long où une angiogenèse aberrante est retrouvée. Il serait donc important de confronter cette mutation à un contexte pathologique et d'étudier ses effets sur le réseau vasculaire, la stabilité des jonctions et la diminution des dommages pulmonaires retrouvés dans le COVID sévère et le cancer. Étant donné que les cellules endothéliales sont fortement hétérogènes selon le lit vasculaire où elles se trouvent, nous risquons de pas obtenir les mêmes réponses à cette mutation que celles trouvées dans le poumon en condition physiologique mais aussi entre différents organes en condition pathologique.
- Dans cette même optique, il serait intéressant de regarder l'effet de la mutation dans d'autres organes en conditions physiologiques comportant d'autres types d'endothélium fenêtré ou sinusoidal. Cela nous permettra de définir des signatures particulières organo-dépendantes du site Y685 de la VE-cadhérine et ainsi identifier des cibles bien spécifiques.
- S1PR1 a été rapporté comme un régulateur de la barrière endothéliale capable de restaurer l'intégrité et de diminuer la formation d'œdèmes après une blessure dans les poumons adultes (Cai et al. 2016b). Il serait ainsi tout aussi intéressant de savoir si l'inhibition de la phosphorylation sur Y685 de la VE-cadhérine dans les poumons adultes après une blessure nous permettrait de retrouver les mêmes effets que cette étude.
- Toutefois, le rôle de S1PR1 est ambivalent selon le contexte. Dans le cas de cancers comme le glioblastome, S1PR1 joue un rôle pro-tumoral. Il a notamment été retrouvé surexprimé dans les tissus tumoraux et son activation conduit à la prolifération et à la croissance tumorale (Bien-Möller et al. 2023). S1PR1 favorise, dans le cas de tumeur, la néo-vascularisation en amplifiant l'activité de VEGFR2 et donc la croissance tumorale (Balaji Raguathrao et al. 2019). Une hyperactivation de S1PR1 est associée à la dissémination tumorale et ainsi à un pauvre pronostic chez les patients atteints de cancer triple négatif (Laroche et al. 2023). Ainsi, de manière surprenante, le rôle de S1PR1 est totalement opposé à celui décrit dans les conditions physiologiques ou suite à une blessure dans le tissu adulte. Aussi, il serait pertinent de vérifier avec notre modèle 3D de triple cancer négatif si la présence de la mutation sur Y685 de la VE-cadhérine pourrait reprogrammer le rôle de S1PR1 ou ne pas suractiver S1PR1 mais d'autres gènes.
- Afin d'obtenir les véritables effets de la mutation de la VE-cadhérine sur l'angiogenèse tumorale, il serait pertinent de complexifier le modèle 3D en y incorporant d'autres types cellulaires comme les cellules immunitaires, les fibroblastes, les péricytes et les cellules épithéliales. Toutes ces cellules contribuent au développement de la tumeur par leur dérégulation et dialoguent entre elles. Ainsi, pour avoir un aperçu plus physiologique, il serait intéressant d'y incorporer les différentes catégories de cellules et de voir comment ce microenvironnement réagit face à la mutation.

- Dans notre cas d'étude, nous nous sommes concentrés sur les effets de la mutation au niveau de la vasculature et de la perméabilité. Or nos résultats ont démontré que cette mutation induisait une augmentation de la phosphorylation de Y731 de la VE-cadhérine qui est connu pour être impliqué dans la diapédèse des leucocytes. Une déphosphorylation de ce site induit leur extravasation. Par conséquent, nous pourrions étudier l'effet de notre mutation en condition inflammatoire pathologique où la transmigration des leucocytes est fortement exacerbée. Nous pourrions espérer que la mutation diminuerait la déphosphorylation sur Y731 et régulerait la réponse immunitaire.
- Le dialogue entre les cellules endothéliales et les péricytes au niveau des capillaires est crucial pour le développement du poumon, la stabilisation des vaisseaux et le remodelage vasculaire (Ricard et al. 2014). Etant donné que nous avons observé un maintien de la barrière, il serait important de déterminer si Y685 de la VE-cadhérine peut réguler l'expression de protéines et ainsi moduler l'activité des péricytes.
- In fine, notre étude a démontré que ce site Y685 de la VE-cadhérine pouvait réguler un grand nombre de gènes. Nous avons décidé de nous concentrer sur un gène S1PR1 mais parmi tous les gènes d'autres pouvaient être tous aussi pertinents et participer également à la stabilité des vaisseaux. Etudier les gènes cibles de FOXF1 et de la β -caténine comme nous l'avons vu délocalisée dans le noyau, pourrait nous apporter une connaissance plus approfondie sur tous les gènes qui vont contribuer ensemble à la régulation de la barrière.

Toutes ces données originales ouvrent des portes à de nouveaux champs d'investigations et d'applications pour le site Y685 de la VE-cadhérine. Comprendre toute la mécanistique derrière Y685 de la VE-cadhérine nous fournirait une connaissance plus approfondie dans la physiologie tout comme dans la pathologie vasculaire.

Références bibliographiques

- Ahmadi, Mahdi, et Jafar Rezaie. 2020. « Tumor Cells Derived-exosomes as Angiogenic Agents: possible therapeutic implications ». *Journal of Translational Medicine*.
- Ahn, Joong Bae et al. 2010. « Circulating Endothelial Progenitor Cells (EPC) for Tumor Vasculogenesis in Gastric Cancer Patients ». *Cancer Letters* 288(1): 124-32.
- Aird, William C. 2007. « Phenotypic Heterogeneity of the Endothelium ». *Circulation Research* 100(2): 158-73.
- Alitalo, Kari, Tuomas Tammela, et Tatiana V. Petrova. 2005. « Lymphangiogenesis in Development and Human Disease ». *Nature* 438(7070): 946-53.
- Allingham, Michael J., Jaap D. van Buul, et Keith Burridge. 2007. « ICAM-1-Mediated, Src- and Pyk2-Dependent Vascular Endothelial Cadherin Tyrosine Phosphorylation Is Required for Leukocyte Transendothelial Migration ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 179(6): 4053-64.
- Alonso, Florian, François-Xavier Boittin, Jean-Louis Bény, et Jacques-Antoine Haefliger. 2010. « Loss of Connexin40 Is Associated with Decreased Endothelium-Dependent Relaxations and ENOS Levels in the Mouse Aorta ». *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 299(5): H1365-1373.
- Angst, Brigitt D., Cristiana Marcozzi, et Anthony I. Magee. 2001. « The cadherin superfamily: diversity in form and function ». *Journal of Cell Science* 114(4): 629-41.
- Apte, Rajendra S., Daniel S. Chen, et Napoleone Ferrara. 2019. « VEGF in Signaling and Disease: Beyond Discovery and Development ». *Cell* 176(6): 1248-64.
- Arif, Nida et al. 2021a. « PECAM-1 supports leukocyte diapedesis by tension-dependent dephosphorylation of VE-cadherin ». *The EMBO Journal* 40(9): e106113.
- . 2021b. « PECAM-1 Supports Leukocyte Diapedesis by Tension-Dependent Dephosphorylation of VE-Cadherin ». *The EMBO journal* 40(9): e106113.
- Balaji Ragunathrao, Vijay Avin et al. 2019. « Sphingosine-1-Phosphate Receptor 1 Activity Promotes Tumor Growth by Amplifying VEGF-VEGFR2 Angiogenic Signaling ». *Cell Reports* 29(11): 3472-3487.e4.
- Barber, Alistair J., et David A. Antonetti. 2003. « Mapping the Blood Vessels with Paracellular Permeability in the Retinas of Diabetic Rats ». *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 44(12): 5410-16.
- Bates, David O. et al. 2002. « VEGF165b, an Inhibitory Splice Variant of Vascular Endothelial Growth Factor, Is down-Regulated in Renal Cell Carcinoma ». *Cancer Research* 62(14): 4123-31.

- Baumeister, Ulf et al. 2005. « Association of Csk to VE-cadherin and inhibition of cell proliferation ». *The EMBO Journal* 24(9): 1686-95.
- Bazzoni, Gianfranco, et Elisabetta Dejana. 2004. « Endothelial Cell-to-Cell Junctions: Molecular Organization and Role in Vascular Homeostasis ». *Physiological Reviews* 84(3): 869-901.
- Beckmann, Taylor et al. 2022. « Strategizing Drug Therapies in Pulmonary Hypertension for Improved Outcomes ». *Pharmaceuticals* 15(10): 1242.
- Bentley, Katie et al. 2014. « The Role of Differential VE-Cadherin Dynamics in Cell Rearrangement during Angiogenesis ». *Nature Cell Biology* 16(4): 309-21.
- Bergmann, Olaf et al. 2015. « Dynamics of Cell Generation and Turnover in the Human Heart ». *Cell* 161(7): 1566-75.
- Bern, Lungenliga Schweiz, 3007. « Poumons et voies respiratoires - Ligue pulmonaire Suisse ». <https://www.liguepulmonaire.ch/fr/preserver-les-poumons/connaissances/poumons-et-voies-respiratoires.html> (8 août 2023).
- Bessaguet, Flavien, Daniel Henrion, et Alexis Desmoulière. 2022. « Organisation générale des vaisseaux sanguins ». *Actualités Pharmaceutiques* 61(619): 53-56.
- Betsholtz, Christer. 2018. « Cell–cell signaling in blood vessel development and function ». *EMBO Molecular Medicine* 10(3): e8610.
- Bian, Fenghua et al. 2023. « Lung Endothelial Cells Regulate Pulmonary Fibrosis through FOXF1/R-Ras Signaling ». *Nature Communications* 14(1): 2560.
- Bien-Möller, Sandra et al. 2023. « The Putative S1PR1 Modulator ACT-209905 Impairs Growth and Migration of Glioblastoma Cells In Vitro ». *Cancers* 15(17): 4273.
- « Biomolécules | Free Full-Text | New Insights into the Alveolar Epithelium as a Driver of Acute Respiratory Distress Syndrome ». <https://www.mdpi.com/2218-273X/12/9/1273> (8 août 2023).
- Bonizol Camasao, Dimitria, et Diego Mantovani. 2021. « The mechanical characterization of blood vessels and their substitutes in the continuous quest for physiological-relevant performances. A critical review ». *Materials Today Bio* 10: 100106.
- Borek, Izabela et al. 2023. « The Vascular Perspective on Acute and Chronic Lung Disease ». *The Journal of Clinical Investigation* 133(16). <https://www.jci.org/articles/view/170502> (5 septembre 2023).
- Brasch, Julia et al. 2011. « Structure and binding mechanism of vascular endothelial cadherin, a divergent classical cadherin ». *Journal of molecular biology* 408(1): 57-73.
- Broermann, Andre et al. 2011. « Dissociation of VE-PTP from VE-Cadherin Is Required for Leukocyte Extravasation and for VEGF-Induced Vascular Permeability in Vivo ». *The Journal of Experimental Medicine* 208(12): 2393-2401.
- Bryant, Annie et al. 2023. « Endothelial Cells Are Heterogeneous in Different Brain Regions and Are Dramatically Altered in Alzheimer’s Disease ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 43(24): 4541-57.

- Buschmann, Ivo et al. 2010. « Pulsatile Shear and Gja5 Modulate Arterial Identity and Remodeling Events during Flow-Driven Arteriogenesis ». *Development (Cambridge, England)* 137(13): 2187-96.
- Cai, Yuqi et al. 2016a. « FOXF1 Maintains Endothelial Barrier Function and Prevents Edema after Lung Injury ». *Science Signaling* 9(424): ra40.
- . 2016b. « FOXF1 maintains endothelial barrier function and prevents edema after lung injury ». *Science Signaling* 9(424): ra40-ra40.
- Cao, Jian et al. 2011. « Lentiviral-Human Heme Oxygenase Targeting Endothelium Improved Vascular Function in Angiotensin II Animal Model of Hypertension ». *Human Gene Therapy* 22(3): 271-82.
- Cao, Zhongwei et al. 2016. « Targeting of the Pulmonary Capillary Vascular Niche Promotes Lung Alveolar Repair and Ameliorates Fibrosis ». *Nature Medicine* 22(2): 154-62.
- Cerutti, Camilla, et Anne Ridley. 2017. « Endothelial cell-cell adhesion and signaling ». *Experimental Cell Research* 358.
- Chadjichristos, C. E. et al. 2010. « Endothelial-Specific Deletion of Connexin40 Promotes Atherosclerosis by Increasing CD73-Dependent Leukocyte Adhesion ». *Circulation* 121(1): 123-31.
- Chen, Chiu-Yu et al. 2012. « Blood Flow Reprograms Lymphatic Vessels to Blood Vessels ». *The Journal of Clinical Investigation* 122(6): 2006-17.
- Chen, Hongliu et al. 2022. « Selexipag Improves Lipopolysaccharide-Induced ARDS on C57BL/6 Mice by Modulating the CAMP/PKA and CAMP/Epac1 Signaling Pathways ». *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 45(8): 1043-52.
- Chervin-Pétinot, Adeline et al. 2012. « Epithelial Protein Lost In Neoplasm (EPLIN) Interacts with α -Catenin and Actin Filaments in Endothelial Cells and Stabilizes Vascular Capillary Network in Vitro ». *The Journal of Biological Chemistry* 287(10): 7556-72.
- Chung, Jihwa et al. 2019. « Coxsackievirus and Adenovirus Receptor Mediates the Responses of Endothelial Cells to Fluid Shear Stress ». *Experimental & Molecular Medicine* 51(11): 1-15.
- « Classification & Structure of Blood Vessels | SEER Training ». <https://training.seer.cancer.gov/anatomy/cardiovascular/blood/classification.html> (16 août 2023).
- Cohen, C. J. et al. 2001. « The Coxsackievirus and Adenovirus Receptor Is a Transmembrane Component of the Tight Junction ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98(26): 15191-96.
- Coon, Brian G. et al. 2015. « Intramembrane binding of VE-cadherin to VEGFR2 and VEGFR3 assembles the endothelial mechanosensory complex ». *The Journal of Cell Biology* 208(7): 975-86.
- Corada, Monica et al. 1999. « Vascular endothelial-cadherin is an important determinant of microvascular integrity in vivo ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96(17): 9815-20.

- . 2013. « Sox17 is indispensable for acquisition and maintenance of arterial identity ». *Nature Communications* 4: 2609.
- Cusack, Rachael, Lieuwe D. Bos, Pedro Pova, et Ignacio Martin-Loeches. 2023. « Endothelial dysfunction triggers acute respiratory distress syndrome in patients with sepsis: a narrative review ». *Frontiers in Medicine* 10.
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmed.2023.1203827> (12 novembre 2023).
- Dent, Rebecca et al. 2007. « Triple-Negative Breast Cancer: Clinical Features and Patterns of Recurrence ». *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 13(15 Pt 1): 4429-34.
- Derouette, Jean-Paul et al. 2009. « Molecular Role of Cx37 in Advanced Atherosclerosis: A Micro-Array Study ». *Atherosclerosis* 206(1): 69-76.
- Derycke, L. et al. 2006. « Soluble N-Cadherin Fragment Promotes Angiogenesis ». *Clinical & Experimental Metastasis* 23(3-4): 187-201.
- Dudley, Andrew C., et Arjan W. Griffioen. 2023. « Pathological angiogenesis: mechanisms and therapeutic strategies ». *Angiogenesis* 26(3): 313-47.
- Duong, Cao Nguyen et al. 2020. « Interference With ESAM (Endothelial Cell-Selective Adhesion Molecule) Plus Vascular Endothelial-Cadherin Causes Immediate Lethality and Lung-Specific Blood Coagulation ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 40(2): 378-93.
- Duong, Cao Nguyen, et Dietmar Vestweber. 2020. « Mechanisms Ensuring Endothelial Junction Integrity Beyond VE-Cadherin ». *Frontiers in Physiology* 11.
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphys.2020.00519> (21 août 2023).
- Eriksson, Einar E. et al. 2005. « Powerful Inflammatory Properties of Large Vein Endothelium In Vivo ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 25(4): 723-28.
- Eswarappa, Sandeepa M. et al. 2014. « Programmed Translational Readthrough Generates Antiangiogenic VEGF-Ax ». *Cell* 157(7): 1605-18.
- Failla, Cristina M., Miriam Carbo, et Veronica Morea. 2018. « Positive and Negative Regulation of Angiogenesis by Soluble Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1 ». *International Journal of Molecular Sciences* 19(5): 1306.
- Fantin, Alessandro et al. 2013. « NRP1 Acts Cell Autonomously in Endothelium to Promote Tip Cell Function during Sprouting Angiogenesis ». *Blood* 121(12): 2352-62.
- Féléto, Michel, et Paul M. Vanhoutte. 2006. « Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor: Where Are We Now? ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 26(6): 1215-25.
- Ferrara, Napoleone, et Anthony P. Adamis. 2016. « Ten Years of Anti-Vascular Endothelial Growth Factor Therapy ». *Nature Reviews Drug Discovery* 15(6): 385-403.
- Freeman, Brandi D., Fabiana S. Machado, Herbert B. Tanowitz, et Mahalia S. Desruisseaux. 2014. « Endothelin-1 and its role in the pathogenesis of infectious diseases ». *Life sciences* 118(2): 110-19.

- Fukuhara, Atsunori et al. 2002. « Involvement of Nectin in the Localization of Junctional Adhesion Molecule at Tight Junctions ». *Oncogene* 21(50): 7642-55.
- Furuse, M. et al. 1993. « Occludin: A Novel Integral Membrane Protein Localizing at Tight Junctions ». *The Journal of Cell Biology* 123(6 Pt 2): 1777-88.
- Gaengel, Konstantin et al. 2012. « The Sphingosine-1-Phosphate Receptor S1PR1 Restricts Sprouting Angiogenesis by Regulating the Interplay between VE-Cadherin and VEGFR2 ». *Developmental Cell* 23(3): 587-99.
- Galley, H. F., et N. R. Webster. 2004a. « Physiology of the endothelium ». *British Journal of Anaesthesia* 93(1): 105-13.
- . 2004b. « Physiology of the endothelium ». *British Journal of Anaesthesia* 93(1): 105-13.
- Gamble, Jennifer R. et al. 2000. « Angiopoietin-1 Is an Antipermeability and Anti-Inflammatory Agent In Vitro and Targets Cell Junctions ». *Circulation Research* 87(7): 603-7.
- Garnier, Olivia, et Isabelle Vilgrain. 2023. « Dialogue between VE-Cadherin and Sphingosine 1 Phosphate Receptor1 (S1PR1) for Protecting Endothelial Functions ». *International Journal of Molecular Sciences* 24(4): 4018.
- Gavard, Julie. 2014. « Endothelial permeability and VE-cadherin ». *Cell Adhesion & Migration* 8(2): 158-64.
- Gavard, Julie, et J. Silvio Gutkind. 2006. « VEGF Controls Endothelial-Cell Permeability by Promoting the β -Arrestin-Dependent Endocytosis of VE-Cadherin ». *Nature Cell Biology* 8(11): 1223-34.
- Gebb, Sarah, et Troy Stevens. 2004. « On lung endothelial cell heterogeneity ». *Microvascular Research* 68(1): 1-12.
- Gerhardt, Holger et al. 2003. « VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia ». *The Journal of Cell Biology* 161(6): 1163-77.
- Giampietro, Costanza et al. 2015. « The actin-binding protein EPS8 binds VE-cadherin and modulates YAP localization and signaling ». *Journal of Cell Biology* 211(6): 1177-92.
- Gillich, Astrid et al. 2020. « Capillary Cell-Type Specialization in the Alveolus ». *Nature* 586(7831): 785-89.
- Gimbrone, M. A. 1987. « Vascular Endothelium: Nature's Blood-Compatible Container ». *Annals of the New York Academy of Sciences* 516: 5-11.
- Girard, Jean-Philippe, et Timothy A. Springer. 1995. « High endothelial venules (HEVs): specialized endothelium for lymphocyte migration ». *Immunology Today* 16(9): 449-57.
- Giri, Hemant et al. 2021. « Thrombomodulin Is Essential for Maintaining Quiescence in Vascular Endothelial Cells ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 118(11): e2022248118.
- Godwin, Luke, Muhammad Ali Tariq, et Jonathan S. Crane. 2023. « Histology, Capillary ». In *StatPearls*, Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK546578/> (16 août 2023).

- Gong, Haixia et al. 2014. « Evidence of a common mechanism of disassembly of adherens junctions through Gα13 targeting of VE-cadherin ». *The Journal of Experimental Medicine* 211(3): 579-91.
- Gordon, Emma J. et al. 2016. « The Endothelial Adaptor Molecule TSA_d Is Required for VEGF-Induced Angiogenic Sprouting through Junctional c-Src Activation ». *Science Signaling* 9(437): ra72.
- Gory-Fauré, S. et al. 1999. « Role of Vascular Endothelial-Cadherin in Vascular Morphogenesis ». *Development (Cambridge, England)* 126(10): 2093-2102.
- Guo, Xiaohua et al. 2020. « Focal adhesion kinase and Src mediate microvascular hyperpermeability caused by fibrinogen-γC-terminal fragments ». *PLoS ONE* 15(4): e0231739.
- Harper, Steven J., et David O. Bates. 2008. « VEGF-A splicing ». *Nature reviews. Cancer* 8(11): 880-87.
- Hayashi, Makoto et al. 2013. « VE-PTP regulates VEGFR2 activity in stalk cells to establish endothelial cell polarity and lumen formation ». *Nature Communications* 4: 1672.
- He, Liqun et al. 2018. « Single-Cell RNA Sequencing of Mouse Brain and Lung Vascular and Vessel-Associated Cell Types ». *Scientific Data* 5(1): 180160.
- He, ZhengYu, YeSen Zhu, et Hong Jiang. 2009. « Toll-like Receptor 4 Mediates Lipopolysaccharide-Induced Collagen Secretion by Phosphoinositide3-Kinase-Akt Pathway in Fibroblasts during Acute Lung Injury ». *Journal of Receptor and Signal Transduction Research* 29(2): 119-25.
- Heathcote, Helen R. et al. 2019. « Endothelial TRPV4 Channels Modulate Vascular Tone by Ca²⁺-Induced Ca²⁺ Release at Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptors ». *British Journal of Pharmacology* 176(17): 3297-3317.
- Hellström, Mats et al. 2007. « Dll4 Signalling through Notch1 Regulates Formation of Tip Cells during Angiogenesis ». *Nature* 445(7129): 776-80.
- Hendrix, Mary J. C. et al. 2001. « Expression and functional significance of VE-cadherin in aggressive human melanoma cells: Role in vasculogenic mimicry ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98(14): 8018-23.
- Herold, Susanne, Konstantin Mayer, et Juergen Lohmeyer. 2011. « Acute Lung Injury: How Macrophages Orchestrate Resolution of Inflammation and Tissue Repair ». *Frontiers in Immunology* 2. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2011.00065> (15 août 2023).
- Herron, Crystal R. et al. 2011. « p120 regulates endothelial permeability independently of its NH₂ terminus and Rho binding ». *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 300(1): H36-48.
- Hirase, T. et al. 1997. « Occludin as a Possible Determinant of Tight Junction Permeability in Endothelial Cells ». *Journal of Cell Science* 110 (Pt 14): 1603-13.
- Hla, Timothy, Krishnan Venkataraman, et Jason Michaud. 2008. « The vascular S1P gradient—Cellular sources and biological significance ». *Biochimica et biophysica acta* 1781(9): 477-82.
- Houck, K.A. et al. 1992. « Dual Regulation of Vascular Endothelial Growth Factor Bioavailability by Genetic and Proteolytic Mechanisms. ». *Journal of Biological Chemistry* 267(36): 26031-37.

- Hu, Guochang, Aaron T. Place, et Richard D. Minshall. 2008. « Regulation of Endothelial Permeability by Src Kinase Signaling ». *Chemico-biological interactions* 171(2): 177-89.
- Huertas, Alice et al. 2018. « Pulmonary Vascular Endothelium: The Orchestra Conductor in Respiratory Diseases: Highlights from Basic Research to Therapy ». *European Respiratory Journal* 51(4). <https://erj.ersjournals.com/content/51/4/1700745> (24 juillet 2023).
- Hussain, Bilal et al. 2022. « High endothelial venules as potential gateways for therapeutics ». *Trends in Immunology* 43(9): 728-40.
- Hussell, Tracy, et Thomas J. Bell. 2014. « Alveolar Macrophages: Plasticity in a Tissue-Specific Context ». *Nature Reviews Immunology* 14(2): 81-93.
- Jakobsson, Lars et al. 2010. « Endothelial Cells Dynamically Compete for the Tip Cell Position during Angiogenic Sprouting ». *Nature Cell Biology* 12(10): 943-53.
- Jambusaria, Ankit et al. 2020. « Endothelial heterogeneity across distinct vascular beds during homeostasis and inflammation » éd. Anna Akhmanova. *eLife* 9: e51413.
- Jin, Yi et al. 2022. « Tyrosine-Protein Kinase Yes Controls Endothelial Junctional Plasticity and Barrier Integrity by Regulating VE-Cadherin Phosphorylation and Endocytosis ». *Nature Cardiovascular Research* 1(12): 1156-73.
- Johnson-Léger, Caroline A. et al. 2002. « Junctional adhesion molecule-2 (JAM-2) promotes lymphocyte transendothelial migration ». *Blood* 100(7): 2479-86.
- Jouda, Hatem, Luis Murillo, et Tao Wang. 2022. « Current Progress in Vascular Engineering and Its Clinical Applications ». *Cells* 11: 493.
- Juettner, Vanessa V. et al. 2019. « VE-PTP stabilizes VE-cadherin junctions and the endothelial barrier via a phosphatase-independent mechanism ». *Journal of Cell Biology* 218(5): 1725-42.
- Kalucka, Joanna et al. 2020. « Single-Cell Transcriptome Atlas of Murine Endothelial Cells ». *Cell* 180(4): 764-779.e20.
- Katoh, Masaru. 2018. « Multi-layered prevention and treatment of chronic inflammation, organ fibrosis and cancer associated with canonical WNT/ β -catenin signaling activation (Review) ». *International Journal of Molecular Medicine* 42(2): 713-25.
- Kibria, G, D Heath, P Smith, et R Biggar. 1980. « Pulmonary endothelial pavement patterns. » *Thorax* 35(3): 186-91.
- Kioi, Mitomu et al. 2010. « Inhibition of Vasculogenesis, but Not Angiogenesis, Prevents the Recurrence of Glioblastoma after Irradiation in Mice ». *The Journal of Clinical Investigation* 120(3): 694.
- Klomp, Jennifer E. et al. 2019. « Time variant SRC kinase activation determines endothelial permeability response ». *Cell chemical biology* 26(8): 1081-1094.e6.
- Kobielak, Agnieszka, et Elaine Fuchs. 2004. « α -CATENIN: AT THE JUNCTION OF INTERCELLULAR ADHESION AND ACTIN DYNAMICS ». *Nature reviews. Molecular cell biology* 5(8): 614-25.

- Krüger-Genge, Anne, Anna Blocki, Ralf-Peter Franke, et Friedrich Jung. 2019. « Vascular Endothelial Cell Biology: An Update ». *International Journal of Molecular Sciences* 20(18): 4411.
- Ku, Yun Hyi et al. 2017. « Rosiglitazone increases endothelial cell migration and vascular permeability through Akt phosphorylation ». *BMC Pharmacology and Toxicology* 18(1): 62.
- Kuwabara, H. et al. 2001. « Occludin Regulates Actin Cytoskeleton in Endothelial Cells ». *Cell Structure and Function* 26(2): 109-16.
- Lambeng, Nathalie et al. 2005. « Vascular Endothelial–Cadherin Tyrosine Phosphorylation in Angiogenic and Quiescent Adult Tissues ». *Circulation Research* 96(3): 384-91.
- Lampugnani, Maria Grazia et al. 2003. « Contact inhibition of VEGF-induced proliferation requires vascular endothelial cadherin, β -catenin, and the phosphatase DEP-1/CD148 ». *The Journal of Cell Biology* 161(4): 793-804.
- Lampugnani, Maria Grazia, Elisabetta Dejana, et Costanza Giampietro. 2018. « Vascular Endothelial (VE)-Cadherin, Endothelial Adherens Junctions, and Vascular Disease ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 10(10): a029322.
- Laroche, Fabrice J. F. et al. 2023. « S1P1 Threonine 236 Phosphorylation Mediates the Invasiveness of Triple-Negative Breast Cancer and Sensitivity to FTY720 ». *Cells* 12(7): 980.
- Lau, Skadi, Manfred Gossen, Andreas Lendlein, et Friedrich Jung. 2021. « Venous and Arterial Endothelial Cells from Human Umbilical Cords: Potential Cell Sources for Cardiovascular Research ». *International Journal of Molecular Sciences* 22(2): 978.
- Leach, Heather G., Izabela Chrobak, Rong Han, et Maria Trojanowska. 2013. « Endothelial Cells Recruit Macrophages and Contribute to a Fibrotic Milieu in Bleomycin Lung Injury ». *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 49(6): 1093-1101.
- Lebok, Patrick et al. 2016. « Loss of Membranous VEGFR1 Expression Is Associated with an Adverse Phenotype and Shortened Survival in Breast Cancer ». *Molecular Medicine Reports* 14(2): 1443-50.
- Lee, Chunsik et al. 2023. « VEGF-B prevents excessive angiogenesis by inhibiting FGF2/FGFR1 pathway ». *Signal Transduction and Targeted Therapy* 8: 305.
- « Les poumons - Cancer du poumon ». <https://www.e-cancer.fr/Patients-et-proches/Les-cancers/Cancer-du-poumon/Les-poumons> (7 août 2023).
- Li, Min, Kurt R. Stenmark, Robin Shandas, et Wei Tan. 2009. « Effects of Pathological Flow on Pulmonary Artery Endothelial Production of Vasoactive Mediators and Growth Factors ». *Journal of Vascular Research* 46(6): 561-71.
- Li, Yanyang et al. 2023. « Activation of Angiotensin-Tie2 Signaling Protects the Kidney from Ischemic Injury by Modulation of Endothelial-Specific Pathways ». *Journal of the American Society of Nephrology* 34(6): 969.
- Li, Yi-Xuan et al. 2022. « Targeting pulmonary vascular endothelial cells for the treatment of respiratory diseases ». *Frontiers in Pharmacology* 13: 983816.

- Liu, Fei et al. 2010. « Feedback Amplification of Fibrosis through Matrix Stiffening and COX-2 Suppression ». *The Journal of Cell Biology* 190(4): 693-706.
- Liu, Liangliang et al. 2021. « Role of Transient Receptor Potential Vanilloid 4 in Vascular Function ». *Frontiers in Molecular Biosciences* 8: 677661.
- Liu, Longbin et al. 2018. « Angiotensin II inhibits the protein expression of ZO-1 in vascular endothelial cells by downregulating VE-cadherin ». *Molecular Medicine Reports* 18(1): 429-34.
- Lobov, I. B. et al. 2007. « Delta-like Ligand 4 (Dll4) Is Induced by VEGF as a Negative Regulator of Angiogenic Sprouting ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104(9): 3219-24.
- Ludwig, Ralf J et al. 2009. « Junctional adhesion molecule (JAM)-B supports lymphocyte rolling and adhesion through interaction with $\alpha 4\beta 1$ integrin ». *Immunology* 128(2): 196-205.
- Lugano, Roberta, Mohanraj Ramachandran, et Anna Dimberg. 2020. « Tumor Angiogenesis: Causes, Consequences, Challenges and Opportunities ». *Cellular and Molecular Life Sciences* 77(9): 1745-70.
- Luissint, Anny-Claude, Asma Nusrat, et Charles A. Parkos. 2014. « JAM-Related Proteins in Mucosal Homeostasis and Inflammation ». *Seminars in Immunopathology* 36(2): 211-26.
- Malekian, Saba et al. 2020. « Expression of Diverse Angiogenesis Factor in Different Stages of the 4T1 Tumor as a Mouse Model of Triple-Negative Breast Cancer ». *Advanced Pharmaceutical Bulletin* 10(2): 323-28.
- Maniatis, Nikolaos A., Anastasia Kotanidou, John D. Catravas, et Stylianos E. Orfanos. 2008. « Endothelial pathomechanisms in acute lung injury ». *Vascular Pharmacology* 49(4): 119-33.
- Martin, Marcy et al. « Role of endothelial cells in pulmonary fibrosis via SREBP2 activation ». *JCI Insight* 6(22): e125635.
- Martin-Padura, I. et al. 1998. « Junctional Adhesion Molecule, a Novel Member of the Immunoglobulin Superfamily That Distributes at Intercellular Junctions and Modulates Monocyte Transmigration ». *The Journal of Cell Biology* 142(1): 117-27.
- Maynard, Sharon E. et al. 2003. « Excess Placental Soluble Fms-like Tyrosine Kinase 1 (sFlt1) May Contribute to Endothelial Dysfunction, Hypertension, and Proteinuria in Preeclampsia ». *The Journal of Clinical Investigation* 111(5): 649-58.
- Medina-Leyte, Diana Jhoseline et al. 2021. « Endothelial Dysfunction, Inflammation and Coronary Artery Disease: Potential Biomarkers and Promising Therapeutical Approaches ». *International Journal of Molecular Sciences* 22(8): 3850.
- Meyer, Marlene et al. 1999. « A novel vascular endothelial growth factor encoded by Orf virus, VEGF-E, mediates angiogenesis via signalling through VEGFR-2 (KDR) but not VEGFR-1 (Flt-1) receptor tyrosine kinases ». *The EMBO Journal* 18(2): 363-74.
- Milutinovic, Stefan, et Awen Gallimore. 2023. « The link between T cell activation and development of functionally useful tumour-associated high endothelial venules ». *Discovery Immunology* 2(1): kyad006.

- Mochizuki, Seiichi et al. 2003. « Role of hyaluronic acid glycosaminoglycans in shear-induced endothelium-derived nitric oxide release ». *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 285(2): H722-26.
- Morini, Marco F. et al. 2018. « VE-Cadherin–Mediated Epigenetic Regulation of Endothelial Gene Expression ». *Circulation Research* 122(2): 231-45.
- Nan, Weijin, Yuxi He, Shurong Wang, et Yan Zhang. 2023. « Molecular Mechanism of VE-Cadherin in Regulating Endothelial Cell Behaviour during Angiogenesis ». *Frontiers in Physiology* 14. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10433914/> (23 août 2023).
- Navarro, Pilar, Luigi Ruco, et Elisabetta Dejana. 1998. « Differential Localization of VE- and N-Cadherins in Human Endothelial Cells: VE-Cadherin Competes with N-Cadherin for Junctional Localization ». *The Journal of Cell Biology* 140(6): 1475-84.
- Neto, Filipa et al. « YAP and TAZ regulate adherens junction dynamics and endothelial cell distribution during vascular development ». *eLife* 7: e31037.
- Neubauer, Katharina, et Barbara Zieger. 2022. « Endothelial Cells and Coagulation ». *Cell and Tissue Research* 387(3): 391-98.
- Ng, Hooi, Lee Alvin, Che-Nan Kuo, et Yu-Fang Shen. 2018. « Bioprinting of artificial blood vessels ». *International Journal of Bioprinting* 4.
- Ni, Wentao et al. 2020. « Role of angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) in COVID-19 ». *Critical Care* 24(1): 422.
- Nieset, Jill E. et al. 1997. « Characterization of the interactions of α -catenin with α -actinin and β -catenin/plakoglobin ». *Journal of Cell Science* 110(8): 1013-22.
- Niethamer, Terren K et al. 2020. « Defining the role of pulmonary endothelial cell heterogeneity in the response to acute lung injury » éd. Gordana Vunjak-Novakovic et Didier YR Stainier. *eLife* 9: e53072.
- Nishio, Kazumi et al. 1998. « Differential Contribution of Various Adhesion Molecules to Leukocyte Kinetics in Pulmonary Microvessels of Hyperoxia-exposed Rat Lungs ». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 157(2): 599-609.
- Noda, Kazuomi et al. 2010. « Vascular Endothelial-Cadherin Stabilizes at Cell–Cell Junctions by Anchoring to Circumferential Actin Bundles through α - and β -Catenins in Cyclic AMP-Epac-Rap1 Signal-activated Endothelial Cells ». *Molecular Biology of the Cell* 21(4): 584-96.
- Nolan, Daniel J. et al. 2013. « Molecular Signatures of Tissue-Specific Microvascular Endothelial Cell Heterogeneity in Organ Maintenance and Regeneration ». *Developmental Cell* 26(2): 204-19.
- Nottebaum, Astrid F. et al. 2008. « VE-PTP Maintains the Endothelial Barrier via Plakoglobin and Becomes Dissociated from VE-Cadherin by Leukocytes and by VEGF ». *The Journal of Experimental Medicine* 205(12): 2929-45.
- Nova, Zuzana, Henrieta Skovierova, et Andrea Calkovska. 2019a. « Alveolar-Capillary Membrane-Related Pulmonary Cells as a Target in Endotoxin-Induced Acute Lung Injury ». *International Journal of Molecular Sciences* 20(4): 831.

- . 2019b. « Alveolar-Capillary Membrane-Related Pulmonary Cells as a Target in Endotoxin-Induced Acute Lung Injury ». *International Journal of Molecular Sciences* 20(4): 831.
- Nwariaku, Fiemu E. et al. 2002. « Tyrosine Phosphorylation of Vascular Endothelial Cadherin and the Regulation of Microvascular Permeability ». *Surgery* 132(2): 180-85.
- Okamoto, Takayuki, et Koji Suzuki. 2017. « The Role of Gap Junction-Mediated Endothelial Cell–Cell Interaction in the Crosstalk between Inflammation and Blood Coagulation ». *International Journal of Molecular Sciences* 18(11): 2254.
- Orsenigo, Fabrizio et al. 2012. « Phosphorylation of VE-cadherin is modulated by haemodynamic forces and contributes to the regulation of vascular permeability in vivo ». *Nature Communications* 3: 1208.
- Ortiz, Maria A. et al. 2021. « Src family kinases, adaptor proteins and the actin cytoskeleton in epithelial-to-mesenchymal transition ». *Cell Communication and Signaling* 19(1): 67.
- Park, J E et al. 1994. « Placenta growth factor. Potentiation of vascular endothelial growth factor bioactivity, in vitro and in vivo, and high affinity binding to Flt-1 but not to Flk-1/KDR. » *Journal of Biological Chemistry* 269(41): 25646-54.
- Patan, S., L. L. Munn, et R. K. Jain. 1996. « Intussusceptive Microvascular Growth in a Human Colon Adenocarcinoma Xenograft: A Novel Mechanism of Tumor Angiogenesis ». *Microvascular Research* 51(2): 260-72.
- Pearson, J. D., J. S. Carleton, et J. L. Gordon. 1980. « Metabolism of Adenine Nucleotides by Ectoenzymes of Vascular Endothelial and Smooth-Muscle Cells in Culture ». *The Biochemical Journal* 190(2): 421-29.
- Pérez-Gutiérrez, Lorena, et Napoleone Ferrara. 2023. « Biology and Therapeutic Targeting of Vascular Endothelial Growth Factor A ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology*: 1-19.
- Polena, Helena et al. 2018. « The tyrosine-kinase inhibitor sunitinib targets vascular endothelial (VE)-cadherin: a marker of response to antitumoural treatment in metastatic renal cell carcinoma ». *British Journal of Cancer* 118(9): 1179-88.
- Polverino, Francesca, Bartolome R. Celli, et Caroline A. Owen. 2018. « COPD as an endothelial disorder: endothelial injury linking lesions in the lungs and other organs? (2017 Grover Conference Series) ». *Pulmonary Circulation* 8(1): 2045894018758528.
- Potente, Michael, et Taija Mäkinen. 2017. « Vascular Heterogeneity and Specialization in Development and Disease ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 18(8): 477-94.
- Potter, Matthew D., Simone Barbero, et David A. Cheresh. 2005. « Tyrosine Phosphorylation of VE-Cadherin Prevents Binding of P120- and β -Catenin and Maintains the Cellular Mesenchymal State * ». *Journal of Biological Chemistry* 280(36): 31906-12.
- Rahimi, Nader. 2017. « Defenders and Challengers of Endothelial Barrier Function ». *Frontiers in Immunology* 8. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2017.01847> (7 septembre 2023).
- Redzic, Zoran. 2011. « Molecular biology of the blood-brain and the blood-cerebrospinal fluid barriers: similarities and differences ». *Fluids and Barriers of the CNS* 8(1): 3.

- Rehm, Kerstin, et Stefan Linder. 2017. « Drebrin's Role in the Maintenance of Endothelial Integrity ». In *Drebrin: From Structure and Function to Physiological and Pathological Roles*, Advances in Experimental Medicine and Biology, éd. Tomoaki Shirao et Yuko Sekino. Tokyo: Springer Japan, 347-60. https://doi.org/10.1007/978-4-431-56550-5_21 (22 août 2023).
- Reitsma, Sietze et al. 2007. « The endothelial glycocalyx: composition, functions, and visualization ». *Pflugers Archiv* 454(3): 345-59.
- « Review: Anatomy of the Lung | SEER Training ». <https://training.seer.cancer.gov/lung/anatomy/review.html> (7 août 2023).
- Reynolds, Albert B. 2007. « p120-catenin: past and present ». *Biochimica et biophysica acta* 1773(1): 2-7.
- Ribatti, Domenico et al. 2005. « Microvascular Density, Vascular Endothelial Growth Factor Immunoreactivity in Tumor Cells, Vessel Diameter and Intussusceptive Microvascular Growth in Primary Melanoma ». *Oncology Reports* 14(1): 81-84.
- Ricard, Nicolas et al. 2014. « Increased Pericyte Coverage Mediated by Endothelial-Derived Fibroblast Growth Factor-2 and Interleukin-6 Is a Source of Smooth Muscle-like Cells in Pulmonary Hypertension ». *Circulation* 129(15): 1586-97.
- Ricard, Nicolas, Sabine Bailly, Christophe Guignabert, et Michael Simons. 2021. « The quiescent endothelium: signalling pathways regulating organ-specific endothelial normalcy ». *Nature Reviews. Cardiology* 18(8): 565-80.
- Rochefort, Pauline et al. 2017. « Soluble VE-Cadherin in Metastatic Breast Cancer: An Independent Prognostic Factor for Both Progression-Free Survival and Overall Survival ». *British Journal of Cancer* 116(3): 356-61.
- Rodor, Julie et al. 2022. « Single-cell RNA sequencing profiling of mouse endothelial cells in response to pulmonary arterial hypertension ». *Cardiovascular Research* 118(11): 2519-34.
- Ruddle, Nancy H. 2023. « Regulation, maintenance, and remodeling of high endothelial venules in homeostasis, inflammation, and cancer ». *Current Opinion in Physiology* 36: 100705.
- S, Sajeesh et al. 2022. « Stem Cell Based Approaches to Modulate the Matrix Milieu in Vascular Disorders ». *Frontiers in Cardiovascular Medicine* 9. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcvm.2022.879977> (6 septembre 2023).
- Sabine, Amélie et al. 2015. « FOXC2 and Fluid Shear Stress Stabilize Postnatal Lymphatic Vasculature ». *The Journal of Clinical Investigation* 125(10): 3861-77.
- Sakurai, Yoshiko et al. 2005. « Essential role of Flk-1 (VEGF receptor 2) tyrosine residue 1173 in vasculogenesis in mice ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(4): 1076-81.
- Sandoo, Aamer et al. 2010. « The Endothelium and Its Role in Regulating Vascular Tone ». *The Open Cardiovascular Medicine Journal* 4: 302-12.
- Sfriso, Riccardo et al. 2018. « 3D Artificial Round Section Micro-Vessels to Investigate Endothelial Cells under Physiological Flow Conditions ». *Scientific Reports* 8(1): 5898.

- Sidibé, Adama et al. 2012. « Soluble VE-Cadherin in Rheumatoid Arthritis Patients Correlates with Disease Activity: Evidence for Tumor Necrosis Factor α -Induced VE-Cadherin Cleavage ». *Arthritis & Rheumatism* 64(1): 77-87.
- . 2014. « VE-cadherin Y685F knock-in mouse is sensitive to vascular permeability in recurrent angiogenic organs ». *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 307(3): H455-63.
- Sidibé, Adama, et Beat A. Imhof. 2014. « VE-Cadherin Phosphorylation Decides: Vascular Permeability or Diapedesis ». *Nature Immunology* 15(3): 215-17.
- Sluiter, Thijs J. et al. 2021. « Endothelial Barrier Function and Leukocyte Transmigration in Atherosclerosis ». *Biomedicines* 9(4): 328.
- Soker, Shay et al. 1998. « Neuropilin-1 Is Expressed by Endothelial and Tumor Cells as an Isoform-Specific Receptor for Vascular Endothelial Growth Factor ». *Cell* 92(6): 735-45.
- « Structure and Function of Blood Vessels | Anatomy and Physiology II ». <https://courses.lumenlearning.com/suny-ap2/chapter/structure-and-function-of-blood-vessels/> (16 août 2023).
- Sun, Zuyue et al. 2012. « VEGFR2 induces c-Src signaling and vascular permeability in vivo via the adaptor protein TSA α ». *The Journal of Experimental Medicine* 209(7): 1363-77.
- Tacconi, Carlotta et al. 2019. « Activation of the VEGFC/VEGFR3 Pathway Induces Tumor Immune Escape in Colorectal Cancer ». *Cancer Research* 79(16): 4196-4210.
- Taddei, Andrea et al. 2008. « Endothelial Adherens Junctions Control Tight Junctions by VE-Cadherin-Mediated Upregulation of Claudin-5 ». *Nature Cell Biology* 10(8): 923-34.
- Tammela, Tuomas et al. 2008. « Blocking VEGFR-3 Suppresses Angiogenic Sprouting and Vascular Network Formation ». *Nature* 454(7204): 656-60.
- Thurston, Gavin et al. 2000. « Angiopoietin-1 Protects the Adult Vasculature against Plasma Leakage ». *Nature Medicine* 6(4): 460-63.
- Timmerman, Ilse et al. 2012. « The tyrosine phosphatase SHP2 regulates recovery of endothelial adherens junctions through control of β -catenin phosphorylation ». *Molecular Biology of the Cell* 23(21): 4212-25.
- . 2015. « A local VE-cadherin and Trio-based signaling complex stabilizes endothelial junctions through Rac1 ». *Journal of Cell Science* 128(16): 3041-54.
- Tornavaca, Olga et al. 2015. « ZO-1 controls endothelial adherens junctions, cell-cell tension, angiogenesis, and barrier formation ». *The Journal of Cell Biology* 208(6): 821-38.
- Trow, Terence K., et Darren B. Taichman. 2009. « Endothelin receptor blockade in the management of pulmonary arterial hypertension: Selective and dual antagonism ». *Respiratory Medicine* 103(7): 951-62.
- Tsuji-Tamura, Kiyomi, et Minetaro Ogawa. 2018. « Morphology regulation in vascular endothelial cells ». *Inflammation and Regeneration* 38.

- Tuder, Rubin M. 2017. « Pulmonary Vascular Remodeling in Pulmonary Hypertension ». *Cell and tissue research* 367(3): 643-49.
- « Ultrastructure of developing alveoli. I. The role of the interstitial fibroblast - Vaccaro - 1978 - The Anatomical Record - Wiley Online Library ». <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ar.1091920402> (16 août 2023).
- Ushakumary, Mereena George, Matthew Riccetti, et Anne-Karina T. Perl. 2021. « Resident Interstitial Lung Fibroblasts and Their Role in Alveolar Stem Cell Niche Development, Homeostasis, Injury, and Regeneration ». *STEM CELLS Translational Medicine* 10(7): 1021-32.
- Vassiliou, Alice G., Anastasia Kotanidou, Ioanna Dimopoulou, et Stylianos E. Orfanos. 2020. « Endothelial Damage in Acute Respiratory Distress Syndrome ». *International Journal of Molecular Sciences* 21(22): 8793.
- Veerman, Krystle et al. 2019. « Single-Cell Analysis Reveals Heterogeneity of High Endothelial Venules and Different Regulation of Genes Controlling Lymphocyte Entry to Lymph Nodes ». *Cell Reports* 26(11): 3116-3131.e5.
- Vestweber, Dietmar. 2008. « VE-Cadherin ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 28(2): 223-32.
- . 2015. « How Leukocytes Cross the Vascular Endothelium ». *Nature Reviews Immunology* 15(11): 692-704.
- Vilgrain, Isabelle et al. 2013. « Evidence for Post-Translational Processing of Vascular Endothelial (VE)-Cadherin in Brain Tumors: Towards a Candidate Biomarker ». *PLoS ONE* 8(12): e80056.
- Villalba, Nuria, Sheon Baby, et Sarah Y. Yuan. 2021. « The Endothelial Glycocalyx as a Double-Edged Sword in Microvascular Homeostasis and Pathogenesis ». *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 9. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2021.711003> (6 septembre 2023).
- Vincent, Peter A., Kanyan Xiao, Kathleen M. Buckley, et Andrew P. Kowalczyk. 2004. « VE-cadherin: adhesion at arm's length ». *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 286(5): C987-97.
- Vukelic, Sasa, et Kathy K. Griendling. 2014. « Angiotensin II, from vasoconstrictor to growth factor: a paradigm shift ». *Circulation research* 114(5): 754-57.
- Wallez, Y. et al. 2007. « Src Kinase Phosphorylates Vascular Endothelial-Cadherin in Response to Vascular Endothelial Growth Factor: Identification of Tyrosine 685 as the Unique Target Site ». *Oncogene* 26(7): 1067-77.
- Wang, Jianming et al. 2021. « Persistence of RNA transcription during DNA replication delays duplication of transcription start sites until G2/M ». *Cell Reports* 34(7): 108759.
- Wang, Xinrong, Alfredo Maria Bove, Giuseppe Simone, et Binyun Ma. 2020. « Molecular Bases of VEGFR-2-Mediated Physiological Function and Pathological Role ». *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 8. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2020.599281> (30 août 2023).
- Weber, Christian, Line Fraemohs, et Elisabetta Dejana. 2007. « The Role of Junctional Adhesion Molecules in Vascular Inflammation ». *Nature Reviews Immunology* 7(6): 467-77.

- Weiss, Sara, Jianhua Cui, Leo Barnes, et David Cheresh. 2004. « Endothelial barrier disruption by VEGF-mediated Src activity potentiates tumor cell extravasation and metastasis ». *Journal of Cell Biology* 167(2): 223-29.
- Weiss, Elisabeth E. et al. 1998. « Vinculin Is Part of the Cadherin–Catenin Junctional Complex: Complex Formation between α -Catenin and Vinculin ». *The Journal of Cell Biology* 141(3): 755-64.
- Wessel, Florian et al. 2014a. « Leukocyte Extravasation and Vascular Permeability Are Each Controlled in Vivo by Different Tyrosine Residues of VE-Cadherin ». *Nature Immunology* 15(3): 223-30.
- . 2014b. « Leukocyte Extravasation and Vascular Permeability Are Each Controlled in Vivo by Different Tyrosine Residues of VE-Cadherin ». *Nature Immunology* 15(3): 223-30.
- White, Eric S. 2015. « Lung Extracellular Matrix and Fibroblast Function ». *Annals of the American Thoracic Society* 12(Suppl 1): S30-33.
- Wilting, J. et al. 1996. « VEGF121 Induces Proliferation of Vascular Endothelial Cells and Expression of Flk-1 without Affecting Lymphatic Vessels of Chorioallantoic Membrane ». *Developmental Biology* 176(1): 76-85.
- Xiao, Kanyan et al. 2005. « p120-Catenin Regulates Clathrin-dependent Endocytosis of VE-Cadherin ». *Molecular Biology of the Cell* 16(11): 5141-51.
- Xiao, Zeshuai, Zhaohui Zhang, et Scott L. Diamond. 1997. « Shear stress induction of the endothelial nitric oxide synthase gene is calcium-dependent but not calcium-activated ». *Journal of Cellular Physiology* 171(2): 205-11.
- Xin, Hong, Cuiling Zhong, Eric Nudleman, et Napoleone Ferrara. 2016. « Evidence for Pro-Angiogenic Functions of VEGF-Ax ». *Cell* 167(1): 275-284.e6.
- Yamada, Soichiro et al. 2005. « Deconstructing the Cadherin-Catenin-Actin Complex ». *Cell* 123(5): 889-901.
- Zhang, Xuebin et al. 2023. « Adipsin alleviates cardiac microvascular injury in diabetic cardiomyopathy through Csk-dependent signaling mechanism ». *BMC Medicine* 21: 197.
- Zhang, Yihang, et Jiazhen Wang. 2023. « Cellular and Molecular Mechanisms in Idiopathic Pulmonary Fibrosis ». *Advances in Respiratory Medicine* 91(1): 26-48.
- Zhao, Jingling et al. 2015. « Angiopoietin-1 Protects the Endothelial Cells Against Advanced Glycation End Product Injury by Strengthening Cell Junctions and Inhibiting Cell Apoptosis ». *Journal of Cellular Physiology* 230(8): 1895-1905.
- Zhao, Weiming, Lan Wang, Juntang Yang, et al. 2023. « Endothelial cell-derived MMP19 promotes pulmonary fibrosis by inducing E(nd)MT and monocyte infiltration ». *Cell Communication and Signaling* 21(1): 56.
- Zhao, Weiming, Lan Wang, Yaxuan Wang, et al. 2023. « Injured Endothelial Cell: A Risk Factor for Pulmonary Fibrosis ». *International Journal of Molecular Sciences* 24(10): 8749.

- Zhu, Xiaoxia, et Wen Zhou. 2015. « The Emerging Regulation of VEGFR-2 in Triple-Negative Breast Cancer ». *Frontiers in Endocrinology* 6.
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fendo.2015.00159> (8 septembre 2023).
- Zissel, G. et al. 2000. « Human Alveolar Epithelial Cells Type II Are Capable of Regulating T-Cell Activity ». *Journal of Investigative Medicine: The Official Publication of the American Federation for Clinical Research* 48(1): 66-75.