

2m11.3389.8

(1727857)

Université de Montréal

**Rôle de la MSK1 dans la signalisation intracellulaire
menant à la synthèse endothéliale de PAF
induite par le VEGF**

par

Catherine Marchand

Département de pharmacologie
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maître ès science (M.Sc.)
en pharmacologie

Décembre, 2005

© Catherine Marchand, 2005



W

H

U58

2006

V.069

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Rôle de la MSK1 dans la signalisation intracellulaire
menant à la synthèse endothéliale de PAF induite par le VEGF

présenté par :

Catherine Marchand

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Docteur Audrey Claing

président-rapporteur

Docteur Martin G. Sirois

directeur de recherche

Docteur Jean-Phillipe Gratton

membre du jury

Résumé

Les effets inflammatoires induits par le *vascular endothelial growth factor* (VEGF) requièrent la synthèse endothéliale du facteur d'activation plaquettaire (PAF). Notre laboratoire a précédemment démontré que la synthèse du PAF induite par le VEGF-A₁₆₅ résulte de l'activation du complexe VEGF récepteur-2/neuropiline-1 nécessite l'activation de la p38 et p42/44 *mitogen activated protein kinases* (MAPKs) et la phospholipase A₂ sécrétée de type V (sPLA₂-V). Les mécanismes qui régulent l'activation de la sPLA₂-V étant inconnus, nous avons étudié la contribution de la *mitogen-and stress-activated protein kinase-1* (MSK1), qui est activée de façon rapide et transitoire par les voies p38 et p42/44 MAPKs. Dans notre modèle de cellules endothéliales d'aorte bovine (BAEC), nous avons observé une interaction protéique constitutive entre la MSK1, les MAPKs p38 et p42/44 ainsi que la sPLA₂-V. Ces interactions protéiques ont été conservées dans des BAEC transfectées exprimant le vecteur témoin pCDNA3.1, la MSK1 sauvage (MSK1-WT) ou la forme mutée en N-terminale de la MSK1 (MSK1-D195A). Toutefois, dans les BAEC exprimant la forme mutée en C-terminale de la MSK1 (MSK1-D565A), l'interaction entre la MSK1 et la sPLA₂-V a été réduite de 82% et 90% en conditions basales et traitées au VEGF-A₁₆₅, comparé aux BAEC natives. Finalement, nous avons observé une augmentation de la synthèse de PAF en réponse au VEGF-A₁₆₅ dans les BAEC natives et transfectées exprimant le vecteur pCDNA3.1, la MSK1-WT et la MSK1-D195A de 166%, 139%, 125% et 82% respectivement. Toutefois, la synthèse de PAF a été complètement inhibée dans les BAEC exprimant la MSK1-D565A. Ces résultats démontrent le rôle essentiel du domaine kinase en C-terminale de la MSK1 dans l'interaction constitutive avec la sPLA₂-V qui est déterminante dans les événements menant à la synthèse du PAF induite par le VEGF-A₁₆₅.

Mots-clés : MSK1, VEGF, PAF, phospholipase A₂, inflammation, angiogenèse.

Abstract

Vascular endothelial growth factor (VEGF) inflammatory effects require acute platelet-activating factor (PAF) synthesis by endothelial cells (EC). We previously reported that VEGF-A₁₆₅-mediated PAF synthesis involves the activation of VEGF receptor-2/neuropilin-1 complex, which is leading to the activation of p38 and p42/44 mitogen-activated protein kinases (MAPKs) and group V secretory phospholipase A₂ (sPLA₂-V). As the mechanisms regulating sPLA₂-V remain unknown, we addressed the role of the mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1), which can be rapidly and transiently activated by p38 or p42/44 MAPKs. In native bovine aortic endothelial cells (BAEC), we observed a constitutive protein interaction of MSK1 with p38, p42/44 MAPKs and sPLA₂-V. These protein interactions were maintained in BAEC transfected either with the empty vector pCDNA3.1, wild-type MSK1 (MSK1-WT) or N-terminal dead kinase MSK1 mutant (MSK1-D195A). However, in BAEC expressing C-terminal dead kinase MSK1 mutant (MSK1-D565A), the interaction between MSK1 and sPLA₂-V was reduced by 82% and 90% under basal and VEGF-A₁₆₅-treated conditions, as compared to native BAEC. Treatment with VEGF-A₁₆₅ for 15 minutes increased basal PAF synthesis in native BAEC, pCDNA3.1, MSK1-WT and MSK1-D195A by 166%, 139%, 125% and 82% respectively. In contrast, PAF synthesis was prevented in cells expressing MSK1-D565A mutant. These results demonstrate the important role of the C-terminal domain of MSK1 for its constitutive interaction with sPLA₂-V, which is essential to support VEGF-A₁₆₅-mediated PAF synthesis.

Keywords: MSK1, VEGF, PAF, phospholipase A₂, inflammation, angiogenesis.

Table des matières

1	INTRODUCTION	1
1.1	ANGIOGENÈSE : PRÉSENTATION GÉNÉRALE.....	2
1.1.1	<i>Définition, rôle, mécanismes.....</i>	2
1.1.2	<i>Angiogenèse physiologique.....</i>	4
1.1.3	<i>Angiogenèse pathologique</i>	5
1.2	VEGF.....	6
1.2.1	<i>Régulation de l'angiogenèse : rôle du VEGF</i>	6
1.2.2	<i>Famille du VEGF</i>	7
1.2.3	<i>Régulation de l'expression du VEGF</i>	9
1.2.4	<i>Récepteurs du VEGF.....</i>	10
1.2.5	<i>Activités biologiques du VEGF-A₁₆₅ sur l'endothélium vasculaire.....</i>	16
1.3	INFLAMMATION & PAF	21
1.3.1	<i>La réaction inflammatoire.....</i>	21
1.3.2	<i>Les phospholipases A₂</i>	22
1.3.3	<i>Le facteur d'activation plaquettaire (PAF)</i>	26
1.3.4	<i>Le VEGF-A₁₆₅ active la voie de remodelage des phospholipides</i>	28
1.3.5	<i>Rôle de la sPLA₂-V dans la synthèse du PAF.....</i>	30
1.3.6	<i>Le PAF, un inducteur du processus angiogénique.....</i>	31
1.3.7	<i>Angiogenèse pathologique : Rôles du VEGF et du PAF</i>	32
1.4	SIGNALISATION INTRACELLULAIRE.....	34
1.4.1	<i>Transmission du signal intracellulaire</i>	34
1.4.2	<i>Les voies MAP kinases.....</i>	35
1.4.3	<i>p42/44 MAPK</i>	38
1.4.4	<i>p38 MAPK.....</i>	39
1.4.5	<i>MSK1: Mitogen-and stress-activated protein kinase</i>	40
1.5	PROBLÉMATIQUE	45
1.6	BUT DU TRAVAIL DE RECHERCHE	46

2	ARTICLE	47
2.1	SUMMARY	49
2.2	INTRODUCTION	50
2.3	MATERIAL & METHODS	53
2.4	RESULTS.....	57
2.5	DISCUSSION	61
2.6	ACKNOWLEDGEMENTS.....	64
2.7	REFERENCES	65
2.8	LEGENDS	68
2.9	FIGURES	71
3	DISCUSSION	77
3.1	CONTRIBUTION DE LA MSK1 DANS LA SYNTHÈSE DU PAF	78
3.2	LE VEGF-A ₁₆₅ INDUIT LA PHOSPHORYLATION DE LA MSK1	79
3.3	CO-PRÉCIPITATION DE LA MSK1 AVEC LA P38, P42/44 MAPKS ET LA sPLA ₂ -V : COMPLEXE MULTIPROTÉIQUES	80
3.3.1	<i>Rôle des p38 et p42/44 MAPKs dans l'activation de la MSK1 induite par le VEGF-A₁₆₅</i>	80
3.3.2	<i>Coimmunoprécipitation constitutive de la MSK1 avec la sPLA₂-V : Rôle de la MSK1 dans la synthèse de PAF induite par le VEGF-A₁₆₅</i>	82
3.4	CONTRIBUTION DES DOMAINES KINASES DE LA MSK1 DANS LA SYNTHÈSE DU PAF INDUITE PAR LE VEGF-A ₁₆₅	84
4	CONCLUSION	87
5	BIBLIOGRAPHIE	90

Liste des tableaux

Tableau I. Classification des phospholipases A₂

Tableau II. Substrats de la MSK1

Liste des figures

Figure 1 : Les étapes de l'angiogenèse

Figure 2 : Isoformes du VEGF-A

Figure 3 : Représentation schématique de la famille du VEGF et de ses récepteurs

Figure 4 : Représentation schématique des principales voies de signalisation du VEGF-
A₁₆₅

Figure 5 : Illustration du site d'hydrolyse sur les phospholipides spécifique aux
phospholipases A₂.

Figure 6 : Voie de remodelage impliquée dans la synthèse du PAF

Figure 7 : Représentation schématique des voies MAPKs retrouvées chez les
mammifères

Figure 8 : Représentation schématique d'un module des MAPKs

Figure 9 : Représentation schématique de la MSK1

Figure 10 : Résumé schématique illustrant l'implication de la MSK1 dans les
événements intracellulaires menant à la synthèse du PAF induite par le
VEGF-A₁₆₅

ARTICLE

Figure 1: Contribution of p38 and p42/44 MAPKs on VEGF-mediated MSK1
phosphorylation

Figure 2: MSK1 multi-protein complex formation

Figure 3: Characterization of transfected BAEC

Figure 4: Modulation of MSK1 multi-protein complex formation in transfected BAEC

Figure 5: Contribution of MSK1 on VEGF-mediated PAF synthesis

Figure 6: Schematic illustration of VEGF-mediated PAF synthesis: Proposed
contribution of MSK1

Liste des abréviations

AA: Acide arachidonique

Ang1: Angiopoïétine 1

Ang2: Angiopoïétine 2

BAEC: Cellule endothéliale d'aorte bovine

CoA-IT: Transacylase indépendante du Coenzyme A

cPLA₂: Phospholipase A₂ cytosolique

FGF: Facteur de croissance des fibroblastes

HIF-1: Facteur d'hypoxie inductible-1

IL: Interleukine

iPLA₂: Phospholipase A₂ Ca²⁺-indépendante

Lyso-PAF-AH: Acétyl-CoA: lyso-PAF acétylhydrolase

Lyso-PAF-AT: Acétyl-CoA: lyso-PAF acétyltransférase

MAPK: *Mitogen-activated protein kinase*

MMP: Métalloprotéase

MSK1: *Mitogen-and-stress activated protein kinase 1*

NO: Monoxyde d'azote

PAF: Facteur d'activation plaquettaire

PLA₂: Phospholipase A₂

sPLA₂: Phospholipase A₂ sécrétée

TNF- α : Facteur de nécrose tumorale α

VEGF: *Vascular endothelial growth factor*

VEGFR-1: Récepteur 1 du VEGF

VEGFR-2: Récepteur 2 du VEGF

«La joie de regarder et de
comprendre est le plus beau
cadeau de la nature.»

--Albert Einstein

Remerciements

En premier lieu, je remercie mon directeur de maîtrise, le Dr Martin Sirois, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire afin d'y réaliser un projet de recherche. J'ai grandement appris de cette liberté scientifique qui nous est laissée à tous et chacun et nous pousse à toujours chercher de nouvelles avenues.

Merci à tous les collègues que j'ai côtoyés, au centre de recherche de l'Institut de Cardiologie de Montréal, tout au long de ma maîtrise.

Je remercie Dr Audrey Claing, Dr Jean-Phillipe Gratton et Dr Martin G. Sirois pour l'évaluation de mon mémoire de maîtrise.

Un grand merci à chacun des membres de l'équipe du laboratoire votre soutien m'a encouragé tout au long de ma maîtrise. **Caro**, merci pour ton aide, ta présence et la confiance que tu m'as apportée, je prendrai exemple de ta minutie, ta persévérance et ta vigueur. **Juju**, merci pour ta vitalité, ton soutien et ta présence à distance !!! Tu as été une source d'inspirations à plusieurs niveaux tant personnels que scientifiques et tu le seras encore... **Steph**, (celle qui sait lire dans mes pensées !) ta joie de vivre, ta spontanéité, ta simplicité et surtout ta personnalité de « petit cœur » sont des qualités que j'apprécie chez toi, Merci ! **Alex**, j'admire ta constance, ton équilibre à travers les bonnes et les mauvaises expériences, ta patience et tes conseils scientifiques ont été bien appréciés. Merci ! **Pauly**, merci pour tes multiples coups de main et tes fous rires qui ont régulièrement détendu l'atmosphère de fin de journée, j'apprécie ton respect des gens. **Rick**, merci pour ton soutien, particulièrement lors de l'analyse des résultats du PAF !!! J'ai apprécié partager nos discussions de « SPORTO » et je suis certaine que tu m'appuis si je dis que la persévérance, la confiance et la motivation, que procure l'entraînement et les défis, équilibrent le quotidien, le travail et l'esprit ! C'est maintenant que je réalise la complicité que nous avons développée. Je suis ravie de vous y avoir, tous et toutes, rencontrés et je souhaite que notre amitié se prolonge à travers les années.

Merci à mes parents sans qui je n'aurais jamais pu me rendre où je suis rendue.

Mais surtout, merci à mon conjoint Alexandre pour m'avoir écouté, conseillé, inspiré et avant tout avoir cru en moi ce qui me procure une confiance qui édifie ma persévérance.

Avant-propos

L'inflammation est un processus normal de réponse tissulaire à toute agression et joue un rôle protecteur en participant aux processus de défense naturelle. Idéalement, l'inflammation est de courte durée et localisée au site d'infection ou du dommage; elle permet la réparation des tissus lésés et contribue au maintien de l'homéostasie des tissus. Toutefois, celle-ci peut devenir excessive et pathologique. L'inflammation pathologique est associée à plusieurs maladies vasculaires, telles que la croissance tumorale, la polyarthrite rhumatoïde, la rétinopathie du diabétique, l'athérosclérose et bien d'autres. Le développement de ces maladies nécessite la formation de nouveaux vaisseaux sanguins. En effet, le remodelage vasculaire est un des processus induit par l'inflammation. Lors de la réponse inflammatoire, les cellules du système immunitaire relâchent plusieurs facteurs proangiogéniques, qui vont favoriser la réorganisation des vaisseaux sanguins existants pour induire l'angiogenèse. Toutefois, pour différentes raisons, la régulation de ces processus est délétère et l'angiogenèse qui en résulte est pathologique. Comme l'inflammation est un élément commun à ces différentes pathologies et favorise les mécanismes proangiogéniques, elle représente donc une excellente cible pour le développement de stratégies thérapeutiques. Ainsi, d'innombrables études portent sur la compréhension des mécanismes inflammatoires en relation avec les processus de vascularisation, puisque l'inflammation est régulée par de multiples acteurs qui peuvent varier selon les conditions et les types cellulaires.

Ce travail de recherche a donc permis d'approfondir les mécanismes de signalisation intracellulaire engendrés lors d'un processus inflammatoire induit par le VEGF. Une meilleure compréhension des événements intracellulaires impliqués dans les processus pathologiques de l'inflammation pourrait contribuer au développement de cibles thérapeutiques plus spécifiques.

1 INTRODUCTION

1.1 Angiogenèse : Présentation générale

1.1.1 Définition, rôle, mécanismes

Le système vasculaire est le premier système à se développer et à atteindre un état fonctionnel chez l'embryon ¹. Son développement commence par la différenciation *in situ* des hémangioblastes, précurseurs des cellules endothéliales et des cellules souches hématopoïétiques de la moëlle osseuse, à partir du mésoderme embryonnaire ². Il s'ensuit une prolifération et une migration des cellules endothéliales d'où émergera la formation *de novo* de vaisseaux sanguins qui consiste en une architecture vasculaire primitive, selon un processus appelé vasculogenèse ³. La croissance de l'embryon va nécessiter le remodelage de l'arbre vasculaire primitif pour ainsi former de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de la microcirculation préexistante, processus appelé angiogenèse ⁴. La formation de vaisseaux sanguins de différents calibres, tant artériels que veineux, permet d'apporter aux tissus, l'oxygène et les nutriments nécessaires au développement cellulaire. Toutefois, ce processus très complexe résulte d'un équilibre finement régulé par une multitude de facteurs en plusieurs étapes. Le mécanisme le plus fréquent et le plus largement établi est l'angiogenèse dite « bourgeonnante ». Ce processus a été décrit depuis plus d'un siècle (initialement par von Kölliker) et il a subséquentement été caractérisé en une succession d'événements tels que décrits entre autres par le Dr Folkman ⁴. Ainsi, le processus s'initie lors de la dilatation des vaisseaux et de l'augmentation de la perméabilité endothéliale. La déstabilisation des vaisseaux et la dégradation de la membrane basale va libérer les cellules endothéliales de leur support (détachement des péricytes ou des cellules musculaires lisses). Ainsi libérées, il y aura migration et prolifération des cellules endothéliales au site de néovascularisation, ou incorporation de précurseurs angioblastes circulants issus de la moëlle osseuse; établissement des contacts intercellulaires menant à la formation de la lumière des nouveaux vaisseaux suite à leur organisation en

structure tubulaire; recrutement et prolifération de péricytes et cellules musculaires lisses vasculaires. Une fois assemblées, les cellules endothéliales deviennent quiescentes et peuvent survivre plusieurs années. Elles se différencient et se spécialisent en fonction du type de leur tissu hôte. Finalement, le néovaisseau sera mûré par remodelage (Figure 1).

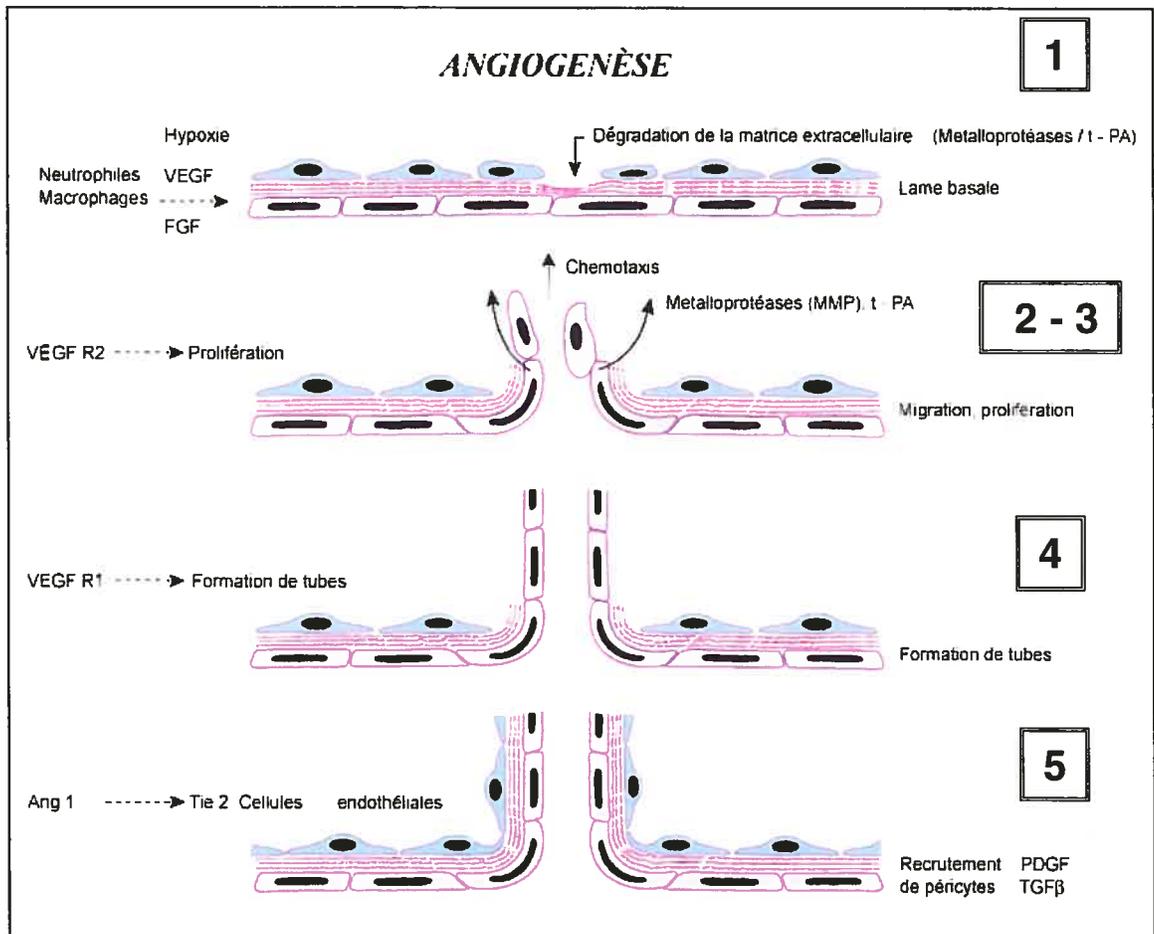


Figure 1: Les étapes de l'angiogenèse. La dégradation de la membrane basale (1) permet la migration (2) et la prolifération des cellules endothéliales (3) qui se différencient et s'organisent en une structure tubulaire (4) et finalement, il y a recrutement et prolifération de péricytes et cellules musculaires lisses vasculaires menant à la maturation du néovaisseau (5). (Image adaptée d'après le site web : <http://edumed.unige.ch/apprentissage/module1/cvc/>).

1.1.2 Angiogenèse physiologique

L'établissement d'un réseau vasculaire est essentiel au développement tissulaire et à son maintien. Très tôt dans le développement embryonnaire les mécanismes de vasculogenèse sont enclenchés, étant donné que ce processus représente une fonction physiologique essentielle à partir de laquelle plusieurs autres fonctions vitales se développeront. Chez l'adulte, le réseau vasculaire est stable et cesse d'évoluer (il adopte une fonction de maintien); il est estimé que l'endothélium qui borde la lumière des vaisseaux sanguins est quiescent et qu'il y a seulement 0.01% des cellules endothéliales de l'organisme qui se divisent ⁵. Seules quelques conditions particulières nécessiteront la réactivation des phénomènes permettant une néovascularisation ⁶⁻⁸.

Par exemple, lors de la cicatrisation, une néoangiogenèse se crée autour de la plaie à partir des tissus sains avoisinants. Les capillaires formés à proximité de la plaie vont permettre l'apport de nutriments aux tissus en cours de cicatrisation et contribuent à la réparation tissulaire. Un autre exemple est celui de l'exercice physique dans les sports d'endurance. Les athlètes qui pratiquent ces sports effectuent quotidiennement des exercices physiques prolongés, ce qui demande une très forte consommation d'oxygène au niveau de la masse musculaire et provoque une hypoxie locale. Cette hypoxie musculaire est compensée par la formation de capillaires qui permet de rétablir le niveau d'oxygénation demandé. Enfin, le cycle de reproduction chez la femme est un exemple particulier qui démontre la perpétuelle capacité d'adaptation de l'angiogenèse. En effet, les organes du système reproductif féminin (ovaire, utérus) sont les seuls tissus adultes présentant une croissance et une régression périodiques. Durant les différentes phases du cycle menstruel, ces organes sont le siège d'une angiogenèse dynamique puisqu'en absence de fécondation, la muqueuse s'amincit et les vaisseaux régressent. De plus, tout au long de la gestation, le placenta présentera ensuite lui-même une angiogenèse importante, qui, tout au long de la grossesse, s'adaptera en fonction des besoins du fœtus en développement.

1.1.3 Angiogenèse pathologique

L'angiogenèse exerce un rôle unique dans l'évolution de nombreuses pathologies. En effet, le développement de certaines pathologies requiert la formation de nouveaux vaisseaux sanguins dont les processus échappent au contrôle physiologique normal. Lorsqu'elle devient excessive, insuffisante ou anormale, l'angiogenèse contribue à de nombreux désordres malins, ischémiques, inflammatoires et immunitaires entre autres dans le développement tumoral, le psoriasis, la polyarthrite rhumatoïde et rétinopathie du diabétique, mais elle est aussi impliquée dans plusieurs autres pathologies, telles que l'athérosclérose, le sarcome de Kaposi, l'ostéomyélite, la leucémie et la liste est croissante^{8, 9}. Les mécanismes qui induisent l'angiogenèse physiologique et pathologique sont similaires, cependant le contrôle de l'angiogenèse pathologique n'est pas bien régulé. La seule différence dans les mécanismes se situe au niveau de l'inflammation qui ne précède pas de façon invariable les mécanismes d'angiogenèse physiologique. Ainsi, l'apparence de l'angiogenèse tumorale est caractérisée par une architecture vasculaire de forme irrégulière et tortueuse, une indifférenciation des vaisseaux (types artériel, veineux ou capillaire) et une hyperméabilité excessive des vaisseaux sanguins¹⁰.

1.2 VEGF

1.2.1 Régulation de l'angiogenèse : rôle du VEGF

L'ensemble des processus angiogéniques décrits précédemment est finement régulé selon une balance d'événements dynamiques entre agents angiogéniques et angiostatiques. Ces régulations moléculaires très précises conduisent, selon les conditions, à l'induction, la stabilisation ou la régression de l'arbre vasculaire mais le déséquilibre de cette balance dynamique, dans un sens ou dans l'autre, déclenche immédiatement l'activation ou la répression de l'angiogenèse. Au cours des dernières années, plusieurs études ont confirmé que l'angiogenèse nécessite l'intervention coordonnée d'une multitude d'inducteurs et d'inhibiteurs produits par les cellules saines ou pathologiques. Parmi ces facteurs, sont retrouvés entre autres, l'*acidic and basic fibroblast growth factor* (aFGF et bFGF), le *platelet derived growth factor* (PDGF), le *transforming growth factor- α and - β* (TGF- α et - β), l'*epidermal growth factor* (EGF), l'interleukine-8 (IL-8) et le *vascular endothelial growth factor* (VEGF)^{11, 12}. Toutefois, c'est le VEGF qui est considéré comme étant le principal facteur de croissance vasculaire¹³. Il est essentiel au développement embryonnaire, puisque la délétion d'un seul des deux allèles est létale *in utero* chez les embryons de souris hétérozygotes (VEGF^{+/-})^{14, 15}. L'état hétérozygote démontre un retard de la différenciation endothéliale, une diminution du bourgeonnement capillaire, un assemblage anormal des vaisseaux avec une quasi-absence des vaisseaux de taille moyenne et un élargissement des vaisseaux de petit calibre. La surexpression du VEGF au cours de l'embryogenèse provoque également des anomalies vasculaires¹⁶. Chez l'adulte, son action est aussi prédominante, puisqu'il agit à tous les stades de l'angiogenèse physiologique et pathologique : il augmente la perméabilité vasculaire, favorise la prolifération et la migration des cellules endothéliales et mobilise les angioblastes¹⁷, c'est aussi un agent chimiotactique pour les monocytes¹⁸.

1.2.2 Famille du VEGF

À l'origine, le VEGF a été identifié comme un facteur de perméabilité vasculaire sécrété par les cellules tumorales (*tumor vascular permeability factor* (VPF))¹⁹. Par la suite, le VEGF a été identifié indépendamment comme un facteur de perméabilité vasculaire et de croissance pour les cellules endothéliales²⁰⁻²². La nomenclature actuelle utilise la terminologie VEGF plutôt que VPF. La famille du VEGF inclut six différents analogues : le *placental growth factor-1 et -2* (isoformes : PlGF-1 et PlGF-2), le VEGF-A, -B, -C, -D et un homologue viral le VEGF-E. Chez l'humain, le gène codant pour le VEGF-A se situe sur le chromosome 6 en position p21.3²³ et est composé de huit exons séparés par sept introns. L'épissage alternatif du gène du VEGF-A donne lieu à sept différents isoformes de 206, 189, 183, 165, 148, 145 et 121 acides aminés (Figure 2)^{24, 25}. Le VEGF-A₁₆₅ est l'isoforme prédominant et les effets de cet homodimère de 45 kDa sont les mieux caractérisés²⁰. Pour cette raison, dans la littérature, le terme VEGF fait souvent référence au VEGF-A₁₆₅. Les isoformes obtenus diffèrent par la présence ou l'absence de séquences encodées par les exons 6 et 7, ce qui leur confère différentes propriétés puisqu'ils sont responsables de la liaison à l'héparine de la matrice extracellulaire. Ainsi, le VEGF-A₁₆₅, qui ne possède pas l'exon 6, a une affinité modérée pour l'héparine, ce qui explique que 50-70% du VEGF-A₁₆₅ sécrété reste lié aux cellules et à la matrice extracellulaire²⁶. D'autre part, le VEGF-A₁₂₁, un polypeptide acide qui ne possède ni l'exon 6 et ni l'exon 7, ne lie pas l'héparine et peut donc diffuser librement dans la circulation²⁷. Tandis que, le VEGF-A₁₈₉ et le VEGF-A₂₀₆, deux polypeptides basiques qui possèdent les exons 6 et 7, lient avec une forte affinité l'héparine et sont donc complètement séquestrés dans la matrice extracellulaire²⁸. Par conséquent, la matrice constitue un réservoir local de facteurs de croissance qui peuvent être relâchés en présence d'héparinases, de plasmine et de certaines *matrix métalloprotéinases* (MMPs)^{27, 29, 30}.

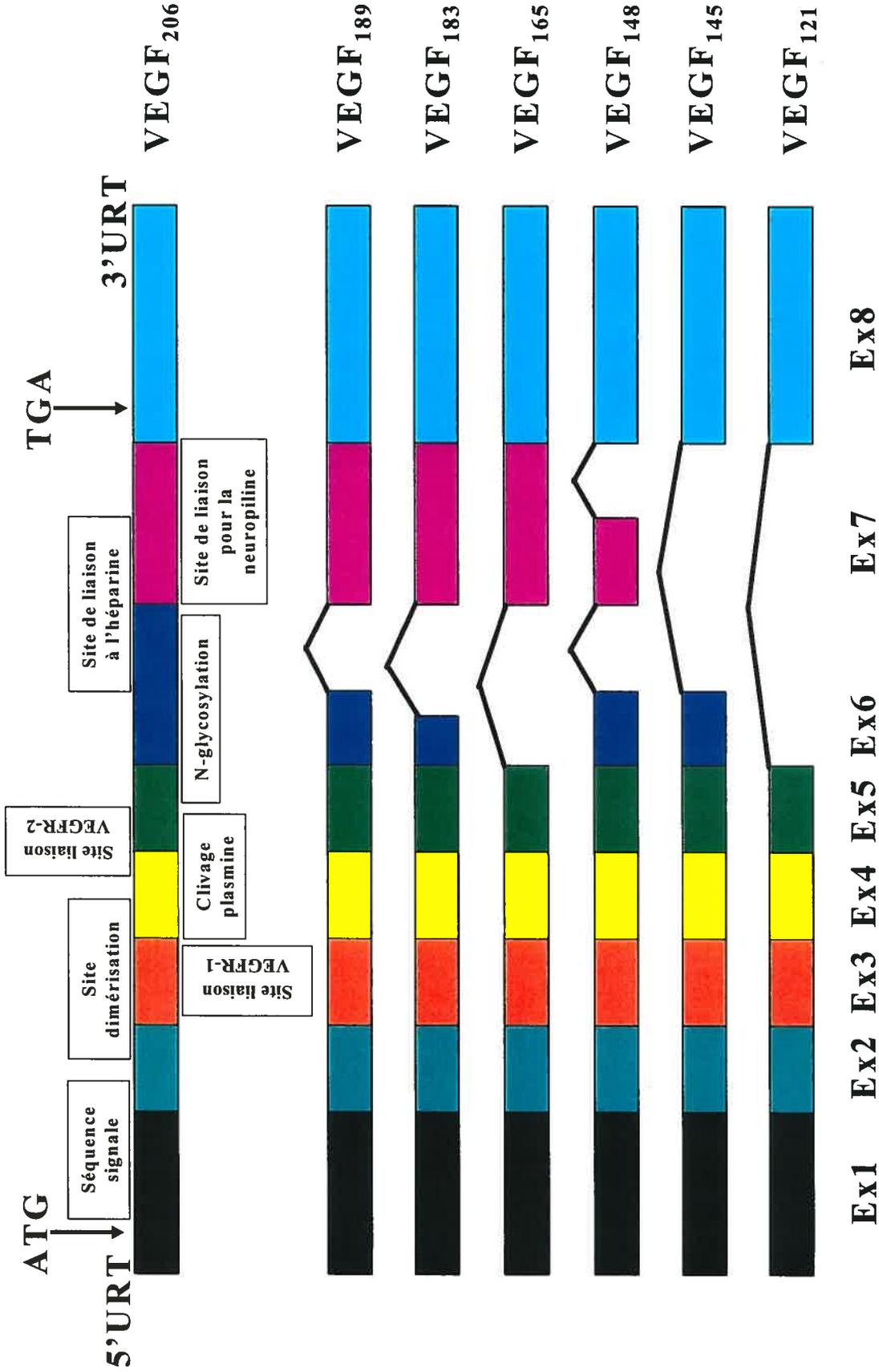


Figure 2 : Isoformes du VEGF-A. Le gène du VEGF-A produit plusieurs isoformes par épissage alternatif. La présence des exons 6 et 7 de l'isoforme VEGF-A₂₀₆ lui confère une séquestration complète à la matrice extracellulaire. Le VEGF-A₁₆₅ possède l'exon 7, ce qui lui permet de se lier au corécepteur NRP-1, tandis que le VEGF-A₁₂₁ n'est pas composé de l'exon 7 et est incapable de lier la NRP-1. (Bates et coll., Vascular Pharmacology, 2002. 39: 225-37)

1.2.3 Régulation de l'expression du VEGF

L'expression du VEGF est modulée par différents facteurs. Tout d'abord, la transcription du VEGF est en grande partie régulée par le niveau d'oxygène ambiant ³¹. En condition hypoxique, l'expression de VEGF-A est contrôlée par le facteur de transcription *hypoxia inducible factor-1* (HIF-1). HIF-1 est un hétérodimère composé de deux sous-unités soit, HIF-1 β qui est exprimée de façon constitutive et ubiquitaire dans les cellules, et HIF-1 α qui est aussi exprimée constitutivement, mais est rapidement ubiquitinylée et dégradée par le protéasome en condition normoxique. Cette ubiquitination des HIF-1 α est induite par le suppresseur de tumeurs von Hippel-Lindau (VHL) qui agit suite à l'hydroxylation de HIF-1 α par les HIF-prolyl-hydroxylases (HPH) qui utilisent l'oxygène comme cosubstrat. Ainsi, en état d'hypoxie, l'activité des HPH est inhibée et la sous-unité HIF-1 α est protégée de la dégradation et stabilisée ce qui lui permet d'être transloquée au noyau, de s'hétérodimériser avec HIF-1 β et d'activer l'expression de ses gènes cibles (pour revue, voir Pugh & Ratcliffe, 2003) ³². Ainsi, la régulation précise de ce facteur pallie au déficit en oxygène en activant l'expression de gènes proangiogéniques comme le VEGF ³³. De plus, la relâche de VEGF, dans un microenvironnement local précis, est aussi influencée par la présence de facteurs de croissance relâchés de façon autocrine ou paracrine tels que l'EGF, le TGF- α et - β , le *keratinocyte growth factor* (KGF), l'insuline-like *growth factor-1* (IGF), le FGF et le PDGF, ainsi que certaines cytokines inflammatoires (IL-1 β , IL-6) exprimées au niveau local ^{17, 34}.

1.2.4 Récepteurs du VEGF

Les différentes formes du VEGF exercent leurs actions en se liant à des récepteurs transmembranaires dotés d'une activité tyrosine kinase (famille des récepteurs tyrosines kinases (RTKs)) soit les récepteurs VEGFR-1, VEGFR-2 et VEGFR-3. Les VEGFR-1 et -2, à l'origine nommés Flt-1 (*fms*-like-tyrosine kinase) et KDR/ Flk-1 (kinase domain region / fetal liver kinase), sont composés d'un domaine extracellulaire comprenant sept domaines de type immunoglobuline, d'une région transmembranaire et d'une région intracellulaire à activité kinase^{35, 36}. Le VEGFR-3, à l'origine nommé Flt-4, fait aussi partie de la famille des RTKs cependant, il ne lie pas le VEGF-A₁₆₅, mais seulement le VEGF-C et -D et est principalement exprimé dans le système vasculaire lymphatique³⁷. L'expression conjointe de VEGFR-1 et VEGFR-2 est retrouvée principalement sur les cellules endothéliales, mais aussi sur les ostéoblastes et les cellules hématopoïétiques³⁸. Le VEGFR-1 est aussi exprimé sur les monocytes, macrophages, péricytes, trophoblastes du placenta et les cellules mésangiales de rein³⁹. Pour sa part, le VEGFR-2 est aussi retrouvé sur les cellules neuronales, cellules progénitrices de la rétine, cellules des conduits pancréatiques, les mégakaryocytes et les plaquettes sanguines^{40, 41}. Dans les cellules endothéliales, la phosphorylation de VEGFR-1 et -2 par le VEGF-A₁₆₅ a été démontrée, mais avec une plus grande intensité pour le VEGFR-2⁴². Leurs activations induisent la signalisation de différentes voies intracellulaires mais l'activation seule du VEGFR-2 est suffisante pour induire les principaux effets du VEGF-A₁₆₅^{42, 43}. Il existe aussi une forme soluble du VEGFR-1, soit le sFlt-1, qui ne possède pas le 7^e domaine de type immunoglobuline, ni la région transmembranaire et ni la région intracellulaire à activité kinase. Comme le VEGF-A₁₆₅ lie avec une forte affinité la forme soluble du VEGFR-1, ce dernier séquestre le VEGF-A₁₆₅ et inhibe ses différents effets. Ceci explique la fonction de clairance qui lui a été attribuée, et par conséquent, il est représenté comme un régulateur négatif des effets du VEGF-A₁₆₅⁴⁴ (Figure 3).

L'expression des trois récepteurs du VEGF à la surface externe des cellules est retrouvée sous forme de monomère, mais en présence du ligand VEGF (monomères du VEGF dimérisés via ponts disulfures), il y a dimérisation des monomères des récepteurs du VEGF. Ainsi, les différents analogues du VEGF peuvent recruter des homodimères des récepteurs du VEGF (soit VEGFR1/R1, VEGFR2/R2, VEGFR3/R3), mais il est aussi possible que certains ligands recrutent des hétérodimères formés de VEGFR-1 et VEGFR-2 ou de VEGFR-2 et VEGFR-3 ⁴⁵⁻⁴⁷.

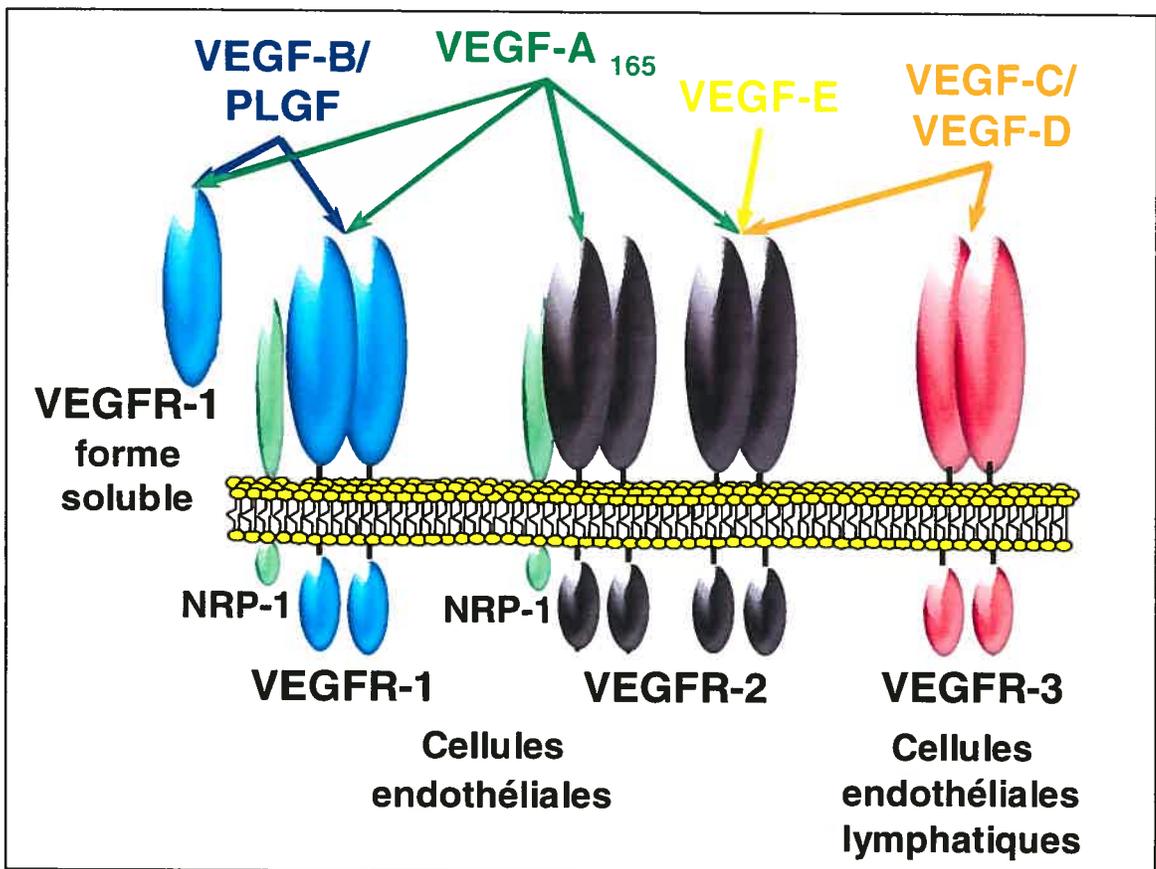


Figure 3 : Représentation schématique de la famille du VEGF et de ses récepteurs. Le VEGF-A₁₆₅ est le seul membre de la famille à pouvoir interagir avec les deux types de récepteurs retrouvés sur les cellules endothéliales soit le VEGFR-1, le VEGFR-2 et le co-récepteur NRP-1. Le VEGF-B ainsi que le PlGF lient le VEGFR-1 et sa forme soluble alors que le VEGF-C et le VEGF-D interagissent avec le VEGFR-2 et le VEGFR-3. Le VEGF-E est un agoniste sélectif du VEGFR-2.

Le VEGFR-1 fut le premier récepteur de la famille des RTKs à être identifié ⁴⁸, mais la fonction précise de ce récepteur n'est pas encore exactement déterminée, puisque les propriétés étudiées varient selon l'étape du développement et le type cellulaire. Néanmoins, une étude a démontré qu'au cours du développement embryonnaire l'inactivation génique de VEGFR-1^{-/-} chez la souris, cause la mort *in utero* des embryons après 8,5 jours de vie ⁴⁹. Ces embryons démontrent une anomalie de la formation des vaisseaux, mais la différenciation des cellules endothéliales est normale. La question du rôle principal du récepteur VEGFR-1 a été clairement posée par une expérience d'inactivation génique ciblée où le domaine tyrosine kinase intracellulaire de ce récepteur a été supprimé, tandis qu'était conservé le domaine extracellulaire de liaison du VEGF. Il a été démontré que cette forme mutante du récepteur VEGFR-1 (VEGFR-1-TK^{-/-}) était capable de lier le VEGF-A₁₆₅ et que les souris homozygotes pour cette inactivation génique se développaient normalement sans défaillance du réseau vasculaire ⁵⁰. Ces résultats suggèrent donc un rôle prédominant du domaine extracellulaire (et non du domaine tyrosine kinase) du récepteur VEGFR-1 qui pourrait agir comme un récepteur de clairance, au moins dans la régulation de l'angiogenèse embryonnaire.

Le VEGFR-1, en plus de lier le VEGF-A₁₆₅, peut lier de façon spécifique le PlGF et le VEGF-B ^{51, 52} via le site de liaison situé au niveau du second domaine de type immunoglobuline ⁵³. Initialement, le VEGFR-1 était perçu comme un récepteur qui séquestrait le VEGF-A₁₆₅ du VEGFR-2, puisqu'il induisait faiblement les effets du VEGF-A₁₆₅. En effet, la stimulation de VEGFR-1 par le VEGF-A₁₆₅ induit une faible autophosphorylation du récepteur ce qui sert de points d'ancrages aux molécules contenant des domaines SH2, telles que la phospholipase Cy (PLC γ) et la sous-unité p85 de la PI3K initiant une signalisation intracellulaire qui est peu connue ^{54, 55}. Toutefois, la migration des monocytes ainsi que la relâche endothéliale de la MMP9 en réponse au VEGF-A₁₆₅, requiert la présence du domaine kinase du VEGFR-1 ^{56, 57}. De plus, notre laboratoire a récemment

démontré, *in vitro*, que l'activation du VEGFR-1, en réponse aux PIGF et VEGF-B, pouvaient induire la translocation de la P-sélectine endothéliale et l'adhésion des neutrophiles à l'endothélium⁵⁸. Ensuite, nous avons aussi démontré que la synthèse de la PGI₂, en réponse au VEGF-A₁₆₅, nécessite l'hétérodimérisation de VEGFR-1 et VEGFR-2⁴⁷. Cette dernière observation atteste que le VEGFR-1 est un médiateur des effets angiogéniques du VEGF-A₁₆₅, par conséquent, les circonstances où le VEGFR-1 agit comme un récepteur de clairance ou comme un récepteur tyrosine kinase, ne sont pas clairement définies.

Bien que le VEGF-A₁₆₅ ait une très forte affinité pour le VEGFR-1, soit de 10 pM, par rapport à 75-125 pM pour le VEGFR-2, ce dernier joue un rôle essentiel dans le développement embryonnaire, puisque l'inactivation génique de VEGFR-2^{-/-} est létale entre les jours embryonnaires 8,5 à 9,5⁵⁹. De plus, il est le principal médiateur des activités biologiques du VEGF-A₁₆₅^{48, 60}. En présence du ligand, il y a activation du VEGFR-2, via sa dimérisation, ce qui engendre la transphosphorylation du récepteur et déclenche l'autophosphorylation de résidus tyrosines dans le domaine kinase intracellulaire activant trois grandes voies classiques de la signalisation⁴¹. Tout d'abord, l'affinité du domaine SH2 pour certains résidus tyrosines, favorise l'interaction du récepteur avec la phospholipase C γ (PLC γ) (grâce au domaine SH2 de l'enzyme)⁶¹. Cet événement induit l'activation de la cascade Raf-Mek-p42/44 *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) d'où résulte la phosphorylation de facteurs de transcription nucléaire impliqués dans la prolifération cellulaire^{62, 63}. La propriété chimiotactique du VEGF-A₁₆₅ induisant la migration cellulaire résulte de l'activation de la voie MLK-MKK-3/6-MAPK p38 qui active la *MAPK activated protein kinase-2* (MAPKAPK-2) et la *Heat shock protein 27* (Hsp27), responsables de la réorganisation rapide du cytosquelette d'actine⁶⁴. Les effets anti-apoptotiques du VEGF-A₁₆₅ passent par l'activation de la voie de la phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K) responsable de l'activité de la protéine Akt⁶⁵. L'activation de cette dernière phosphoryle et active

l'oxide nitrique synthase endothéliale (eNOS), soit l'enzyme responsable de la synthèse de NO induite par le VEGF-A₁₆₅⁶⁶ (Figure 4).

L'activité du VEGFR-2 peut être modulée par les protéoglycans semblables à l'héparine associés à la membrane cellulaire, puisqu'ils peuvent agir comme corécepteurs et lier le VEGF-A, augmentant ainsi la capacité de liaison au récepteur⁶⁷. Toutefois, le principal corécepteur du VEGFR-2 est la neuropiline 1 (NRP-1). À l'origine, la NRP-1 fut reconnue pour participer à la croissance axonale grâce à sa capacité de lier les sémaphorines/ collaspsines⁶⁸. Par la suite, elle fut identifiée comme étant un nouveau site de liaison du VEGF-A₁₆₅, contrairement à l'isoforme VEGF-A₁₂₁ qui ne peut pas lier la NRP-1, ce qui a démontré la spécificité de la liaison via l'exon 7⁶⁹. Ainsi, le VEGF-A₁₆₅, en plus de lier les récepteurs VEGFR-1 et VEGFR-2, possède aussi la capacité d'interagir avec la NRP-1⁷⁰. La NRP-1 est fortement exprimée dans les cellules endothéliales et lorsqu'elle est co-exprimée avec le VEGFR-2, elle potentialise la liaison du VEGF-A₁₆₅ et les effets biologiques qui en découlent. La liaison du VEGF-A₁₆₅ au VEGFR-2 et à la NRP-1 augmente la phosphorylation et l'activation du VEGFR-2 comparativement à une stimulation en absence de NRP-1⁷⁰. Récemment, notre laboratoire a démontré que la NRP-1 augmente la migration des cellules endothéliales, leur prolifération ainsi que la synthèse de PAF induite par le VEGF-A₁₆₅⁷¹. Nous avons aussi décelé un effet amplificateur sur la translocation de la P-sélectine et l'adhésion des neutrophiles aux cellules endothéliales ainsi que sur la synthèse de la PGI₂, en réponse au VEGF-A₁₆₅^{47 58}. La NRP-1 permet donc d'amplifier les effets biologiques du VEGF-A₁₆₅ suite à l'activation du VEGFR-2 (Figure 3 et 4). L'inactivation génique de NRP-1^{-/-}, provoque des défauts majeurs de vascularisation en plus d'interférer avec le développement du système artériel, ce qui démontre une participation de la NRP-1 qui est essentielle au soutien des événements angiogéniques induits par le VEGF-A₁₆₅⁷².

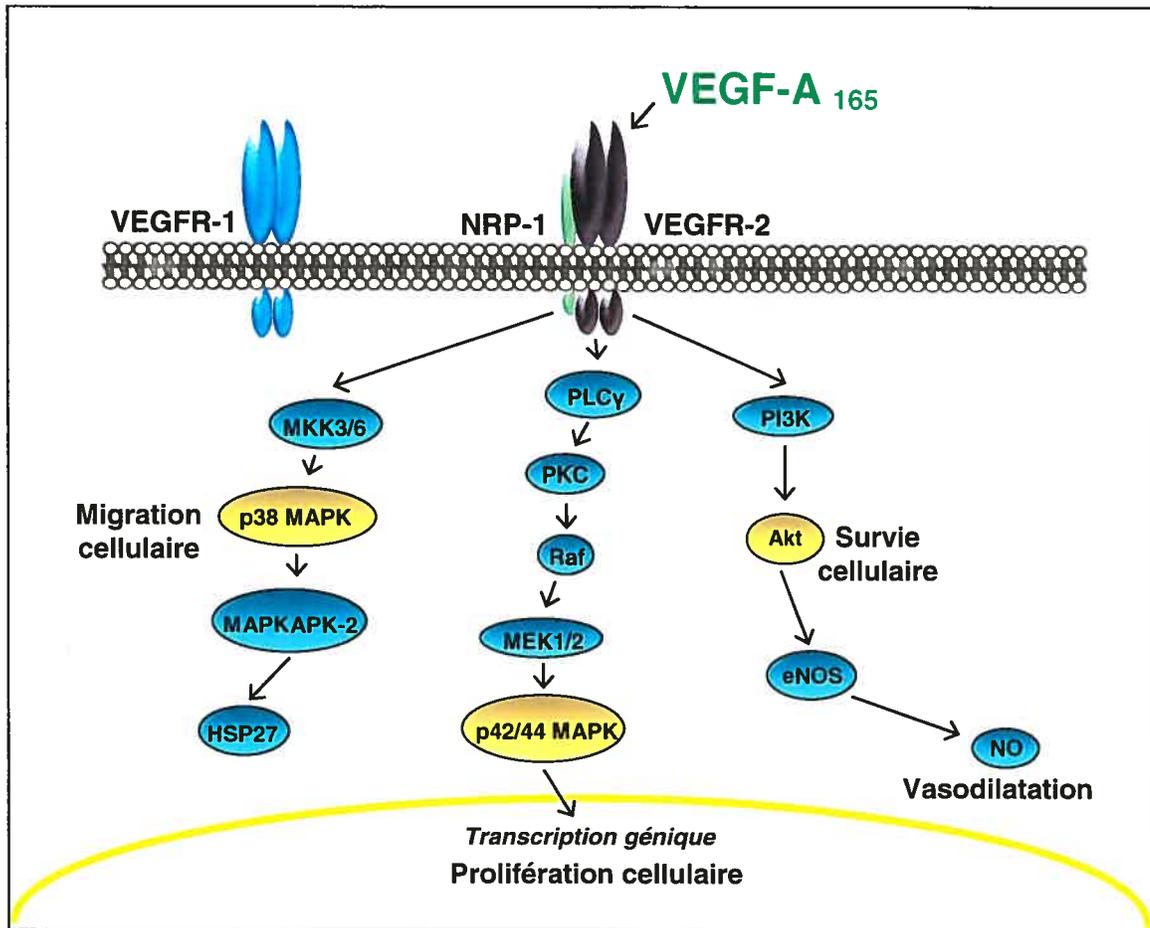


Figure 4 : Représentation schématique des principales voies de signalisation du VEGF-A₁₆₅. La stimulation du VEGFR-2 par le VEGF-A₁₆₅ active la voie de la p42/44 MAPK qui induit l'effet mitogénique. L'activation de la voie PI3 kinase/Akt favorise la survie cellulaire, tandis que la voie p38 MAPK participe à la migration cellulaire induite par le VEGF-A₁₆₅.

1.2.5 Activités biologiques du VEGF-A₁₆₅ sur l'endothélium vasculaire

In vivo, le VEGF-A₁₆₅ possède la capacité d'augmenter la perméabilité des vaisseaux sanguins ^{19, 73}. Cet effet sur l'endothélium résulte de différents événements proinflammatoires (décrits ci-dessous), puisque le VEGF-A₁₆₅ est aussi un facteur inflammatoire ^{74, 75}.

In vitro, il a été démontré que le VEGF induit une vasodilatation dose-dépendante via la production du NO ⁷⁶. La synthèse du NO se fait via l'activation de la eNOS. Récemment, il a été démontré que l'activation de la eNOS par le VEGF peut se faire via deux voies : une voie immédiate dépendante de la PLC-Ca²⁺/CaM et une voie retardée dépendante d'Akt ⁷⁷. Cette vasodilatation locale induite par le VEGF peut aussi résulter de la production de prostacycline (PGI₂) ⁷⁸ et du facteur d'activation plaquettaire (PAF), ce dernier augmentant aussi la perméabilité vasculaire *in vivo* ⁷⁹. La relaxation du lit vasculaire permet l'induction de changements morphologiques nécessaires afin de rendre les cellules endothéliales susceptibles aux effets prolifératifs et mitogéniques du VEGF-A₁₆₅ ^{7, 17, 80}. Ainsi, le VEGF en induisant la relâche de MMPs par les cellules endothéliales ⁸¹ et l'expression de protéases, comme la collagénase et les activateurs du plasminogène (tPA et uPA) permet la dégradation de la matrice extracellulaire ^{82, 83}. Une fois la membrane basale dégradée et sous l'influence du VEGF-A₁₆₅, les cellules endothéliales sont libres de migrer, de proliférer et de s'organiser en une structure tubulaire ^{22, 84}. De plus, la régulation du diamètre de la lumière des nouveaux vaisseaux a été démontrée comme étant dépendante de la concentration locale de VEGF et de sa signalisation via VEGFR-2 ⁸⁵. Une augmentation du transport du glucose au niveau de l'endothélium vasculaire a aussi été observée, possiblement pour répondre à l'augmentation de la demande d'énergie lors de la migration et la prolifération endothéliale induite par le VEGF ⁸⁶. L'effet inflammatoire qu'induit le VEGF résulte, entre autres, de la translocation et de l'expression endothéliale de plusieurs molécules d'adhérence (P-sélectine, E-

sélectine, *intercellular adhesion molecule* (ICAM-1), *vascular cell adhesion molecule* (VCAM-1) qui favorisent l'adhésion des cellules inflammatoires, telles que les neutrophiles et monocytes aux cellules endothéliales et permettent leur migration du sang vers les tissus^{58, 87}. Ces différents phénomènes observés individuellement *in vitro* font partie d'un tout bien orchestré qui permet la formation de nouveaux vaisseaux sanguins *in vivo*. Cependant, il a été démontré que le VEGF, *in vitro*, induit la croissance des cellules endothéliales et mène à la formation de structures ressemblant à des capillaires dans un modèle tridimensionnel de gel de collagène⁸⁴, ce qui illustre le rôle essentiel joué par le VEGF au sein des mécanismes angiogéniques.

Au niveau intracellulaire, les effets mitogéniques du VEGF-A₁₆₅ sont induits via la signalisation intracellulaire qui active la cascade d'activation de la p42/44 MAPK. En amont, l'activation de la p42/44 passe via une voie Ras-dépendante (faisant intervenir les protéines adaptatrices Sos, Grb2 et Shc) et une voie Ras-indépendante (faisant intervenir la phospholipase C et la protéine kinase C) ce qui mène à la phosphorylation de facteurs de transcription responsables de l'activation du cycle cellulaire et de la transcription génique⁶³. Par ailleurs, la migration chimiotactique induite par le VEGF-A₁₆₅ résulte de l'association rapide entre l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ et VEGFR-2 qui entraîne une augmentation du niveau de phosphorylation de VEGFR-2 et est suivie d'une activation de la voie MLK-MKK-3/6-MAPK p38 et de la phosphorylation de FAK (*focal adhesion kinase*). Cette phosphorylation spécifique de FAK (Tyrosine⁴⁰⁷) requiert l'association de la HSP90 au VEGFR-2 et permet le recrutement de la vinculine et paxilline à la FAK et par la suite la formation de contacts focaux⁸⁸. L'association synergique de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ et du VEGFR-2 est nécessaire à la transmission du signal induit par le VEGF jusqu'à la p38 MAPK qui, subséquemment, active la MAPKAPK-2 et la Hsp27, responsables du remodelage du cytosquelette d'actine⁶⁴. Parallèlement, on observe le rassemblement de contacts focaux à la surface membranaire (événement dont la localisation déterminera la direction migratoire), la formation de

fibres de stress et la contraction des cellules endothéliales qui sont nécessaires pour induire la migration cellulaire ⁸⁹. Le VEGF favorise aussi la survie des cellules endothéliales, *in vitro*, ce phénomène repose sur différents mécanismes. L'expression de protéines anti-apoptotiques par le VEGF telles que Bcl-2, A1, survivine et XIAP, vont influencer la survie de cellules endothéliales ^{90, 91}. La formation du NO est aussi un facteur qui promeut la survie des cellules endothéliales et sa synthèse requiert l'activation du VEGFR-2 et de la voie de la PI3K qui phosphoryle Akt et active la NO synthase ^{65, 66}. L'activation de la PI3K conduit à la phosphorylation de phosphoinositides (PtdIns) membranaires et à la synthèse locale de phosphatidylinositols (PtdIns(3,4)P₂ et PtdIns (3,4,5)P₃). La liaison de ceux-ci au domaine PH (*pleckstrin homology domain*) de AKT induit la translocation de AKT du cytoplasme vers la membrane plasmique ⁹². Ils permettent aussi le recrutement et l'activation de la protéine kinase PDK-1 (phosphoinositide-dépendante kinases 1) ce qui mène à l'activation maximale de AKT via la phosphorylation du résidu sérine (Ser⁴⁷³) et l'autophosphorylation du résidu thréonine (Thr³⁰⁸) ⁹³. Les protéines de la famille Akt sont des sérines / thréonines kinases qui favorisent la survie cellulaire et inhibent l'apoptose en particulier par leur capacité à phosphoryler et inactiver BAD. De plus, il a récemment été démontré que l'activation d'Akt par le VEGF-A₁₆₅ protège les cellules endothéliales de l'apoptose en inhibant les mécanismes apoptotiques p38 MAPK-dépendants. Cette étude propose que le «*cross-talk*», soit l'interaction de ces deux voies de signalisation, régule l'équilibre des mécanismes de cytoprotection et d'apoptose ⁹⁴.

Le rôle primordial du VEGF dans les mécanismes angiogéniques est indéniable; or, pour mener à terme le développement d'un vaisseau sanguin fonctionnel, l'action angiogénique du VEGF doit être accompagnée de l'effet complémentaire de plusieurs autres stimuli proangiogéniques. En effet, il a été observé que le réseau vasculaire nouvellement formé par le VEGF n'est en fait constitué que de vaisseaux sanguins de faible diamètre souffrant d'instabilité et d'hyperperméabilité vasculaire ⁹⁵. Ainsi, plusieurs molécules identifiées viennent

donc influencer l'action angiogénique du VEGF-A₁₆₅ en induisant ou inhibant l'activation des cellules endothéliales, leur prolifération, leur migration, ou leur organisation en structure tubulaire. D'autres sont impliquées dans la maturation des néovaisseaux (via le recrutement de cellules murales), dans leur remodelage et leur stabilisation. Parmi ces dernières, une importante coopération a été observée avec les molécules d'une nouvelle famille de facteurs de croissance vasculaire, la famille des angiopoïétines (Ang-1 et Ang-2) et de leur récepteur, Tie2. Des études d'inactivation ou de surexpression génique chez la souris ont démontré le rôle d'Ang-1 et Ang-2, ainsi que des récepteurs Tie1 et Tie2, dans les phénomènes d'angiogenèse embryonnaire et adulte, puisque leur inactivation génique entraîne une létalité embryonnaire (E) ou post-natale (P). Toutefois, il est intéressant de noter que l'inactivation des gènes VEGFR-1, VEGFR-2 et VEGF entraîne une létalité embryonnaire plus précoce (entre les jours E8,5 et E10,5)^{14, 15, 49, 59} que celle induite par l'inactivation des gènes Tie2 (E10,5)⁹⁶, Tie1 (entre E13,5 et E18,5)⁹⁷, Ang1 (E12,5)⁹⁸ et Ang2 (P14)⁹⁹ soit peu de temps après l'établissement vital du système cardiovasculaire. Ceci illustre davantage le rôle crucial du VEGF via la signalisation induite par les récepteurs du VEGF dans les stades précoces du développement embryonnaire⁵⁹. Ainsi, le VEGF initie le bourgeonnement des néovaisseaux alors qu'Ang-1 procède au remodelage de ces derniers¹⁰⁰.

Chez l'adulte l'Ang-2 peut être vue comme un facteur de plasticité vasculaire permettant de déstabiliser l'endothélium quiescent; de plus, il est fortement exprimé seulement aux sites de remodelage vasculaire, tant en conditions physiologiques que pathologiques^{101, 102}. Ce niveau d'expression élevé aurait pour rôle de contrecarrer le système stabilisateur angiopoïétine-1/Tie2 afin de permettre l'induction des processus angiogéniques par différents facteurs dont le VEGF-A₁₆₅. Ainsi, Ang-1 est un facteur qui favorise la stabilité, tandis que Ang-2 est impliquée dans la plasticité du réseau vasculaire. Cependant, des études récentes suggèrent que le rôle d'Ang-2 pourrait aller au delà d'un rôle

d'antagoniste et participer activement aux processus angiogéniques. En effet, Ang-2 est capable d'activer le récepteur Tie2¹⁰³ et d'induire la migration et la formation, en structure tubulaire, des cellules endothéliales¹⁰⁴, la translocation endothéliale de la P-sélectine¹⁰⁵ et la perméabilité vasculaire¹⁰⁶.

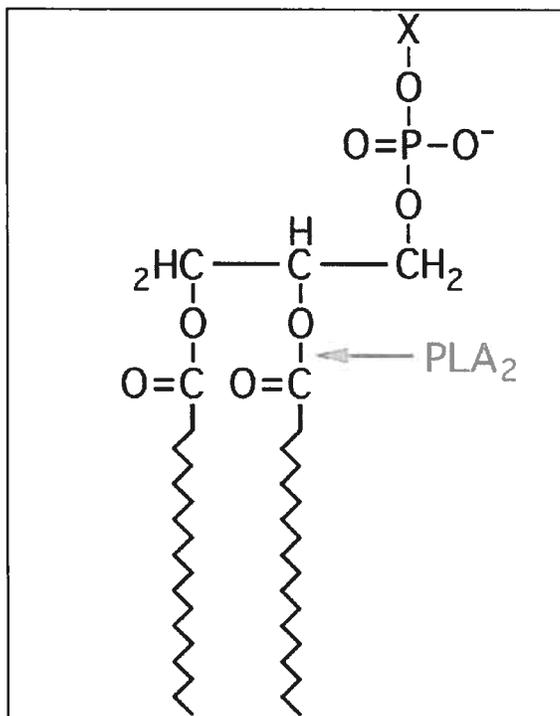
1.3 Inflammation & PAF

1.3.1 La réaction inflammatoire

L'inflammation est un processus normal de réponse tissulaire à toute agression et est caractérisée par quatre signes cardinaux : douleur, rougeur, chaleur et l'œdème. Elle a un rôle protecteur en participant aux processus de défense naturelle et à la réparation des tissus lésés. Ainsi, elle contribue à maintenir l'homéostasie des tissus. L'initiation du processus inflammatoire dépend de la nature du facteur le déclenchant. Il peut s'agir d'un facteur exogène (plaie, brûlure, agents chimiques, agents infectieux) ou d'une cause endogène (réaction d'hypersensibilité, lésion d'ischémie – reperfusion et autres). Dans tous les cas, elle se déroule par étapes : 1) augmentation du flux sanguin induit par une vasodilatation, 2) augmentation de la perméabilité vasculaire causée par une rétraction des cellules endothéliales permettant aux médiateurs immunitaires d'atteindre le site inflammatoire, 3) expression de molécules d'adhésion (ex. : sélectines, intégrines) par les cellules endothéliales et adhésion des leucocytes (neutrophiles, monocytes, lymphocytes) aux cellules endothéliales, 4) diapédèse : migration des leucocytes hors des capillaires pour atteindre le site inflammatoire et 5) adaptation et réparation tissulaire. Plusieurs substances participent au développement des diverses étapes de la réaction inflammatoire. Elle peut être contrôlée par des cytokines (ex. : interleukine IL-1, IL-8, TNF- α), des produits d'enzymes plasmatiques (ex. : protéines du complément, protéines de la cascade de coagulation), des médiateurs lipidiques (prostaglandines, leucotriènes, PAF) et par des médiateurs vasoactifs (vasopressine, angiotensine II, endothéline, acétylcholine, prostacycline, NO). Certains de ces médiateurs inflammatoires sont relâchés par les cellules (macrophages, lymphocytes) activées par des débris cellulaires ou par des agents pathogènes au site de la lésion ¹⁰⁷.

1.3.2 Les phospholipases A₂

Les phospholipases A₂ (PLA₂) constituent une vaste famille d'enzymes, classées en trois groupes parmi lesquels on trouve les PLA₂ Ca²⁺-dépendantes sécrétées (sPLA₂), les PLA₂ Ca²⁺-dépendantes cytosoliques (cPLA₂) et les PLA₂ Ca²⁺-indépendantes (iPLA₂)¹⁰⁸ (Voir le Tableau I).



Les PLA₂ sont des enzymes qui hydrolysent la liaison ester des phospholipides membranaires, en position *sn*-2, produisant des lysophospholipides et des acides gras libres (Figure 5). Les acides gras libres les plus souvent produits sont en particulier de l'acide arachidonique (AA) qui est le précurseur des médiateurs inflammatoires de la famille des éicosanoïdes comprenant entre autres les prostaglandines, thromboxanes et leucotriènes.

Figure 5 Illustration du site d'hydrolyse sur les phospholipides spécifique aux phospholipases A₂. (Image adaptée de Brown et coll., Traffic, 2003. 4: 214-221)

De plus, l'action des PLA₂ peut aussi produire une molécule précurseur du facteur d'activation plaquettaire (PAF), selon le lysophospholipide qui, par la suite, sera transformé par l'enzyme acétyltransférase (lyso-PAF-AT) pour produire du PAF. La relâche d'AA par les PLA₂ peut se produire de deux façons différentes, soit la voie immédiate où se produit une relâche d'AA et une synthèse d'éicosanoïdes très rapide (quelques minutes) et la voie retardée induite plusieurs heures après la stimulation.

Tableau I. Classification des phospholipases A₂^a

Groupes	Autres noms	Sources	Localisation	Poids (kDa)	Besoin en Ca ²⁺	Activité Hydrolyse*	
I	A	Venin de cobra	Sécrétée	13-15	mM	Oui	
	B	Pancréas des mammifères	Sécrétée	13-15	mM	Non	
	A	Liquide synovial/plaquettes	Sécrétée	13-15	mM	Non	
	B	Venin de vipère du Gabon	Sécrétée	13-15	mM	N/D	
II	C	Testicule de souris/rat	Sécrétée	15	mM	Non	
	D	Humain, rongeurs	Sécrétée	14-15	mM	Non	
	E	Humain, rongeurs	Sécrétée	14-15	mM	Non	
	F	Humain, rongeurs	Sécrétée	16-17	mM	Non	
III		Abeille/Lézard/Humain	Sécrétée	16-18	mM	Oui	
IV	A	cPLA ₂ α	Rein de rat/U937/Humain	Cytosolique	85	<μM	N/D
	B	cPLA ₂ β	Cerveau Humain	Cytosolique	85	<μM	N/D
	C	cPLA ₂ γ	Cœur humain/muscle	Cytosolique	85	Aucun	N/D
V		Macrophages P388D ₁	Sécrétée	14	mM	Oui	
VI	iPLA ₂	Macrophages P388D ₁	Intracellulaire	80-85	Aucun	N/D	
VII	A	PAF-AH	Plasma humain	Sécrétée	45	Aucun	N/D
	B	PAF-AH (II)	Cerveau bovin	Intracellulaire	42	Aucun	N/D
VIII		PAF-AH Ib	Cerveau humain	Cytosolique	29	Aucun	N/D
IX		Venin d'escargot de mer	Sécrétée	14	mM	N/D	
X		Leucocytes humains	Sécrétée	14	mM	Oui	
XI	A	Plantes	Sécrétée	12,4	mM	N/D	
	B	Plantes	Sécrétée	12,9	mM	N/D	
XII	A	Humain majorité des organes	Sécrétée	?	mM	Non	
	B	Humain, Souris	Sécrétée			Non	

* L'activité d'hydrolyse des sPLA₂s a été déterminée en fonction de l'AA relâché à partir de cellules intactes de mammifères (monocytes, macrophages, HEK293, ou RBL 2H3) traitées avec sPLA₂s exogène. N/D : Non-déterminé

^a (Tableau adapté de Dennis et coll., Trends Biochemical Sciences, 1997.22 :1-2. & Triggiani et coll., J Allergy Clin Immunol, 2005. 116:1000-1006.)

Chez les mammifères, les PLA₂ sécrétées (sPLA₂) représentent la plus grande famille comprenant 10 enzymes actives soit : sPLA₂-IB, -IIA, -IIC, -IID, -IIE, -IIF, -III, -V, -X et -XIIA^{109, 110}. Les sPLA₂ partagent quelques caractéristiques, entre autres, un poids moléculaire entre 14-19 kDa et une activation enzymatique nécessitant une concentration millimolaire de calcium. Les sPLA₂ sont retrouvées dans le milieu extracellulaire lorsqu'elles sont sécrétées par les cellules, mais elles sont aussi présentes au niveau intracellulaire dans des vésicules ou associées aux membranes de différentes organelles^{108, 111}. Malgré ces ressemblances, les sPLA₂ régulent une grande variété de fonctions physiologiques et induisent différentes voies de signalisation, dont la majorité sont spécifiques aux tissus. L'activité catalytique des sPLA₂ dans des conditions physiologiques est présente, chez l'humain, seulement dans quelques tissus comme le pancréas où l'on y retrouve la sPLA₂-IB puis le cartilage, le petit intestin, la prostate et les glandes lacrymales où l'on y retrouve la sPLA₂-IIA¹¹². Jusqu'à présent, chez l'homme, se sont les sPLA₂-IB et sPLA₂-IIA, qui ont le plus souvent été impliquées dans le développement de pathologies inflammatoires¹¹². Toutefois, la découverte récente de la sPLA₂-V démontre qu'elle est aussi impliquée dans l'inflammation via la synthèse du PAF¹¹³ et d'éicosanoïdes (PGD₂, PGE₂), autant dans la phase immédiate^{114, 115} que lors de la phase retardée^{114, 116}. En effet, l'inactivation génique de la sPLA₂-V^{-/-} a récemment confirmé l'implication de l'activité de cette PLA₂ dans la synthèse d'éicosanoïdes¹¹⁷. De plus, une augmentation de l'expression de la sPLA₂-V en présence de stimuli proinflammatoires a été observée *in vitro* et *in vivo*, spécifiquement dans les phases aiguës suivant un infarctus du myocarde^{118, 119}.

Le groupe VI, soit les PLA₂ Ca²⁺-indépendantes (iPLA₂), contrairement aux sPLA₂ ne prennent pas directement part à la réaction inflammatoire. Leur principale fonction est de contrôler le niveau de phospholipides et de maintenir l'homéostasie via le remodelage des membranes de différentes structures intracellulaires^{120, 121}. De plus, il a récemment été suggéré que le processus de

remodelage des membranes cellulaires observé lors de l'apoptose serait aussi régulé par la iPLA₂^{122, 123}.

Les trois différentes phospholipases cytosoliques (cPLA₂) α , β et γ identifiées ont été classées dans les groupes IVA, IVB et IVC respectivement¹²⁴. Les cPLA₂ regroupent des enzymes de haut poids moléculaire (85 kDa) et ne nécessitent que de faible quantité de calcium. La cPLA₂ α est l'enzyme la plus étudiée, puisqu'elle est retrouvée dans la majorité des tissus, sauf dans les lymphocytes, tandis que la cPLA₂ β est exprimée dans le cerveau et dans le pancréas et la cPLA₂ γ est exprimée dans le muscle squelettique¹²⁴. L'activation de la cPLA₂ α est régulée à la fois par les niveaux de calcium intracellulaire et via la phosphorylation de résidus sérines qui engendre sa translocation du cytosol aux membranes périmoléculaires (golgi, réticulum endoplasmique et membrane nucléaire)¹²⁵. Cette translocation permet l'interaction de la cPLA₂ avec son substrat, mais favorise aussi la proximité avec d'autres enzymes responsables de la synthèse d'éicosanoïdes, soit les cyclooxygénases et les lipoxygénases. L'activation maximale nécessite la phosphorylation soutenue de différents résidus, dont les deux principaux sont la Ser⁵⁰⁵ et la Ser⁷²⁷, via les p38 et p42/44 MAPK et les MAPK-activated protein kinases (MAPKAPK-2, MNK-1 et MSK1) respectivement^{126, 127}.

Enfin, le groupe VII des PLA₂ comprend les PAF acétylhydrolases (PAH-AH) qui hydrolysent, en position sn-2, le résidu acétyl du PAF et les phospholipides à courtes chaînes dont en résulte le lyso-PAF¹²⁸.

Tous les types cellulaires présentent une activité des PLA₂, elles sont donc essentielles aux activités cellulaires normales. Ainsi, la famille des PLA₂ regroupe une multitude d'enzymes agissants à divers niveaux et desquelles plusieurs effecteurs sont générés. En revanche, les PLA₂ ont souvent été impliquées dans la pathogenèse de plusieurs désordres vasculaires où s'y développe l'inflammation

(aiguë ou chronique). Les éicosanoïdes, tout comme le PAF, proviennent de l'induction des PLA₂ et sont des médiateurs-clés de l'inflammation et de diverses conditions pathologiques. Le rôle central des PLA₂ dans le processus inflammatoire fait de ces enzymes d'excellentes cibles thérapeutiques. L'inhibition des PLA₂ préviendrait la synthèse des médiateurs inflammatoires, ce qui offrirait des avantages thérapeutiques appréciables. Toutefois, une inhibition générale soulève d'importantes questions, puisque les PLA₂ possèdent plusieurs caractéristiques et propriétés qui se chevauchent et divers types de PLA₂ sont présentes dans de nombreux types cellulaires.

1.3.3 Le facteur d'activation plaquettaire (PAF)

Le facteur d'activation plaquettaire (PAF, 1-O-alkyl-2-acétyl-sn-glycéro-3-phosphocholine) fut découvert en 1970 comme un facteur relâché par les leucocytes et capable de provoquer l'activation de la fonction plaquettaire ¹²⁹. À ce jour, le PAF a été identifié comme un médiateur lipidique proinflammatoire ¹³⁰. Il est produit et relâché par un grand nombre de cellules telles que les monocytes, macrophages, neutrophiles, granulocytes, plaquettes et cellules endothéliales ^{131, 132}. Le PAF est un médiateur très puissant agissant à de très faibles concentrations ($>10^{-12}$ M) et agit au sein de plusieurs processus, tant physiologiques que pathologiques, dont l'inflammation, les allergies, la thrombose, l'athérosclérose et l'angiogenèse ^{131, 133}. *In vitro*, le PAF provoque l'agrégation, la dégranulation et la production de radicaux libres par les leucocytes. De plus, lorsqu'il est co-localisé avec la P-sélectine à la surface des cellules endothéliales, ces deux facteurs interagissent respectivement avec le récepteur du PAF et le *P-selectin glycoprotein ligand-1* (PSGL-1) à la surface des leucocytes, ce qui favorise l'adhérence, le roulement et l'activation de ceux-ci ^{134, 135}. Le PAF augmente aussi la contraction des cellules musculaires lisses ¹³⁶ et via sa liaison aux récepteurs endothéliaux membranaires ou endosomaux (intracellulaires), il produit en cascade une augmentation de calcium intercellulaire, une redistribution des fibres de stress,

une régression de la structure du cytosquelette d'actine, un rétrécissement cellulaire suivi de la formation de brèches intercellulaires^{132, 137}. Ces différents effets inflammatoires induits par le PAF permettent une augmentation de la perméabilité vasculaire *in vivo*¹³⁸.

En conditions physiologiques, l'action de ce puissant médiateur proinflammatoire est finement régulée par différents mécanismes qui agissent au niveau des processus de synthèse et de dégradation. Le PAF peut être synthétisé par deux voies enzymatiques : la voie *de novo* et la voie du remodelage¹³¹. Dans la voie *de novo*, la synthèse de PAF est produite à partir d'un analogue O-alkyl de l'acide lysophosphatidique et nécessite une séquence de réactions d'acétylation, de déphosphorylation et d'addition de phosphocholine. L'activation de cette voie est constitutive et maintient la synthèse du PAF à un niveau basal, elle répond aux besoins physiologiques de l'organisme, ce qui suggère que le PAF aurait un rôle dans l'homéostasie de certains organes¹³⁹. D'autre part, la voie du remodelage est celle qui induit principalement la synthèse du PAF, suite à une stimulation par un agoniste approprié, chez les neutrophiles, monocytes et cellules endothéliales. L'activation de cette voie est initiée par l'action d'une PLA₂ ou par la transacylase indépendante du Coenzyme A (CoA-IT) qui hydrolyse les phospholipides membranaires en position *sn-2* pour former le lyso-PAF. Celui-ci est par la suite acétylé par lyso-PAF-AT pour former le PAF (Figure 6)^{139, 140}.

Il a été observé que le PAF formé est relâché dans le fluide interstitiel par les monocytes et éosinophiles, alors qu'il est transloqué à la membrane plasmique et retenu à la surface des cellules endothéliales. Ainsi, le PAF possède une activité autocrine et paracrine^{141, 142}. L'action du PAF est régulée par le groupe VII des PLA₂, soit les PAF-AH qui comprennent différentes enzymes intra et extracellulaires^{108, 131}. Celles-ci hydrolysent le groupement acétyl en position *sn-2* et inactivent le PAF. Les plus grandes sources cellulaires produisant l'enzyme PAF-

AH seraient les macrophages et les hépatocytes. De plus, dans le foie le PAF y induirait lui-même la production de la PAF-AH¹⁴³.

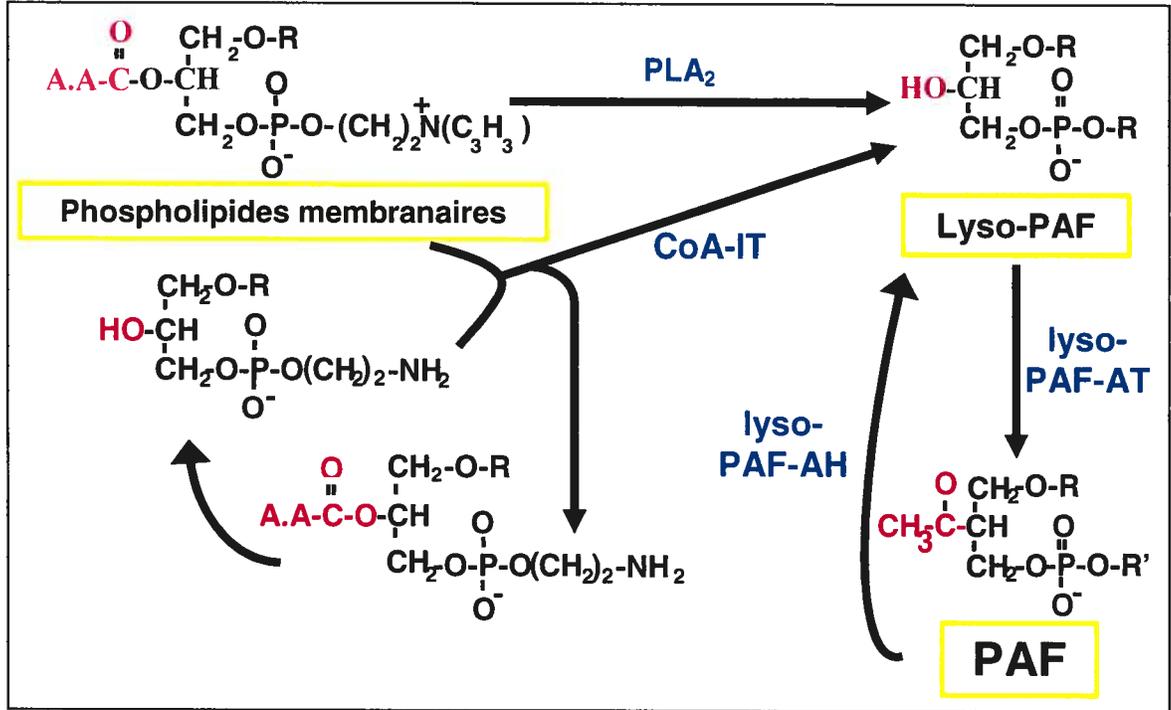


Figure 6 : Voie de remodelage impliquée dans la synthèse du PAF. L'hydrolyse initiale des phospholipides membranaires peut être catalysée par la phospholipase A₂ (PLA₂) ou une transacylase indépendante du Coenzyme A (CoA-IT) menant à la formation du lyso-PAF. Ce dernier peut ensuite être converti en PAF par l'acétyl-CoA :lyso-PAF acétyltransférase (lyso-PAF-AT). Le PAF peut aussi être reconverti en lyso-PAF par la lyso-PAF acétylhydrolase (lyso-PAF-AH).

1.3.4 Le VEGF-A₁₆₅ active la voie de remodelage des phospholipides

La synthèse de PAF est impliquée dans plusieurs conditions physiologiques et pathologiques et joue un rôle important dans l'augmentation de la perméabilité vasculaire induite par le VEGF-A₁₆₅. Dans plusieurs types cellulaires, l'induction de la synthèse de PAF résulte de l'activation de la voie de remodelage des phospholipides. Des études effectuées dans notre laboratoire ont permis d'approfondir les mécanismes intracellulaires par lesquels le VEGF-A₁₆₅ mène à la synthèse du PAF.

Tout d'abord, l'utilisation d'oligonucléotides antisens abolissant l'expression des récepteurs du VEGF-A₁₆₅ a révélé l'importante contribution du récepteur VEGFR-2 dans la synthèse du PAF, contrairement au VEGFR-1. De plus, l'hétérodimérisation des récepteurs VEGFR-1 et VEGFR-2 n'est pas nécessaire à l'induction des activités biologiques observées¹⁴⁴. Cette étude était la première à démontrer que l'activation de la voie de remodelage des phospholipides menant à la synthèse de PAF, peut avoir lieu via l'autophosphorylation d'un récepteur tyrosine kinase.

L'activation du VEGFR-2 active différentes voies de signalisation qui gouvernent plusieurs mécanismes intracellulaires dans les cellules endothéliales. Ainsi, à l'aide de plusieurs inhibiteurs spécifiques, nous avons pu investiguer le rôle des différentes voies de signalisation ce qui a permis de démontrer l'implication des voies de signalisation de la p38 et de la p42/44 MAPK dans la synthèse de PAF induite par le VEGF-A₁₆₅¹⁴⁵. Toutefois, l'activation de la voie PI3K agit comme un régulateur endogène négatif, atténuant la synthèse de PAF, ce qui suggère un équilibre intracellulaire entre les activités anti- et pro-PAF induites par le VEGF-A₁₆₅¹⁴⁵. Les résultats de cette étude ont démontré que la synthèse du PAF induite par le VEGF-A₁₆₅ nécessite l'activation parallèle des voies de la p38 et de la p42/44 MAPKs. Étant donné que la synthèse de PAF provient de l'activation des différentes enzymes de la voie de remodelage des phospholipides, nous avons supposé que les voies de signalisation activées par le VEGF agiraient au niveau de la régulation de ces enzymes. Cette hypothèse est également soutenue par différentes études. Tout d'abord, il a été démontré qu'un des substrats commun des voies p38 et p42/44 MAPKs est la cPLA₂^{126, 146}, une phospholipase importante à la synthèse du PAF dans les macrophages¹⁴⁷. De plus, une récente étude démontre que les p38 et p42/44 MAPKs sont les enzymes qui régulent la synthèse du PAF dans des neutrophiles¹⁴⁸.

1.3.5 Rôle de la sPLA₂-V dans la synthèse du PAF

Selon le type cellulaire, l'enzyme qui régule l'activation de la première étape de la voie de remodelage des phospholipides, soit la conversion des phospholipides en lyso-PAF, peut varier. Par exemple, la cPLA₂¹⁴⁹, et la CoA-IT¹⁵⁰ sont des enzymes qui peuvent induire la formation du lyso-PAF. Par la suite, il a été démontré que c'est via l'action de la lyso-PAF AT, elle-même activée par la p38 MAPK¹⁵¹, que le lyso-PAF sera transformé en PAF¹⁵¹.

Notre laboratoire a spécifiquement identifié la sPLA₂-V comme l'enzyme responsable de l'activation de la voie de remodelage dans les cellules endothéliales. De plus, nous avons démontré que la synthèse de PAF est indépendante de la cPLA₂, grâce à l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques des différents groupes de PLA₂ sur la synthèse de PAF, ce qui nous a permis d'éliminer le groupe des iPLA₂ et celui des cPLA₂ contrairement à celui des sPLA₂. Par la suite, l'utilisation d'un inhibiteur spécifique des sPLA₂ de types-IIA et -V à une concentration connue pour inhiber spécifiquement l'activité de la sPLA₂-IIA n'a pas bloqué la synthèse de PAF, tandis qu'à une concentration connue pour inhiber l'activité des deux, la synthèse de PAF a été bloquée. Néanmoins, l'identification précise de la sPLA₂-V dans notre modèle cellulaire a été déterminée par RT-PCR et par Western blot où nous avons constaté l'expression endothéliale de la sPLA₂-V, alors que la sPLA₂-IIA est absente¹⁵².

Bien que différentes études aient démontré que l'activité de la cPLA₂ est essentielle à l'activité proinflammatoire de la sPLA₂-V, cette relation enzymatique a seulement été observée en fonction de la synthèse de prostaglandines dans la lignée de macrophages P388D1, neutrophiles et éosinophiles^{115, 153}. Dans notre modèle cellulaire, la synthèse de PAF endothéliale requiert uniquement l'activation de la sPLA₂-V et est indépendante de la cPLA₂, ce qui est en accord avec une étude antérieure réalisée dans des monocytes¹⁵⁴ et également avec une autre étude qui soutient que l'activation de la sPLA₂-V peut induire la transformation des

phospholipides en lyso-PAF indépendamment de la cPLA₂¹⁵⁵. De plus, nous avons démontré que la synthèse du PAF induite par le VEGF-A₁₆₅ nécessite des concentrations de calcium de l'ordre du millimolaire, ce qui coïncide avec une caractéristique majeure du groupe des PLA₂ sécrétées dont l'activité enzymatique est calcium-dépendante. Dans les cellules endothéliales, la sPLA₂-V a été identifiée comme l'enzyme responsable de l'activation de la première étape de la voie de remodelage.

1.3.6 Le PAF, un inducteur du processus angiogénique

Différentes études démontrent que le PAF participe de façon directe au processus angiogénique. *In vitro*, il induit la migration des cellules endothéliales¹⁵⁶, alors qu'*in vivo*, il engendre le bourgeonnement de nouveaux vaisseaux sanguins¹⁵⁷. L'angiogenèse observée est, entre autre, attribuable à la modulation PAF-dépendante des propriétés d'adhérence des cellules endothéliales. L'augmentation de l'adhérence des plaquettes et de la translocation des leucocytes à travers la barrière endothéliale permet la libération directe d'une grande variété de médiateurs proangiogéniques. Toutefois, le PAF prend aussi part aux mécanismes induisant l'angiogenèse pathologique¹³³. Il est synthétisé et sécrété par de nombreuses lignées de cellules tumorales. Le PAF ainsi sécrété dans l'environnement extracellulaire influence de façon paracrine les cellules endothéliales et tumorales et promeut le bourgeonnement de nouveaux vaisseaux, ce qui favorise la malignité des tumeurs¹³⁷. Plusieurs souches de cellules tumorales démontrent une forte expression du récepteur du PAF, ce qui suggère une action autocrine du PAF dans le développement tumoral¹⁵⁸⁻¹⁶⁰. De plus, *in vitro*, le PAF induit aussi la prolifération des cellules cancéreuses de l'endomètre (HEC-1A) et la migration des cellules de Kaposi^{161, 162}.

Néanmoins, malgré tous ces exemples démontrant le rôle positif du PAF dans les processus d'inflammation et d'angiogenèse certains mécanismes

cellulaires sont encore inconnus puisqu'on a observé, lors d'une étude effectuée à l'aide de souris « knock out » pour le récepteur du PAF (PAFR^{-/-}), une augmentation de l'angiogenèse dans un implant spongieux ¹⁶³. Ce résultat inattendu, a soulevé davantage de questions puisque l'implant spongieux du modèle de souris PAFR^{-/-}, a aussi démontré une diminution de l'accumulation des neutrophiles et macrophages et une augmentation des niveaux de chémokines proinflammatoires (keratinocyte-derived chemokine, chemokine monocyte chemoattractant protein1). Cette étude a confirmé l'effet pro-inflammatoire du PAF endogène et suggéré que l'inhibition de l'angiogenèse dans les souris sauvages (WT) puisse être « *leucocyte-dependent* » ce qui impliquerait des mécanismes de feedback négatifs.

1.3.7 Angiogenèse pathologique : Rôles du VEGF et du PAF

Le développement de certaines pathologies telles que les maladies rhumatismales, les rétinopathies diabétiques, l'athérosclérose, le psoriasis et bien d'autres, nécessite la formation de nouveaux vaisseaux sanguins ¹⁶⁴. Ces pathologies ont toutes une composante inflammatoire qui peut favoriser leur apparition ou leur développement et dont l'aspect vasculaire reflète l'implication de mécanismes d'angiogenèse pathologique. En effet, il est bien établi que la réponse inflammatoire et la réponse angiogénique participent mutuellement aux processus de l'un et de l'autre ^{73, 165}. Le remodelage vasculaire fait partie du processus angiogénique induit par l'inflammation.

Bien que plusieurs facteurs régulent l'angiogenèse, le VEGF, le plus puissant facteur angiogénique, est un des rares facteurs capables d'induire une augmentation de la perméabilité vasculaire ^{19, 21}. Notre laboratoire a démontré que l'augmentation de la perméabilité vasculaire induite par le VEGF-A₁₆₅ nécessitait la synthèse du PAF endothéliale ⁷⁹. Depuis, différentes études supportent aussi le rôle du PAF au sein des mécanismes angiogéniques induits par le VEGF. Tout

d'abord, il a été démontré, *in vitro*, que le PAF potentialise l'effet du VEGF en induisant la translocation de la P-sélectine et l'adhésion des neutrophiles aux cellules endothéliales ⁵⁸. De plus, ce qui a davantage appuyé notre hypothèse furent les travaux des groupes de Montrucchio (2000) et de Bussolatti (2000) effectués sur un modèle murin d'angiogenèse tridimensionnelle dans du matrigel. Le groupe de Montrucchio a démontré, *in vivo*, que les néovaisseaux induits par le VEGF étaient associés avec une synthèse locale de PAF. Ce phénomène pouvait d'ailleurs être inhibé par deux antagonistes différents des récepteurs du PAF, soit le WEB2170 et le CV3988 ¹⁶⁶. Le groupe de Bussolatti qui a utilisé des cellules tumorales dans le modèle de matrigel, a aussi démontré, *in vivo*, que le PAF synthétisé en réponse au VEGF amplifiait la formation de nouveaux vaisseaux sanguins dans les tumeurs ¹⁶⁷. Par conséquent, comme le PAF potentialise les effets délétères du VEGF au niveau de la vascularisation tumorale, il serait souhaitable d'approfondir nos connaissances des mécanismes par lesquels le VEGF induit la synthèse de PAF.

1.4 Signalisation intracellulaire

L'homéostasie cellulaire dans l'organisme dépend de la capacité des cellules à intégrer les signaux extracellulaires de façon adéquate. Les différents signaux extracellulaires, captés via les récepteurs, seront transformés en signaux intracellulaires et transmis, selon les cas, jusqu'au noyau, permettant ainsi à la cellule de s'adapter aux changements de son environnement. La perception des signaux extracellulaires emprunte des mécanismes de transduction qui entraînent la production de seconds messagers. Dans la majorité des cas, ces seconds messagers activent, directement ou non, une ou plusieurs protéines-kinases, enzyme phosphorylant des protéines. Celles-ci sont caractérisées par la présence d'un domaine catalytique assurant la même fonction, soit le transfert d'un groupement phosphate. De cette manière, les protéines-kinases régulent une très grande variété de fonctions cellulaires, ce qui explique qu'elles constituent la plus grande famille de gènes ayant autant de fonctions diverses. La conservation de ces différentes familles de protéine-kinases, autant chez la levure, les invertébrés et les mammifères, démontre l'importance du rôle de régulation exercée par celles-ci. Toutefois, un seul défaut dans ces voies de signalisation peut conduire à un dérèglement cellulaire. La perte de la capacité des cellules à répondre correctement aux signaux peut résulter en une inhibition ou une prolifération anarchique. Par exemple, une différenciation aberrante couplée à une incapacité à répondre aux signaux de mort cellulaire, l'apoptose, peut résulter en un phénotype tumoral ^{168, 169}.

1.4.1 Transmission du signal intracellulaire

La phosphorylation est le résultat d'un signal extracellulaire, véhiculé par des hormones, neurotransmetteurs ou facteurs de croissance, qui atteint l'espace intracellulaire via la transduction. La réaction de phosphorylation peut s'exercer sur toutes les protéines cellulaires; elle se forme plus souvent sur les fonctions

alcools de résidus sérine (Ser) et thréonine (Thr), mais aussi sur les résidus tyrosine (Tyr)¹⁷⁰. L'ajout de ces charges négatives entraîne une modification de la structure des protéines substrats, les faisant passer de la forme inactive à la forme active¹⁷¹. L'activation des protéines-kinases est transitoire, puisqu'il existe aussi les protéines-phosphatases dont le rôle est de rendre ces réactions réversibles, malgré que celles-ci puissent aussi être sous le contrôle d'inhibiteurs transitoires¹⁷². En général, les substrats portent plusieurs sites de phosphorylation et une première phosphorylation peut induire un changement de la conformation du substrat faisant apparaître un autre site pour une seconde protéine-kinase. Il existe aussi un état d'autophosphorylation des protéines-kinases, qui prolonge la durée de leur action même après la disparition de leur activateur.

1.4.2 Les voies MAP kinases

Les voies de transduction des MAP kinases sont communes à la signalisation des cellules eucaryotes et font parties des systèmes de régulation les plus répandus. Toutes les cellules eucaryotes possèdent différentes voies de signalisation intracellulaire composées de MAP kinases qui répondent spécifiquement à divers stimuli. Il existe trois principales familles de MAPK : ERK ou p42/44 MAPK (*extracellular signal-regulated kinase*), les SAPK (stress activated protein kinase) soit JNK (*Jun NH2-terminal kinase*) et p38 MAPK. Une quatrième famille de MAPK, moins connue, a aussi été identifiée et nommée BMK1 ou ERK5 (Big MAP kinase 1). Contrairement aux trois autres, la voie BMK1 peut être activée autant par des facteurs de croissance que de stress. Ces familles possèdent chacune des fonctions biologiques différentes (Figure 7).

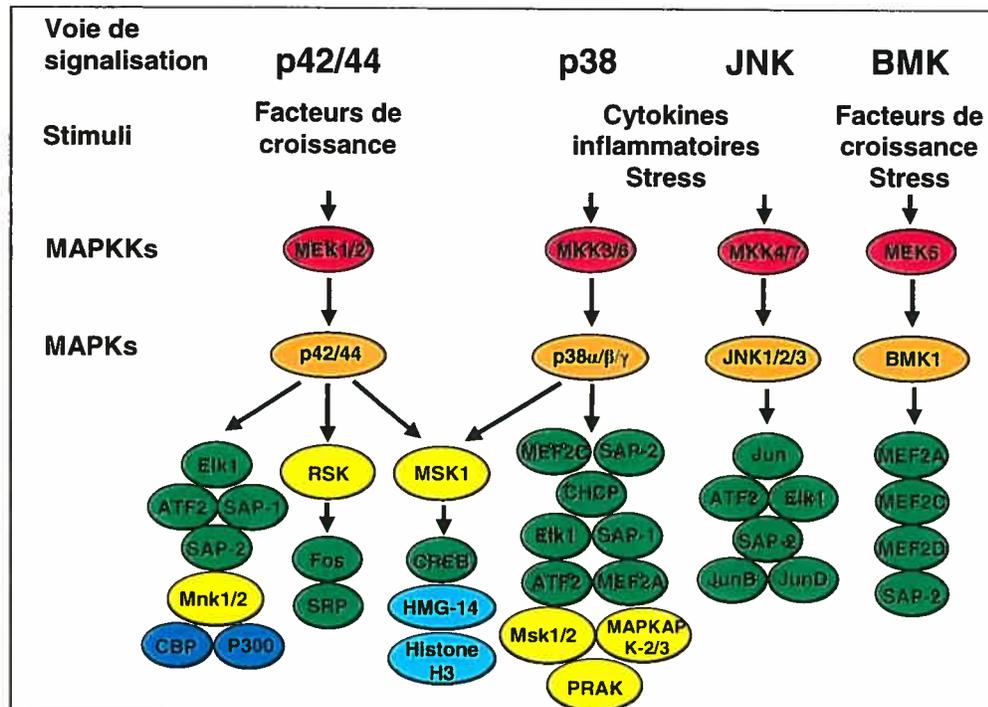


Figure 7 : Représentation schématique des voies MAPKs retrouvées chez les mammifères. Les principales familles de MAPKs : ERK ou p42/44 MAPK; p38 MAPK; JNK ; BMK. Signification du code de couleurs : rouge, MAPKKs; orange, MAPKs; jaune, kinases en aval; vert, facteurs de transcription ; bleu, protéines nucléosomales ; bleu foncé, corégulateurs. (Image adaptée de Edmunds et coll., Journal of Cell Sciences, 2004. 117: 3715-23)

Ces différentes voies intracellulaires sont toutes composées d'un module de MAP kinase lui-même activé par une GTPase. Ce module est constitué de trois niveaux de kinases successives et a pour but d'amplifier le signal, puisque la transmission de celui-ci ne se fait pas vers une seule protéine, mais bien vers plusieurs protéines (phénomène en forme de pyramide). Au premier niveau, on retrouve les *mitogen-activated-protein-kinase-kinase-kinases* (MAPKKK) régulées par une variété d'activateurs et d'inhibiteurs. Puis, au second niveau, on retrouve les MAPK-kinases (MKK ou MEK pour MAPK/ERK-kinases) phosphorylées par les MAPKKK. Les MKKs possèdent un motif conservé dans la boucle d'activation du sous-domaine kinase VIII, ce qui leur confère un premier degré de sélectivité. Enfin, au troisième niveau, on retrouve les MAPKinases qui sont phosphorylées par une kinase à double spécificité (Thr/Tyr), la MKK. Les MAPKs sont des

sérines/thréonines kinases qui possèdent également un motif, soit Thr-X-Tyr conservé dans la boucle d'activation du sous-domaine kinase VIII. L'identité du X dans ce motif détermine l'appartenance à une des familles. Ainsi, le motif Thr-Gly-Tyr fait référence aux kinases p38, le motif Thr-Glu-Tyr aux kinases ERK et le motif Thr-Pro-Tyr aux kinases JNK (Figure 8).

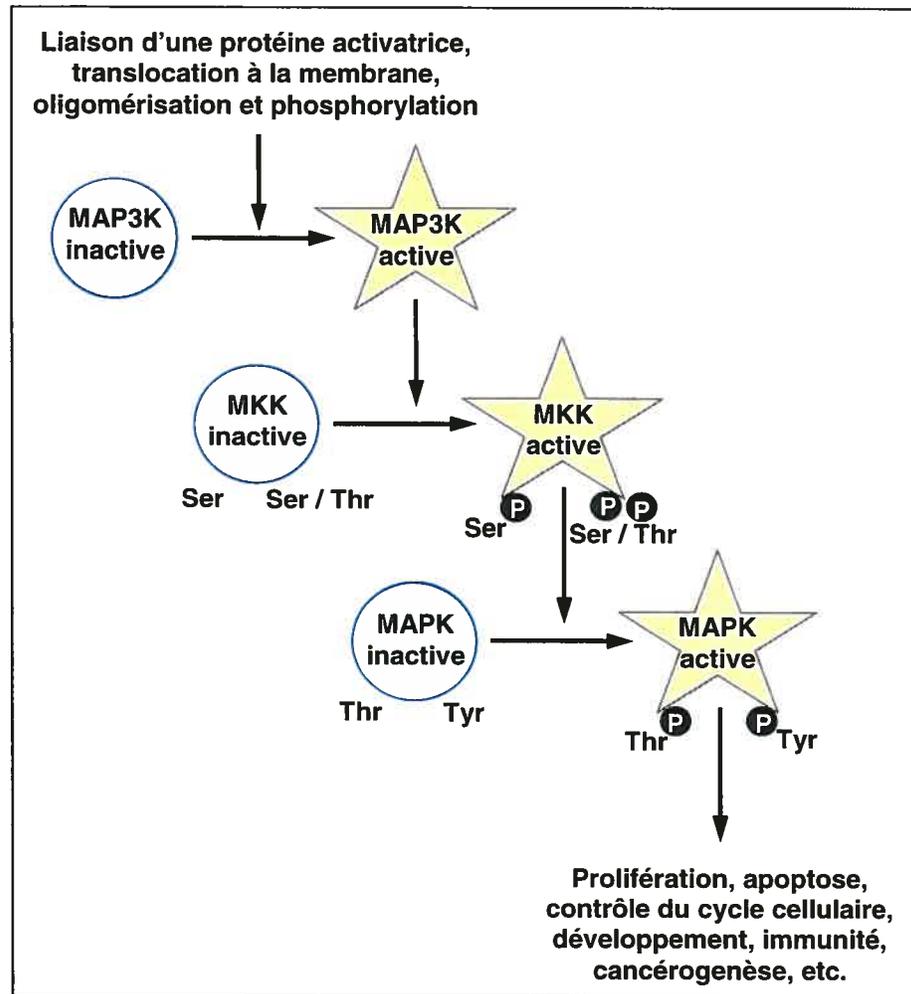


Figure 8 : Représentation schématique d'un module des MAPKs. La transmission du signal au niveau intracellulaire se fait via la réaction de phosphorylation qui active la protéine-kinase au premier niveau et transmet à la prochaine protéine-kinase d'un module spécifique constitué de trois niveaux de kinases successifs. (Image adaptée de Kyriakis et coll., *Physiology review*, 2001. 81: 807-869.)

Les MAPKs peuvent être activées par divers agonistes se liant à des récepteurs à activité tyrosine kinase, à des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines-G. Elles peuvent également être activées par les cytokines, ainsi que par des stress physiques ou chimiques. Les différentes voies de signalisation intracellulaires régulent plusieurs effets, entre autres, la prolifération et la migration cellulaire, l'apoptose, la transformation oncogénique, l'inflammation et la réponse immune. La réponse à un stimulus donné pourra varier selon le type et le contexte cellulaire. Les modules ont une organisation spatiale et temporelle dans la cellule. Cependant, les voies MAPKs ne sont ni rectilignes, ni hermétiques. Elles peuvent interagir avec d'autres voies « parallèles », ce qui est connu sous le nom de *cross-talk*.

De manière à être précis et concis dans la description des MAPKs et de leurs substrats, les prochaines sections porteront sur les protéines-kinases d'intérêts pour notre étude.

1.4.3 p42/44 MAPK

La voie de signalisation Ras-Raf1-MEK1/2-p42/44, est une des voie les mieux conservées au cours de l'évolution, ce qui explique qu'elle soit impliquée dans le maintien de plusieurs processus fondamentaux qui gouvernent la cellule tels que la prolifération, la survie, la différenciation, l'apoptose, la motilité et le métabolisme cellulaire ¹⁷³. Les isoformes p44 (Erk-1) et p42 (Erk-2), identiques à 83%, sont exprimées dans la majorité des tissus et cellules différenciées et dans les tissus où elles sont les plus abondantes, leur concentration ayant été estimée entre 100-500 nM ¹⁶⁹. La voie ERK/MAPK est activée par une panoplie de stimuli extracellulaires transmis aussi bien via les récepteurs à activité tyrosine kinase que via les récepteurs transmembranaires couplés aux protéines G et les intégrines. L'activation des récepteurs déclenche en cascade le module de signalisation Ras-Raf-1-MEK-1/2-p42/44 ¹⁷⁴. Plusieurs substrats ont été identifiés, dont les protéines

kinases, p90rsk¹⁷⁵, MSK1¹⁷⁶, MNK1/2¹⁷⁷, MCLK (*myosin light chain kinase*)¹⁷⁸ et FAK¹⁷⁹, la protéase calpaine¹⁸⁰, la paxiline¹⁸¹, ainsi que les nombreux facteurs de transcription et protéines nucléaires.

1.4.4 p38 MAPK

La voie p38 est fortement activée par les stress (lumière UV, choc thermique et osmotique, stress oxydatif), les cytokines inflammatoires (TNF, IL-1, LPS), et divers facteur de croissance comme le VEGF^{168, 182}. L'appellation SAPK2 (*Stress activated protein kinase*) se rapporte aux isoformes α et β de la protéine p38. La famille inclut également les kinases p38 γ (SAPK3) et p38 δ (SAPK4). La MAPK p38 est activée par deux MKKs, soit MKK3 et MKK6. MKK6 active toutes les isoformes de p38, tandis que MKK3 active les isoformes α , γ et δ . En amont, la cascade complète activant la p38 débute au niveau des MAPKKKs incluant la MLK3, DLK et la TAK1, qui phosphorylent et activent la MKK3 et la MKK6, qui à leur tour phosphorylent et activent la p38 MAPK (pour revue voir Chen et coll., 2001)¹⁶⁹.

En général, la voie de signalisation p38 MAPK est impliquée dans la réponse inflammatoire, l'hypertrophie des cardiomyocytes, la migration, la différenciation cellulaire, l'induction de l'expression de cytokines et de molécules d'adhérence et dans la régulation de l'apoptose¹⁶⁹. Cette cascade d'activation joue également un rôle, de concert avec la kinase FAK, dans la migration des cellules endothéliales induite par le VEGF, une étape importante de l'angiogenèse

1.4.5 MSK1: Mitogen-and stress-activated protein kinase

Récemment identifiée, la *mitogen-and stress-activated protein kinase* (MSK1) et son isoforme la MSK2, sont deux sérine/thréonine protéines-kinases identiques à 75% exprimées dans la majorité des tissus ¹⁷⁶. Les MSKs appartiennent à la famille des AGC kinases dont fait partie la sous-famille des *p90 ribosomal S6 kinase* (RSK) caractérisées par la présence de deux domaines kinases à l'intérieur d'un même polypeptide ^{176, 184}. La composition du domaine kinase en N-terminale de la MSK1 est similaire à celui des membres de la famille des AGC regroupant les protéines kinases (PK) PKA, *protein kinase C-related kinase* (PRK) et PKG, tandis que la composition du domaine kinase en C-terminale est homologue à celui de la famille des *calmodulin-activated protein kinase* (CAMK) ¹⁸⁵. Toutefois, les MSKs se distinguent des RSKs puisqu'elles ne sont pas activées par la *3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1* (PDK) ¹⁸⁶. De plus, dans la séquence protéique des MSKs, on retrouve la présence d'un signal bipartite de localisation nucléaire qui n'a pas été conservé chez les RSKs. Il est à noter que notre étude ne portera que sur la MSK1, bien que plusieurs des caractéristiques décrites s'appliquent aux deux isoformes.

Tel que supposé par son nom, la MSK1 peut à la fois être activée par la p38 MAPK, via des signaux de stress, tels que le phorbol ester 12-O-tetradeconyl-phorbol-13-acetate (TPA), les rayons UV, le stress oxydatif et les cytokines proinflammatoires et par la p42/44 MAPK, via une variété de signaux mitogéniques extracellulaires incluant les facteurs de croissance ^{176, 187, 188}. La MSK1 peut donc être activée par deux des grandes voies classiques de la signalisation intracellulaire, puisqu'elle possède un domaine d'ancrage en position C-terminale à l'extrémité de son domaine kinase et dont la séquence est spécifique pour la liaison à la fois de la p38 et de la p42/44 MAPK ¹⁸⁹.

La MSK1 possède une structure particulière composée de deux domaines kinases, séparés par une région de liaison, un domaine hydrophobique et un site d'ancrage, sur lesquels sont répartis plusieurs différents sites de phosphorylation. Une récente étude a démontré que les résidus thréonine⁵⁸¹ (Thr⁵⁸¹) et sérine³⁶⁰ (Ser³⁶⁰) suivis de résidus proline, sont spécifiquement phosphorylés par les MAPKs, tandis que les six autres résidus, soient les : Ser²¹², Ser³⁷⁶, Ser³⁸¹, Ser⁷⁵⁰, Ser⁷⁵² et Ser⁷⁵⁸ possèdent la capacité de s'autophosphoryler¹⁸⁹ (Figure 9). La MSK1 se distingue aussi par un processus d'activation se déroulant par étapes, décrit ci-dessous (notez que les sites de phosphorylation mentionnés dans la description faite par le groupe de McCoy font référence à ceux retrouvés dans la séquence humaine de la protéine MSK1).

Dans un premier temps, il y a recrutement de la p38 MAPK et/ou de la p42/44 MAPK, selon l'agoniste (1), ceux-ci vont spécifiquement phosphoryler les résidus suivis de proline, soit la Thr⁵⁸¹ dans la boucle active du domaine kinase en C-terminale et la Ser³⁶⁰ dans la région de liaison (2).

Par la suite, cet événement va activer le domaine kinase en C-terminale et mener à l'autophosphorylation de la Ser³⁷⁶ située dans le motif hydrophobique de la région de liaison et induire un changement de conformation intramoléculaire (3).

Cette conformation va promouvoir la phosphorylation de la Ser²¹² dans la boucle active du domaine kinase en N-terminale (4). (l'autophosphorylation des résidus Ser³⁸⁰, Ser⁷⁵⁰, Ser⁷⁵² et Ser⁷⁵⁸ se produit par la suite, mais n'est pas très bien détaillée).

Finalement, ces différents événements mènent à l'activité kinase de la MSK1 ce qui lui permet de phosphoryler ses substrats, par exemple le facteur de transcription CREB (5).

Différentes études mentionnent que l'intégrale de ces événements induit un changement de conformation de la MSK1^{189, 190}, ce qui confère à l'enzyme sa pleine activité catalytique. Il a été démontré par plusieurs groupes que l'activation d'un seul des deux domaines kinases ne permet pas d'atteindre la pleine activité catalytique de la MSK1, ce qui prévient la phosphorylation de son substrat CREB (*cAMP-element-response binding protein*)^{176, 191, 192} (Figure 9).

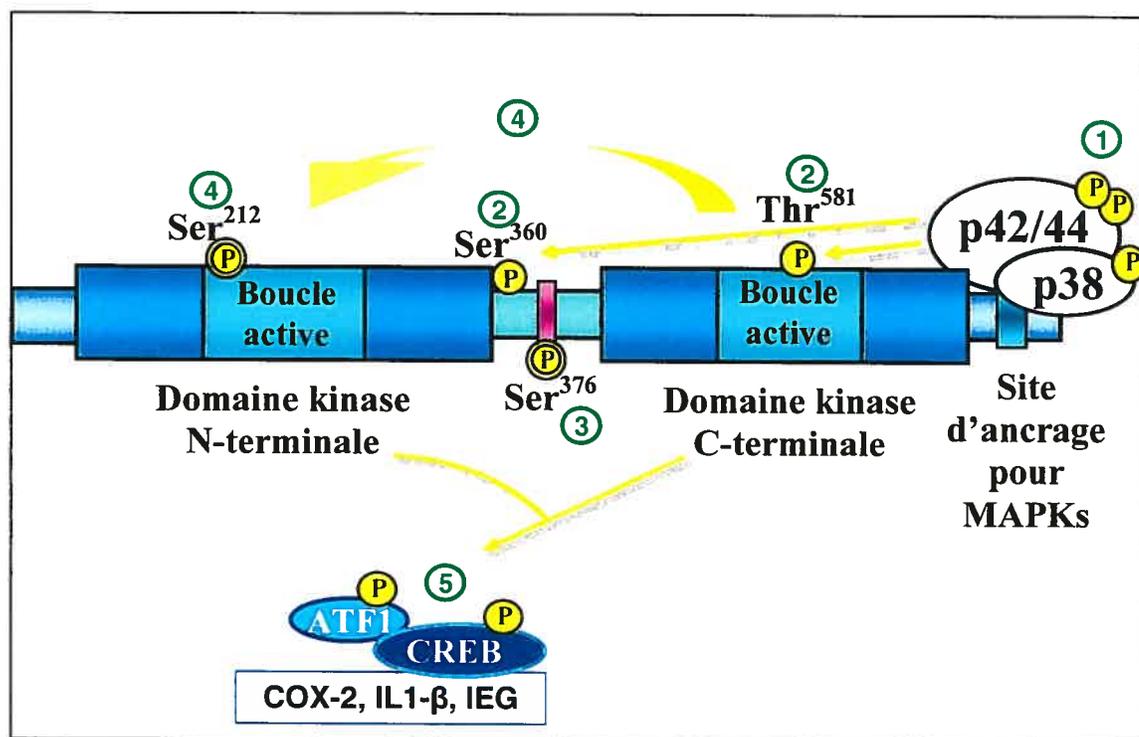


Figure 9 : Représentation schématique de la MSK1. Mécanismes d'activation en séquence de la MSK1. La phosphorylation induite par les MAPKs est représentée par un cercle et l'autophosphorylation par un double cercle. (Image adaptée de Dunn et coll., *Biochemistry of Cellular Biology*, 2005. 83: 1-14)

Selon le type cellulaire et l'agoniste, l'activation par la voie p38 MAPK ou par la voie p42/44 MAPK serait suffisante pour induire l'activation maximale de la MSK1¹⁷⁶. Ceci peut s'expliquer par le fait que les MAPKs ont la particularité de phosphoryler leurs substrats spécifiquement sur des résidus sérine ou thréonine suivis de proline, les p38 et p42/44 MAPKs peuvent donc phosphoryler les mêmes

sites sur un substrat commun. Dans le cas de la MSK1, une récente étude a démontré que c'est davantage la phosphorylation du résidu Thr⁵⁸¹ que celle du résidu Ser³⁶⁰ qui est essentielle pour l'avènement de l'activité catalytique de la MSK1¹⁸⁹.

En général, la MSK1 est localisée en permanence dans le noyau de différents types cellulaires, de par la présence d'un signal bipartite de localisation nucléaire dans la séquence protéique¹⁷⁶. La densité de la MSK1 dans le compartiment nucléaire est de 12 à 30 fois plus élevée que dans le cytoplasme, et ce, même suite à une stimulation par un agoniste¹⁷⁶. La localisation prédominante de la MSK1 dans le noyau explique qu'une grande proportion des substrats observés soient des facteurs de transcription. Toutefois, une récente étude a démontré que la MSK1 est aussi retrouvée dans des granules enrichies en cavéoline-3¹⁹³.

La réponse inflammatoire induite par le VEGF active différents mécanismes intracellulaires. La MSK1 est aussi impliquée dans certains processus inflammatoires. Par exemple, la MSK1 phosphoryle la sous-unité p65 de NF-kappaB et active l'expression d'une variété de gènes impliqués dans la réponse immune et inflammatoire¹⁹⁴. D'autre part, la phosphorylation de CREB par la MSK1 permet sa liaison à la séquence CRE (*cAMP-element-response*) présente dans le promoteur des gènes IL-1B et COX-2, ce qui induit leur transcription et mène à la synthèse de médiateurs inflammatoires¹⁸⁸. Par ailleurs, de plus en plus d'études démontrent que la cPLA₂ serait un substrat de la MSK1^{127, 195, 196} menant à la relâche d'acide arachidonique, le principal substrat dans la synthèse de médiateurs inflammatoires. Comme les voies de signalisation de la p38 et de la p42/44 MAPK régulent différentes activités biologiques et que la MSK1 est activée par une variété d'agonistes qui activent ces deux voies, ses substrats seront donc très variés, ce qui lui attribue un rôle au sein de plusieurs cascades d'activation ayant différentes fonctions biologiques (Tableau II).

Tableau II : Substrats de la MSK1

Substrat	Site(s) phosphorylé(s)	Fonction ou lien proposé	Références
CREB/ATF1	Ser ¹³³ / Ser ⁶³	Activation de l'activité transcriptionnelle ^{187, 197}	Wiggin et al. 2002 Arthur et Cohen 2000
Histone H3	Ser ¹⁰ / Ser ²⁸	Induction des immediate-early genes (IEG): c-fos, c-jun, c-myc ^{198, 199}	Thomson et al., 1999
HMG-14	Ser ⁶ / Ser ²⁰ / Ser ²⁴		Solaga et al., 2003
Histone H2A	Ser ¹	Inhibe la synthèse d'ARN (traduction) ²⁰⁰	Zhang et al., 2004
ER81	Ser ¹⁹¹ / Ser ²¹⁶	Régule la transcription induite par ER81 via la stimulation CBP/300 ²⁰¹	Janknecht 2003
4E-BP1	Ser ⁶⁴	Dissociation avec eIF-4F, donc activation de la traduction ²⁰²	Liu et al., 2002
STAT1 & STAT3	Ser ⁷²⁷	Activation de l'activité transcriptionnelle ^{203, 204}	Zhang et al., 2004
	Ser ⁷²⁷		Zhang et al., 2001
p65 NF-κB	Ser ²⁷⁶	Activation de l'activité transcriptionnelle ¹⁹⁴	Vermeulen et al., 2003
cPLA ₂	Ser ⁷²⁷	Phosphorylation démontrée <i>in vitro</i> par spectrométrie de masse ¹²⁷	Hefner et al., 2000
		Synchronisation temporelle de l'activité de la MSK1 et de la translocation de la cPLA ₂ ¹⁹⁵	Markou et al., 2003
		Translocation de la cPLA ₂ dans granules enrichies en cavéolines-3 et interaction avec MSK1 ¹⁹³	Ait-Mamar et al., 2005
Akt (PKB)	Thr ³⁰⁸ / Ser ⁴⁷³	Activation de Akt par UVB via MSK1 ²⁰⁵	Nomura et al., 2001

1.5 Problématique

Les travaux du docteur Sirois et de son équipe ont permis de démontrer, que l'augmentation de la perméabilité vasculaire induite par le VEGF-A₁₆₅ nécessitait la synthèse du PAF par les cellules endothéliales ⁷⁹. Cet énoncé est supporté par la capacité des cellules endothéliales à induire la synthèse de PAF suite à une stimulation au VEGF-A₁₆₅. Au cours des dernières années, notre laboratoire a démontré que cette synthèse résultait de l'activation du complexe VEGFR-2/NRP-1, de même que celle des voies p42/44 et p38 MAPKs ¹⁴⁵. La synthèse du PAF induite par le VEGF dans les cellules endothéliales, se fait via la voie de remodelage des phospholipides qui nécessite l'activation spécifique la sPLA₂-V ¹⁵², initiant la conversion des phospholipides en lyso-PAF ainsi que l'activation de la lyso-PAF-AT qui acétyle le lyso-PAF pour former le PAF. Bien que les enzymes responsables de la voie de remodelage des phospholipides aient été identifiées, leur régulation dans les cellules endothéliales est encore inconnue.

Comme l'activation des MAPKs est nécessaire à l'induction de la synthèse du PAF et que l'enzyme lyso-PAF AT est activée par la p38 MAPK ¹⁵¹, nous supposons que les MAPKs pourraient activer directement ou indirectement la sPLA₂-V. Toutefois, les mécanismes intracellulaires en aval des MAPKs, qui régulent l'activation de la sPLA₂-V menant à la synthèse de PAF, sont inconnus. Ainsi, nous avons émis l'hypothèse que la MSK1, une enzyme dont l'activation par les p38 et p42/44 MAPKs est rapide et transitoire ¹⁷⁶, pourrait être impliquée dans la signalisation intracellulaire menant à la synthèse de PAF induite par le VEGF-A₁₆₅.

1.6 But du travail de recherche

L'identification des enzymes présentes dans la voie de signalisation menant à la synthèse du PAF induite par le VEGF-A₁₆₅ et des interactions protéiques entre les MAPKs et la sPLA₂-V, apportera une plus grande compréhension des événements gouvernant leur régulation. La MSK1 est une enzyme intéressante à notre étude, puisqu'elle possède un profil d'activation qui est rapide et transitoire, suite à l'activation de la p38 et/ou de la p42/44 selon l'agoniste. De plus, comme le VEGF a la capacité d'activer la MSK1, nous avons donc voulu déterminer si cette kinase pouvait être impliquée dans la signalisation menant à la synthèse du PAF induite par le VEGF-A₁₆₅.

Nous avons tout d'abord confirmé la présence et la phosphorylation de la MSK1 par le VEGF-A₁₆₅ dans notre modèle de cellules endothéliales d'aorte bovine (BAEC). Ensuite, de manière à vérifier son implication dans la voie de signalisation menant à la synthèse de PAF par le VEGF-A₁₆₅, nous avons analysé la présence des protéines précipitant avec la MSK1. Afin d'évaluer le rôle de la MSK1 au niveau des différentes interactions protéiques détectées, nous avons effectué des transfections stables de BAEC exprimant la forme sauvage de la MSK1 (MSK1-WT) ou des formes mutées inactivant chacun des domaines kinases (mutation de l'acide aminé 195 en N-terminale (MSK1-D195A) et mutation de l'acide aminé 565 en C-terminale (MSK1-D565A)). Suite à la caractérisation des différents clones confirmant l'inactivation de leur domaine kinase, nous avons de nouveau analysé la présence des protéines précipitant avec la MSK1 et nous avons quantifié la synthèse de PAF induite par le VEGF-A₁₆₅. Les résultats obtenus démontrent le rôle essentiel du domaine kinase en C-terminale de la MSK1 dans l'interaction constitutive avec la sPLA₂-V qui est déterminante dans les événements menant à la synthèse du PAF induite par le VEGF-A₁₆₅.

2 ARTICLE

ACCORD DES COAUTEURS

Déclaration des coauteurs d'un article

1. Identification de l'étudiant et du programme

Marchand, Catherine
M.Sc. Pharmacologie (2-520-1-0)

2. Description de l'article

Ordre des auteurs : Marchand, C., Favier, J., et Sirois, MG.

Titre de l'article : Role of MSK1 in the signaling pathway leading to VEGF-mediated PAF synthesis in endothelial cells

Revue de soumission proposée : Journal of cell physiology

État actuel de l'article : Soumis pour publication dans la revue Journal of cell physiology le 24 novembre 2005.

3. Déclaration de tous les coauteurs autres que l'étudiant

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Catherine Marchand inclue cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre *Rôle de MSK1 dans la signalisation intracellulaire menant à la synthèse du PAF induite par le VEGF.*

Dr Judith Favier

Dr Martin G. Sirois

15 Dec 2005



2005-12-27 11:00

De : jcb@umassmed.edu
Pour : [REDACTED]
cc :
Objet : Accept - Journal of Cellular Biochemistry - JCB-05-0588

Date: 27 Dec 05
Ref.: JCB-05-0588

Dear Dr. Sirois:

I am pleased to inform you that your manuscript, "ROLE OF MSK1 IN THE SIGNALING PATHWAY LEADING TO VEGF-MEDIATED PAF SYNTHESIS IN ENDOTHELIAL CELLS", is acceptable for publication in Journal of Cellular Biochemistry.

If you have not already done so, please mail two (2) complete printed hard copies of the accepted manuscript along with a disk(s) containing separate files for text & figures, permissions, and a signed copyright transfer agreement to our office as soon as possible:

Dr. Gary Stein
Dr. Gary S. Stein
Department of Cell Biology
University of Massachusetts Medical School
55 Lake Ave. N.
Worcester, MA 01655

Please feel free to contact our editorial office if you have any questions about this process. For the copyright transfer agreement, or if you are unsure about formatting, please consult the instructions to authors that are given under the "Instructions and Forms" button at the upper left-hand corner of the sign in screen for the Journal of Cellular Biochemistry website. Thank you for submitting your work to Journal of Cellular Biochemistry. I look forward to seeing more of your work in the future.

Sincerely,

Dr. Gary Stein
Executive Editor
Journal of Cellular Biochemistry

Dr. Gary S. Stein
Department of Cell Biology
University of Massachusetts Medical School
55 Lake Ave. N.
Worcester, MA 01655

-

**ROLE OF MSK1 IN THE SIGNALING PATHWAY
LEADING TO VEGF-MEDIATED PAF SYNTHESIS IN ENDOTHELIAL CELLS**

Catherine MARCHAND¹⁻², Judith FAVIER¹⁻² and Martin G. SIROIS^{1-2*}

Research Center, Montreal Heart Institute¹,
Department of pharmacology², Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada

Running Title: MSK1 in PAF synthesis.

Keywords: MSK1, VEGF, PAF, sPLA₂-V, inflammation, angiogenesis

Dr. Sirois is recipient of a scholarship from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) and this work was supported in part by a grant from the CIHR (MOP-43919).

Dr. Favier is recipient of a fellowship from the Fondation Simone et Cino del Duca and from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec.

*Correspondence should be addressed to:

Martin G. Sirois, PhD
Montreal Heart Institute
5000, Belanger Street
Montreal, Quebec, Canada, H1T 1C8
Phone: (514) 376-3330 (ext: 3583)
FAX: (514) 376-1355
E-mail: [REDACTED]

2.1 Summary

Vascular endothelial growth factor (VEGF) inflammatory effects require acute platelet-activating factor (PAF) synthesis by endothelial cells (EC). We previously reported that VEGF-mediated PAF synthesis involves the activation of VEGF receptor-2/Neuropilin-1 complex, which is leading to the activation of p38 and p42/44 mitogen-activated protein kinases (MAPKs) and group V secretory phospholipase A₂ (sPLA₂-V). As the mechanisms regulating sPLA₂-V remain unknown, we addressed the role of the mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1), which can be rapidly and transiently activated by p38 or p42/44 MAPKs. In native bovine aortic endothelial cells (BAEC), we observed a constitutive protein interaction of MSK1 with p38, p42/44 MAPKs and sPLA₂-V. These protein interactions were maintained in BAEC transfected either with the empty vector pCDNA3.1, wild-type MSK1 (MSK1-WT) or N-terminal dead kinase MSK1 mutant (MSK1-D195A). However, in BAEC expressing C-terminal dead kinase MSK1 mutant (MSK1-D565A), the interaction between MSK1 and sPLA₂-V was reduced by 82% and 90% under basal and VEGF-treated conditions as compared to native BAEC. Treatment with VEGF for 15 minutes increased basal PAF synthesis in native BAEC, pCDNA3.1, MSK1-WT and MSK1-D195A by 166%, 139%, 125% and 82% respectively. In contrast, PAF synthesis was prevented in cells expressing MSK1-D565A mutant. These results demonstrate the essential role of the C-terminal domain of MSK1 for its constitutive interaction with sPLA₂-V, which appears essential to support VEGF-mediated PAF synthesis.

2.2 Introduction

Pathological angiogenesis is associated with many inflammatory conditions such as atherosclerosis, cancer, rheumatoid arthritis, psoriasis, and proliferative retinopathies (Neufeld et al., 1999). Different studies have shown that inflammation exists in a mutually dependent association with angiogenesis (Ferrara and Davis-Smyth, 1997; Forsythe et al., 1996). Vascular endothelial growth factor (VEGF) is one of the most potent angiogenic molecule displaying strong inflammatory properties (Connolly et al., 1989; Dvorak et al., 1995). We have previously demonstrated that the acute increase in vascular permeability produced by VEGF is mediated through the synthesis of a powerful phospholipid inflammatory mediator, platelet-activating factor (PAF) by the endothelium (Sirois and Edelman, 1997). Since then, it has been shown that PAF is involved in pathological angiogenesis and promotes VEGF angiogenic activity (Bussolino and Camussi, 1995; Montrucchio et al., 2000). PAF is synthesized either by the remodeling or by the *de novo* pathway. The remodeling pathway is the principal mechanism leading to PAF synthesis when endothelial cells (EC) are stimulated by proinflammatory mediators. Briefly, membrane phospholipids are hydrolyzed and converted into lyso-PAF by phospholipase A₂ (PLA₂) and subsequently acetylated by acetyl-CoA: lyso-PAF acetyltransferase (lyso-PAF AT) into PAF (Bussolino and Camussi, 1995; Snyder et al., 1996).

Ongoing studies in our laboratory have investigated the cell signaling mechanisms leading to endothelial PAF synthesis following VEGF stimulation. We reported that activation of VEGF receptor-2/neuropilin-1 complex (VEGFR-2/NRP1) by VEGF promotes the intracellular activation of both p38 and p42/44 mitogen-activated protein kinases (MAPKs), as well as group V secretory phospholipase A₂ (sPLA₂-V), which together, are essential to endothelial PAF synthesis (Bernatchez et al., 2001; Bernatchez et al., 2002; Bernatchez et al.,

1999; Bernatchez et al., 2001). However, the intracellular mechanism following the activation of both p38 and p42/44 MAPK pathways and the relation with the newly identified sPLA₂-V are unknown. To further elucidate the interactions between these three key enzymes, we sought to investigate the role of a kinase downstream to the p38 and p42/44 MAPK pathways: the mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1).

As implied by its name, MSK1 is activated by a variety of extracellular signals including phorbol esters and growth factors through p42/44 MAPK activation, and by stimuli such as UV radiation, and proinflammatory cytokines through p38 MAPK activation (Deak et al., 1998; Dunn et al., 2005). MSK1 belongs to the RSK protein kinase family, characterized by two kinase domains, joined by a short linker region, in a single polypeptide (Deak et al., 1998; Pierrat et al., 1998). The N-terminal kinase domain of MSK1 is similar to that of members of the AGC family of protein kinases (PK) including PKA, PKC and PKG, whereas the C-terminal kinase domain is homologous to the calmodulin-activated protein kinase family (Frodin et al., 2002). This particular protein structure implies a complex regulation occurring in a sequential manner, which is a rate-limiting step. MSK1 is regulated by multiple phosphorylation sites and its activation requires a specific docking site for p38 and p42/44 MAPKs localized at the C-terminal end (McCoy et al., 2005). Depending on the agonist, activation of p38 or p42/44 MAPKs leads to a first series of MSK1 phosphorylation, activating the C-terminal kinase domain and leading to subsequent autophosphorylation of N-terminal kinase domain (Dunn et al., 2005; McCoy et al., 2005). Together, these events allow the full catalytic activity of MSK1 needed for downstream substrate phosphorylation. In addition, since MSK1 can be activated upon stimulation of endothelial cells with VEGF (Mayo et al., 2001), and that MSK1 can promote the phosphorylation of cytosolic phospholipase A₂ (cPLA₂) (Hefner et al., 2000), we were led to suggest that MSK1 might be involved in VEGF-mediated PAF synthesis.

In this study, we investigated the role of MSK1 in the signal transduction pathway leading to endothelial PAF synthesis induced by stimulation with VEGF. We report a constitutive protein interaction between MSK1 and sPLA₂-V, which appears to be specific to the C-terminal kinase domain of MSK1 and essential to VEGF-mediated PAF synthesis.

2.3 Material & Methods

Chemicals

All chemicals were purchased from Sigma (St-Louis, MO) or J.T. Baker (Philipsburg, NJ). Human VEGF-A₁₆₅ (referred as VEGF) was purchased from PeproTech (Rocky Hill, NJ). SB203580 and PD98059 were purchased from Calbiochem (La Jolla, CA).

Cell culture

Bovine aortic endothelial cells (BAEC) were isolated from freshly harvested aortas, cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Invitrogen, Pickering, ON, Canada) supplemented with 5% fetal bovine serum (FBS; Medicorp Inc., Montreal, QC, Canada), and 1% antibiotics, penicillin and streptomycin (Invitrogen). BAEC were characterized by their cobblestone monolayer morphology and were maintained until passage 12.

Vector constructions

cDNA encoding wild-type MSK1 (MSK1-WT), its N-terminal kinase-dead domain mutant (D195A) and the C-terminal kinase-dead domain mutant (D565A) cloned in pCMV5-FLAG were developed by Drs. Maria Deak and Dario Alessi (Deak et al., 1998) and purchased from University of Dundee, UK. Plasmids were purified and WT or mutants Flag-MSK1 cDNA fragments were recovered by EcoRI – XbaI digestion and subcloned into pCDNA3.1 vector (Invitrogen). Plasmids were amplified using the EndoFree plasmid Maxi kit as described by the manufacturer (Qiagen, Mississauga, ON, Canada).

Stable transfections

BAEC were transfected either with the empty pCDNA3.1 plasmid, or with one of the expression vectors (MSK1-WT, MSK1-D195A, MSK1-D565A) using Lipofectin transfection reagent (Invitrogen), under the conditions described by the manufacturer. Transfected cells having integrated the plasmid, which contains neomycin gene resistance, were selected upon a treatment with preestablished G418 concentration (500 µg/mL; Geneticin; Invitrogen), and the cells cloned by a limiting dilution method.

RT-PCR

Total RNAs were isolated using the RNeasy extraction kit (Qiagen). One microgram (µg) of total RNAs was reverse transcribed using random hexamers and the MMLV reverse transcriptase (Invitrogen) as described by the manufacturer. The PCR reactions were performed as follows: cDNAs were denatured (94°C for 5 minutes), submitted to 33 cycles of amplification (94°C for 45 seconds, primer annealing 50°C for 1 minute and 72°C for 1 minute) and to a final elongation (72°C for 10 minutes). FLAG-MSK1 cDNA was amplified using a forward primer generated against the FLAG DYKDDDDK epitope (5'-GGACTACAAGGACGACGATGAC-3') and a reverse primer specific for human MSK1 (5'-CCCCAACTTGTGGAGATGTTC-3'). Amplification of bovine β-actin was used as a positive control for cDNA quality using the following primers: forward 5'-CTCGTGGTCGACAACGGC-3' and reverse 5'-CTTCTCACGGTTGGCCTTG-3'.

Immunoprecipitation and Western blot analysis of MSK1 phosphorylation

Confluent BAEC (100 mm tissue culture plate) were serum starved for 18 hours in DMEM, then stimulated with VEGF (1 nM) for various periods of time. In another set of experiments, BAEC were pretreated with p38 MAPK inhibitor (SB203580) or/and MEK inhibitor (PD98059), 20 minutes prior to stimulation with VEGF (1 nM, 15 minutes). After stimulation, cells were rinsed with ice-cold DMEM containing

Na_3VO_4 (1 mM) and lysed with ice-cold RIPA lysis buffer (NP-40 1%, sodium phosphate 50 mM: pH 7.2, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, NaF 50 mM, SDS 0.1%, sodium deoxycholate 0.5%, PMSF 1 mM, benzamidine 10 mg/mL, leupeptin 5 mg/mL, trypsin inhibitor 5 mg/mL and microcystin LR 1 mM). Cell lysate was clarified by centrifugation, and supernatant protein concentration determined using a protein assay kit (Bio-Rad, Hercules, CA). Total proteins (1.2 mg) were immunoprecipitated with a goat polyclonal anti-human MSK1 IgG (Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA) coupled to protein G-coated sepharose beads (Amersham Pharmacia Biotech, Upsala, Sweden), separated on a 10% SDS-PAGE and transblotted onto a PVDF membrane (Millipore, Bedford, MA). Membranes were blocked in TTBS containing 5% BSA for 1 hour at room temperature, probed with three independent rabbit polyclonal anti-human phospho-MSK1 (Ser³⁶⁰), (Ser³⁷⁶) or (Thr⁵⁸¹) IgGs (dilution 1:500; New England Biolabs, Pickering, ON, Canada) overnight, and incubated with a secondary goat anti-rabbit IgG coupled to horseradish peroxidase. Afterward, membranes were stripped and reprobed with a rabbit polyclonal anti-human MSK1 IgG (dilution 1:1 000) to visualize corresponding total protein expression. Immunoreactive bands were visualized using LumiGlo™ (New England Biolabs). The density of the bands was determined using Quantity One software (Bio-Rad, Mississauga, ON, Canada).

Western blot analysis of MSK1-interacting proteins

Confluent native and transfected BAEC were treated as described above and stimulated with VEGF (1 nM, 15 minutes). MSK1 precipitation samples and SDS-PAGE were performed as described above to detect the proteins interacting with MSK1. The immunoblots were analyzed in parallel with the respective antibodies: rabbit polyclonal anti-human MSK1 IgG (dilution 1:500; Sigma), rabbit polyclonal anti-mouse p38 MAPK IgG (1:1 000; Santa Cruz Biotechnologies), rabbit polyclonal anti-rat p42/44 MAPK IgG (1:1 000; New England Biolabs) and mouse monoclonal anti-human sPLA₂-V IgG (1:300; Cayman, Ann Arbor, MI). Blots were

then treated with secondary peroxidase-conjugated goat anti-rabbit (1:5 000) or anti-mouse (1:1 000) IgGs.

Western blot analysis of CREB phosphorylation

Confluent native and transfected BAEC were stimulated with VEGF (1 nM, 15 minutes). Supernatant proteins were prepared as described above and 75 µg of total proteins were used for Western blotting. The immunoblots were analyzed with a rabbit polyclonal anti-human phospho-CREB (Ser¹³³) IgG (dilution 1: 500; New England Biolabs). Membranes were subsequently stripped and reprobed with a rabbit polyclonal anti-human CREB (dilution 1:1 000; New England Biolabs) to visualize corresponding total protein expression.

Measurement of PAF synthesis

PAF production in BAEC was measured by incorporation of ³H-acetate into lyso-PAF as described previously (Bernatchez et al., 1999; Sirois and Edelman, 1997). Briefly, confluent BAEC (6-well tissue culture plate) were rinsed, then stimulated for 15 minutes in 1 ml of HBSS/HEPES containing CaCl₂ (10 mM), ³H-acetate (25 µCi) (New England Nuclear, Boston, MA). The reaction was stopped by the addition of acidified methanol (50 mM acetic acid). Polar lipids were isolated by the Bligh and Dyer method (Bligh and Dyer, 1959), evaporated under a stream of N₂ gas and purified by a silica-based normal-phase HPLC column. Fractions corresponding to ³H-PAF were quantified by counting radioactivity with a β-counter. The authenticity of synthesized ³H-PAF was confirmed by the similar HPLC elution pattern as standard ³H-PAF (New England Nuclear).

Statistical analysis

Data are mean ± SEM. Comparisons were made by analysis of variance followed by an unpaired Bonferroni t-test. Differences were considered significant at P values less than 0.05.

2.4 Results

VEGF effect on MSK1 phosphorylation

In a first series of experiments, we assessed the capacity of VEGF to modulate the phosphorylation of MSK1 on Thr⁵⁸¹, Ser³⁷⁶ and Ser³⁶⁰ residues. Treatment of native BAEC with VEGF (1 nM) induced a rapid and transient phosphorylation of MSK1-Ser³⁷⁶ and -Thr⁵⁸¹ residues, which was maximal within 10-15 minutes as compared to control PBS-treated cells, and resumed toward its basal level within 30 minutes (Figure 1A). In contrast, we did not detect any phosphorylation of MSK1-Ser³⁶⁰ residue (data not shown).

Effect of MAPK inhibitors on MSK1 phosphorylation

In previous studies, we reported that VEGF induces endothelial PAF synthesis upon the activation of VEGFR-2/NRP-1 complex (Bernatchez et al., 2002), and the activation of both p38 and p42/44 MAPKs, and subsequent activation of sPLA₂-V (Bernatchez et al., 2001; Bernatchez et al., 2001). We thus assessed if the activation of MAPKs in response to VEGF were responsible for MSK1 phosphorylation. Pretreatment of BAEC, with p38 MAPK inhibitor SB203580 (10 μM; IC₅₀, 0.6 μM) (Cuenda et al., 1995), 20 minutes prior to the stimulation with VEGF, did not prevent MSK1-Ser³⁷⁶ and -Thr⁵⁸¹ phosphorylation. In contrast, pretreatment with MEK inhibitor PD98059 (10 μM; IC₅₀, 1 μM) (Dudley et al., 1995), which prevents p42/44 MAPK phosphorylation, completely blocked VEGF-mediated MSK1-Ser³⁷⁶ and -Thr⁵⁸¹ phosphorylation. Pretreatment with both MAPK inhibitors blocked VEGF-mediated MSK1-Ser³⁷⁶ and -Thr⁵⁸¹ phosphorylation as observed with the MEK inhibitor (PD98059) (Figure 1B).

Western blot analysis of proteins interacting with MSK1

In a second series of experiments, we assessed the capacity of MSK1 to interact with proteins involved in the signaling pathways leading to VEGF-mediated PAF synthesis. Native BAEC were stimulated with VEGF in a time-dependent assay and cell lysates were immunoprecipitated with an anti-MSK1 IgG. Western blot analyses were performed to identify the proteins coimmunoprecipitated with MSK1. We observed a constitutive interaction between MSK1 and p38 MAPK, p42/44 MAPK and sPLA₂-V, which was not modified by VEGF stimulation (Figure 2).

Establishment and characterization of transfected dead kinase mutants of MSK1

To clarify the role of each MSK1 N- and C-terminal kinase domains into the multi-protein complex interaction defined above, we performed stable transfections of BAEC with pCDNA3.1 plasmid expressing either the wild-type form of human MSK1 (MSK1-WT) or its N-terminal or C-terminal “dead-kinase” mutants (respectively MSK1-D195A and MSK1- D565A), all tagged with the Flag epitope (Deak et al., 1998). Control transfection was performed with the empty pCDNA3.1 vector. Transfection efficiency was assessed by RT-PCR, using one human-MSK1 specific primer and one primer corresponding to the Flag epitope, to avoid amplification of the bovine endogenous MSK1 transcript (Figure 3A).

The “dead-kinase” status of D195A and D565A MSK1 mutant forms was assessed by studying the capacity of VEGF to induce the phosphorylation of CREB (cAMP-response-element-binding protein), which requires both catalytically active MSK1 kinase domains (Arthur and Cohen, 2000; Arthur et al., 2004; Delghandi et al., 2005; Wiggin et al., 2002). Treatment with VEGF led to the phosphorylation of CREB (phospho-CREB-Ser¹³³) in native BAEC as well as in BAEC transfected with control pCDNA3.1 and WT-MSK1 (Figure 3B). However, in BAEC transfected with the MSK1-D195A and MSK1-D565A mutants, the phosphorylation of CREB was completely abolished (Figure 3B). It is to mention that due to the structural

similarities between CREB and ATF-1, the phospho-CREB IgG recognizes the phosphorylation site of ATF-1-Ser⁶³ residue (Shaywitz and Greenberg, 1999), which was detected after VEGF stimulation in native BAEC and transfected with control pCDNA3.1 and MSK1-WT, but not in BAEC transfected with MSK1-D195A and MSK1-D565A mutants (Figure 3B).

Effect of MSK1 dead kinase mutants on protein interactions

As described above, we observed, in native BAEC, a constitutive protein interaction between MSK1 with p38 and p42/44 MAPKs and sPLA₂-V. As MSK1 activation requires the activity of both kinase domains to induce the phosphorylation of its substrate CREB, we then assessed if the multi-protein complex would be affected in MSK1-D195A and MSK1-D565A mutants. The same MSK1 co-immunoprecipitation experiment was thus achieved in native and transfected BAEC. Western blot analysis revealed that the constitutive interaction between MSK1 with p38 and p42/44 MAPKs was maintained and unchanged under VEGF stimulation in all cell types (Figure 4). However, the coprecipitation of MSK1 with sPLA₂-V was almost completely abolished in BAEC transfected with the MSK1-D565A mutant, while it remained constitutive in native BAEC and in pCDNA3.1, MSK1-WT and MSK1-D195A transfected cells (Figure 4). The interaction between MSK1 and sPLA₂-V in MSK1-D565A transfected cells was reduced by 82% and 90% in PBS or VEGF-treated cells respectively (Figure 4).

Effect of MSK1 dead kinase mutants on PAF synthesis

Since the protein interaction between MSK1 and sPLA₂-V is altered in BAEC transfected with MSK1-D565A mutant, and in order to assess the possible contribution of MSK1 on PAF synthesis, we evaluated its synthesis in native and transfected BAEC. Treatment with VEGF increased basal PAF synthesis in native BAEC, pCDNA3.1, MSK1-WT and MSK1-D195A by 166%, 139%, 125% and 82% respectively as compared to their respective control-PBS treated cells. In contrast,

PAF synthesis mediated by VEGF was abrogated in BAEC transfected with MSK1-D565A mutant (Figure 5). To insure that the absence of VEGF-mediated PAF synthesis in MSK1-D565A transfected cells was not due either to the absence of VEGFR-2 protein expression or altered phosphorylating capacity, we performed Western blot analyses for all BAEC subtypes under PBS and VEGF-treatment. We observed between all endothelial subtypes an equivalent VEGF capacity to promote VEGFR-2 phosphorylation as well as its corresponding protein expression level (data not shown).

2.5 Discussion

We previously reported that VEGF-induced endothelial PAF synthesis requires the activation of p38 and p42/44 MAPKs and the secreted phospholipase A₂ group V (sPLA₂-V). However, the mechanisms involved in the regulation of sPLA₂-V remained unknown. In the present study, we are reporting a constitutive protein interaction between MSK1 and sPLA₂-V, which appears specific to the C-terminal kinase domain of MSK1 and essential for the induction of PAF synthesis.

VEGF mediates MSK1 phosphorylation

Parallel activation of p38 and p42/44 MAPK pathways is crucial to endothelial PAF synthesis (Bernatchez et al., 2001). In addition, both pathways can respectively activate MSK1 in response to growth factors and cellular stress stimuli (Deak et al., 1998; Dunn et al., 2005). Since MSK1 has recently been reported to be activated by VEGF (Mayo et al., 2001), we were led to assess its contribution in VEGF-mediated PAF synthesis.

Firstly, we observed that VEGF induced a rapid and transient MSK1 phosphorylation on two different residues (Ser³⁷⁶ and Thr⁵⁸¹). These data are in agreement with previous studies, in which a similar MSK1 kinetic activation was observed upon stimulation of different cell types (Hela, SK-N-MC, PC12, cardiac myocytes and embryonic rat cortical cells) with various agonists including tumor necrosis factor, fibroblast growth factor, neuronal growth factor, endothelin-1, N-methyl-D-Aspartate and brain-derived neurotrophic factor (Deak et al., 1998; Markou and Lazou, 2002; Rakhit et al., 2005). It has recently been defined that Thr⁵⁸¹ residue in the MSK1 C-terminal kinase domain is a proline-directed site, which can be phosphorylated either by p38 or p42/44 MAPKs (McCoy et al., 2005). Phosphorylation of Thr⁵⁸¹ residue is essential for C-terminal kinase domain activation, which is then leading to an autophosphorylation cascade of Ser³⁸¹ and

Ser³⁷⁶ residues in the linker region, and Ser²¹² in the N-terminal kinase domain (McCoy et al., 2005). In addition, they reported in HEK-293 cells, that in function of the stimuli, p38 or p42/44 MAPK activation may induce the phosphorylation of MSK1-Ser³⁶⁰ residue which constitutes another proline-directed site (McCoy et al., 2005). However, in our study, treatment of endothelial cells with VEGF did not induce MSK1-Ser³⁶⁰ residue phosphorylation, which is in concordance with other studies, in which a treatment of myocytes and neurons with selective agonists did not support the phosphorylation of MSK1-Ser³⁶⁰ residue (Markou and Lazou, 2002; Webber et al., 2005).

Multi-protein complex interaction between MSK1 with p38, p42/44 MAPKs and sPLA₂-V

MSK1 has a specific docking site localized at the C-terminal end which has been demonstrated to be required for its activation upon its interaction with p38 and/or p42/44 MAPKs (McCoy et al., 2005; Tomas-Zuber et al., 2001). Since VEGF-mediated PAF synthesis implies p38, p42/44 MAPKs and sPLA₂-V activation (Bernatchez et al., 2001; Bernatchez et al., 2001) we investigated the interaction between these proteins with MSK1. By coimmunoprecipitation analyses in native endothelial cells, we detected the presence of a constitutive multi-protein complex between p38, p42/44 MAPKs, sPLA₂-V and MSK1, which thus supports the possible contribution of MSK1 in VEGF-mediated PAF synthesis.

To define the role of p38 and p42/44 MAPKs on VEGF-mediated MSK1 activation, we used corresponding selective inhibitors. Treatment of endothelial cells with PD98059 abrogated the phosphorylation MSK1-Ser³⁷⁶ and Thr⁵⁸¹ residues, whereas the blockade of p38 MAPK activation with S203580 did not prevent the phosphorylation of these residues. Thus, suggesting that endothelial MSK1 activation under VEGF stimulation requires p42/44 MAPK activation, whereas p38 MAPK activation does not seem to be involved at least on phosphorylation of those MSK1 residues. Previous studies reported the

contribution of p38 and p42/44 MAPKs in the activation of the cytosolic phospholipase A₂ (cPLA₂) (Lin et al., 1993; Nemenoff et al., 1993), a PLA₂ essential for PAF synthesis in neutrophils (Baker et al., 2002). In addition, it was assessed that only p38 MAPK was capable to activate the lyso-PAF acetyltransferase which converts the lyso-PAF into PAF (Nixon et al., 1999; Owen et al., 2005). Thus, in endothelial cells, although p38 MAPK can bind to MSK1 docking site, its contribution onto PAF synthesis may reside as observed in neutrophils on its capacity to activate lyso-PAF acetyltransferase.

Contribution of MSK1 domains on VEGF-mediated PAF synthesis

MSK1 possesses a particular feature by having two kinase domains, where the initial C-terminal kinase domain activation is essential to support subsequent N-terminal kinase domain activation (McCoy et al., 2005). Furthermore, it has also been reported that the contribution both activated MSK1 kinase domains is essential to fully support MSK1 phosphorylation catalytic activity on CREB substrate (Arthur and Cohen, 2000; Arthur et al., 2004; Deak et al., 1998; Delghandi et al., 2005; Wiggin et al., 2002). To evaluate the role of each MSK1 kinase domain in the multi-protein complex formation on PAF synthesis, we used transfected endothelial cells expressing N- and C-terminal “dead-kinase” mutants. Firstly, we observed that the mutations inactivating either the MSK1 N- or C-terminal kinase domains prevented VEGF-mediated CREB phosphorylation. We then assessed how such mutations would affect the endogenous MSK1 multi-protein complex.

Mutations of MSK1 N- or C-terminal kinase domains did not alter the interaction between MSK1 and p38 and p42/44 MAPKs, under basal and VEGF-mediated conditions. The maintenance of these interactions could be explained by the fact that both MAPKs are binding to MSK1 within a specific docking site localized outside and at the end of the C-terminal kinase domain (Dunn et al., 2005; Frodin and Gammeltoft, 1999; McCoy et al., 2005). However, although a

constitutive interaction between MSK1 and sPLA₂-V was maintained in endothelial cells expressing N-terminal kinase domain (MSK1-D195A) mutant, the interaction between MSK1 and sPLA₂-V in endothelial cells expressing C-terminal kinase domain (MSK1-D565A) mutant was almost completely abrogated under basal and VEGF-mediated conditions. Finally, using the same molecular approach, we observed that VEGF-mediated PAF synthesis was also lost in endothelial cells expressing C-terminal kinase domain (MSK1-D565A) mutant. Together, our data demonstrate that the interaction between MSK1 and sPLA₂-V is driven by MSK1 C-terminal kinase domain integrity, and is essential to allow PAF synthesis. These observations are in concordance with a previous study, in which we observed that the blockade of sPLA₂-V activity prevented endothelial VEGF-mediated PAF synthesis (Bernatchez et al., 2001).

In summary, the activation of VEGFR-2/NRP-1 complex with VEGF activates p38 and p42/44 MAPKs pathways and sPLA₂-V, which can form a constitutive multi-protein complex with MSK1. Interaction between MSK1, p38 and p42/44 MAPKs is supported by a specific docking site localized outside and at the end of the C-terminal kinase domain. Activation of p42/44 MAPK promotes phosphorylation of Thr⁵⁸¹ residue, which is essential for C-terminal kinase domain activation. Mutation inactivating MSK1 C-terminal kinase domain as opposed to N-terminal kinase domain is silencing the protein interaction between MSK1 and sPLA₂-V, which is essential to support VEGF-mediated PAF synthesis (Figure 6). Our data are the first one to delineate the interaction between MSK1 and sPLA₂-V, the pivotal role played by MSK1 C-terminal kinase domain in this protein-protein complex formation, and that MSK1 constitutes a rate-limiting step in the induction of VEGF-mediated proinflammatory activities.

2.6 Acknowledgements

We are grateful to Mrs. Maya Mamarbachi for her precious help and suggestions.

2.7 References

- Arthur JS, Cohen P. 2000. MSK1 is required for CREB phosphorylation in response to mitogens in mouse embryonic stem cells. *FEBS Lett* 482(1-2):44-48.
- Arthur JS, Fong AL, Dwyer JM, Davare M, Reese E, Obrietan K, Impey S. 2004. Mitogen- and stress-activated protein kinase 1 mediates cAMP response element-binding protein phosphorylation and activation by neurotrophins. *J Neurosci* 24(18):4324-4332.
- Baker PR, Owen JS, Nixon AB, Thomas LN, Wooten R, Daniel LW, O'Flaherty JT, Wykle RL. 2002. Regulation of platelet-activating factor synthesis in human neutrophils by MAP kinases. *Biochim Biophys Acta* 1592(2):175-184.
- Bernatchez PN, Allen BG, Gelinas DS, Guillemette G, Sirois MG. 2001. Regulation of VEGF-induced endothelial cell PAF synthesis: role of p42/44 MAPK, p38 MAPK and PI3K pathways. *Br J Pharmacol* 134(6):1253-1262.
- Bernatchez PN, Rollin S, Soker S, Sirois MG. 2002. Relative effects of VEGF-A and VEGF-C on endothelial cell proliferation, migration and PAF synthesis: Role of neuropilin-1. *J Cell Biochem* 85(3):629-639.
- Bernatchez PN, Soker S, Sirois MG. 1999. Vascular endothelial growth factor effect on endothelial cell proliferation, migration, and platelet-activating factor synthesis is Flk-1-dependent. *J Biol Chem* 274(43):31047-31054.
- Bernatchez PN, Winstead MV, Dennis EA, Sirois MG. 2001. VEGF stimulation of endothelial cell PAF synthesis is mediated by group V 14 kDa secretory phospholipase A2. *Br J Pharmacol* 134(1):197-205.
- Bligh EG, Dyer WJ. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 37(8):911-917.
- Bussolino F, Camussi G. 1995. Platelet-activating factor produced by endothelial cells. A molecule with autocrine and paracrine properties. *Eur J Biochem* 229(2):327-337.
- Connolly DT, Heuvelman DM, Nelson R, Olander JV, Eppley BL, Delfino JJ, Siegel NR, Leimgruber RM, Feder J. 1989. Tumor vascular permeability factor stimulates endothelial cell growth and angiogenesis. *J Clin Invest* 84(5):1470-1478.
- Cuenda A, Rouse J, Doza YN, Meier R, Cohen P, Gallagher TF, Young PR, Lee JC. 1995. SB 203580 is a specific inhibitor of a MAP kinase homologue which is stimulated by cellular stresses and interleukin-1. *FEBS Lett* 364(2):229-233.
- Deak M, Clifton AD, Lucocq LM, Alessi DR. 1998. Mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1) is directly activated by MAPK and SAPK2/p38, and may mediate activation of CREB. *Embo J* 17(15):4426-4441.

- Delghandi MP, Johannessen M, Moens U. 2005. The cAMP signalling pathway activates CREB through PKA, p38 and MSK1 in NIH 3T3 cells. *Cell Signal* 17(11):1343-1351.
- Dudley DT, Pang L, Decker SJ, Bridges AJ, Saltiel AR. 1995. A synthetic inhibitor of the mitogen-activated protein kinase cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(17):7686-7689.
- Dunn KL, Espino PS, Drobic B, He S, Davie JR. 2005. The Ras-MAPK signal transduction pathway, cancer and chromatin remodeling. *Biochem Cell Biol* 83(1):1-14.
- Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM. 1995. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol* 146(5):1029-1039.
- Ferrara N, Davis-Smyth T. 1997. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* 18(1):4-25.
- Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV, Agani F, Leung SW, Koos RD, Semenza GL. 1996. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol* 16(9):4604-4613.
- Frodin M, Antal TL, Dummler BA, Jensen CJ, Deak M, Gammeltoft S, Biondi RM. 2002. A phosphoserine/threonine-binding pocket in AGC kinases and PDK1 mediates activation by hydrophobic motif phosphorylation. *Embo J* 21(20):5396-5407.
- Frodin M, Gammeltoft S. 1999. Role and regulation of 90 kDa ribosomal S6 kinase (RSK) in signal transduction. *Mol Cell Endocrinol* 151(1-2):65-77.
- Hefner Y, Borsch-Haubold AG, Murakami M, Wilde JI, Pasquet S, Schieltz D, Ghomashchi F, Yates JR, 3rd, Armstrong CG, Paterson A, Cohen P, Fukunaga R, Hunter T, Kudo I, Watson SP, Gelb MH. 2000. Serine 727 phosphorylation and activation of cytosolic phospholipase A2 by MNK1-related protein kinases. *J Biol Chem* 275(48):37542-37551.
- Lin LL, Wartmann M, Lin AY, Knopf JL, Seth A, Davis RJ. 1993. cPLA2 is phosphorylated and activated by MAP kinase. *Cell* 72(2):269-278.
- Markou T, Lazou A. 2002. Phosphorylation and activation of mitogen- and stress-activated protein kinase-1 in adult rat cardiac myocytes by G-protein-coupled receptor agonists requires both extracellular-signal-regulated kinase and p38 mitogen-activated protein kinase. *Biochem J* 365(Pt 3):757-763.
- Mayo LD, Kessler KM, Pincheira R, Warren RS, Donner DB. 2001. Vascular endothelial cell growth factor activates CRE-binding protein by signaling through the KDR receptor tyrosine kinase. *J Biol Chem* 276(27):25184-25189.
- McCoy CE, Campbell DG, Deak M, Bloomberg GB, Arthur JS. 2005. MSK1 activity is controlled by multiple phosphorylation sites. *Biochem J* 387(Pt 2):507-517.

- Montrucchio G, Lupia E, Battaglia E, Del Sorbo L, Boccellino M, Biancone L, Emanuelli G, Camussi G. 2000. Platelet-activating factor enhances vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell motility and neoangiogenesis in a murine matrigel model. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20(1):80-88.
- Nemenoff RA, Winitz S, Qian NX, Van Putten V, Johnson GL, Heasley LE. 1993. Phosphorylation and activation of a high molecular weight form of phospholipase A2 by p42 microtubule-associated protein 2 kinase and protein kinase C. *J Biol Chem* 268(3):1960-1964.
- Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. 1999. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *Faseb J* 13(1):9-22.
- Nixon AB, O'Flaherty JT, Salyer JK, Wykle RL. 1999. Acetyl-CoA:1-O-alkyl-2-lysophosphatidylglycerol-3-phosphocholine acetyltransferase is directly activated by p38 kinase. *J Biol Chem* 274(9):5469-5473.
- Owen JS, Baker PR, O'Flaherty JT, Thomas MJ, Samuel MP, Wooten RE, Wykle RL. 2005. Stress-induced platelet-activating factor synthesis in human neutrophils. *Biochim Biophys Acta* 1733(2-3):120-129.
- Pierrat B, Correia JS, Mary JL, Tomas-Zuber M, Lesslauer W. 1998. RSK-B, a novel ribosomal S6 kinase family member, is a CREB kinase under dominant control of p38alpha mitogen-activated protein kinase (p38alphaMAPK). *J Biol Chem* 273(45):29661-29671.
- Rakhit S, Clark CJ, O'Shaughnessy C T, Morris BJ. 2005. N-methyl-D-aspartate and brain-derived neurotrophic factor induce distinct profiles of extracellular signal-regulated kinase, mitogen- and stress-activated kinase, and ribosomal s6 kinase phosphorylation in cortical neurons. *Mol Pharmacol* 67(4):1158-1165.
- Shaywitz AJ, Greenberg ME. 1999. CREB: a stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals. *Annu Rev Biochem* 68:821-861.
- Sirois MG, Edelman ER. 1997. VEGF effect on vascular permeability is mediated by synthesis of platelet-activating factor. *Am J Physiol* 272(6 Pt 2):H2746-2756.
- Snyder F, Fitzgerald V, Blank ML. 1996. Biosynthesis of platelet-activating factor and enzyme inhibitors. *Adv Exp Med Biol* 416:5-10.
- Tomas-Zuber M, Mary JL, Lamour F, Bur D, Lesslauer W. 2001. C-terminal elements control location, activation threshold, and p38 docking of ribosomal S6 kinase B (RSKB). *J Biol Chem* 276(8):5892-5899.
- Webber KM, Smith MA, Lee HG, Harris PL, Moreira P, Perry G, Zhu X. 2005. Mitogen- and stress-activated protein kinase 1: convergence of the ERK and p38 pathways in Alzheimer's disease. *J Neurosci Res* 79(4):554-560.
- Wiggin GR, Soloaga A, Foster JM, Murray-Tait V, Cohen P, Arthur JS. 2002. MSK1 and MSK2 are required for the mitogen- and stress-induced phosphorylation of CREB and ATF1 in fibroblasts. *Mol Cell Biol* 22(8):2871-2881.

2.8 Legends

Figure 1: Contribution of p38 and p42/44 MAPKs on VEGF-mediated MSK1 phosphorylation

Confluent BAEC were stimulated with VEGF (1 nM) up to 30 minutes. Cell lysates were immunoprecipitated with an anti-MSK1 IgG. MSK1 phosphorylation was assessed by immunoblotting with two antibodies detecting phospho-MSK1-Ser³⁷⁶ and -Thr⁵⁸¹ respectively. The blots were stripped and reprobed to confirm equal loading of MSK1 protein (A). BAEC were pretreated with p38 MAPK inhibitor (SB203580, 10 μ M) (SB) or MEK inhibitor (PD98059, 10 μ M) (PD) alone and combined 20 minutes prior to stimulation with VEGF (1 nM) for 15 minutes. DMSO was used to dissolve the inhibitors and inserted as negative control. Cell lysates were treated as above (B).

Figure 2: MSK1 multi-protein complex formation

Confluent BAEC were stimulated with VEGF (1 nM) up to 30 minutes. Cell lysates were immunoprecipitated with an anti-MSK1 IgG. Coprecipitation of MSK1 with p38 and p42/44 MAPKs, and sPLA₂-V was assessed by Western blot analyses with corresponding antibodies.

Figure 3: Characterization of transfected BAEC

RT-PCR amplification of FLAG-MSK1 sequence was used to confirm stable transfection efficiency in BAEC expressing empty pCDNA3.1 vector (pCDNA), wild type MSK1 (MSK1-WT), N-terminal dead-kinase domain (D195A) and C-terminal dead-kinase domain (D565A). β -actin amplification was used as positive control for cDNA quality and quantity (A). Confluent native and transfected BAEC were stimulated in absence (-) or in presence (+) of VEGF (1 nM) for 15 minutes to assess the contribution of MSK1 N- and C-terminal kinase domain on CREB

phosphorylation. Membranes were probed with an anti-phospho-CREB-Ser¹³³ IgG. The blots were stripped and reprobed with an anti-CREB IgG to confirm equal protein loading (B).

Figure 4: Modulation of MSK1 multi-protein complex formation in transfected BAEC

Confluent native and transfected BAEC were stimulated in absence (-) or in presence (+) of VEGF (1 nM) for 15 minutes. Cell lysates were immunoprecipitated with an anti-MSK1 IgG. Coprecipitation of MSK1 with p38 and p42/44 MAPKs, and sPLA₂-V was assessed by Western blot analyses with corresponding antibodies.

Figure 5: Contribution of MSK1 on VEGF-mediated PAF synthesis

Confluent native and transfected BAEC were stimulated with PBS and VEGF (1 nM) for 15 minutes. Values are means \pm SEM of at least 12 experiments and represent the incorporation of tritiated acetate (³H-acetate) into lyso-PAF. *** p < 0.001 as compared to corresponding control-PBS treated cells.

Figure 6: Schematic illustration of VEGF-mediated PAF synthesis: Proposed contribution of MSK1

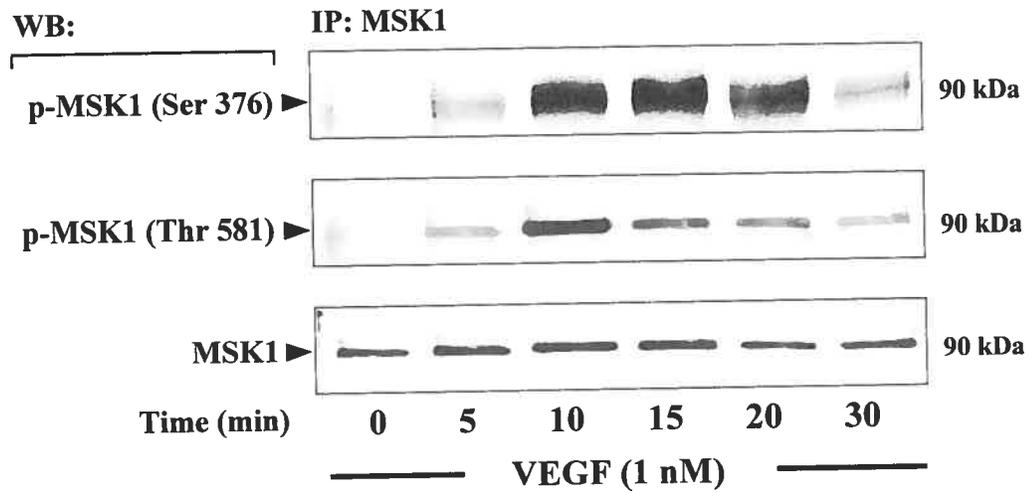
Activation of VEGFR-2/NRP-1 complex by VEGF activates p38 and p42/44 MAPKs pathways and sPLA₂-V, which can form a constitutive multi-protein complex with MSK1. Interaction between MSK1 and p38 and p42/44 MAPKs is supported by a specific docking site located at the C-terminal end. Activation of p42/44 MAPK promotes phosphorylation of Thr⁵⁸¹ residue, which is essential for C-terminal kinase domain activation, and autophosphorylation cascade of Ser³⁷⁶ and Ser³⁸¹ residues in the linker region, and Ser²¹² in the N-terminal kinase domain and subsequent phosphorylation of its substrate CREB. Mutation inactivating MSK1 C-terminal kinase domain as opposed to N-terminal kinase domain is silencing the protein

interaction between MSK1 and sPLA₂-V and lyso-PAF formation, which is then converted into PAF upon the activation of lyso-PAF acetyl transferase by activated p38 MAPK. Phosphorylation and autophosphorylation of amino acids induced by MAPKs on MSK1 are represented by single and double circles respectively.

2.9 Figures

Figure 1

A



B

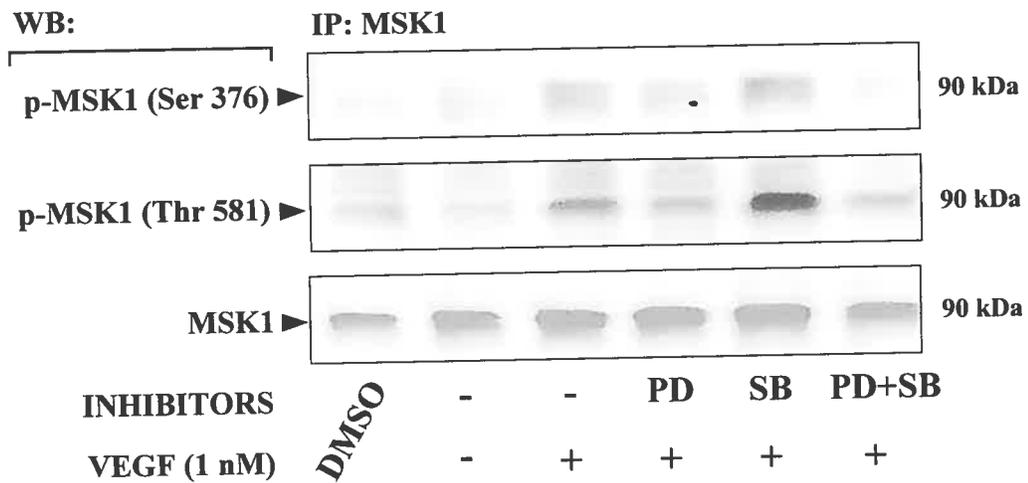


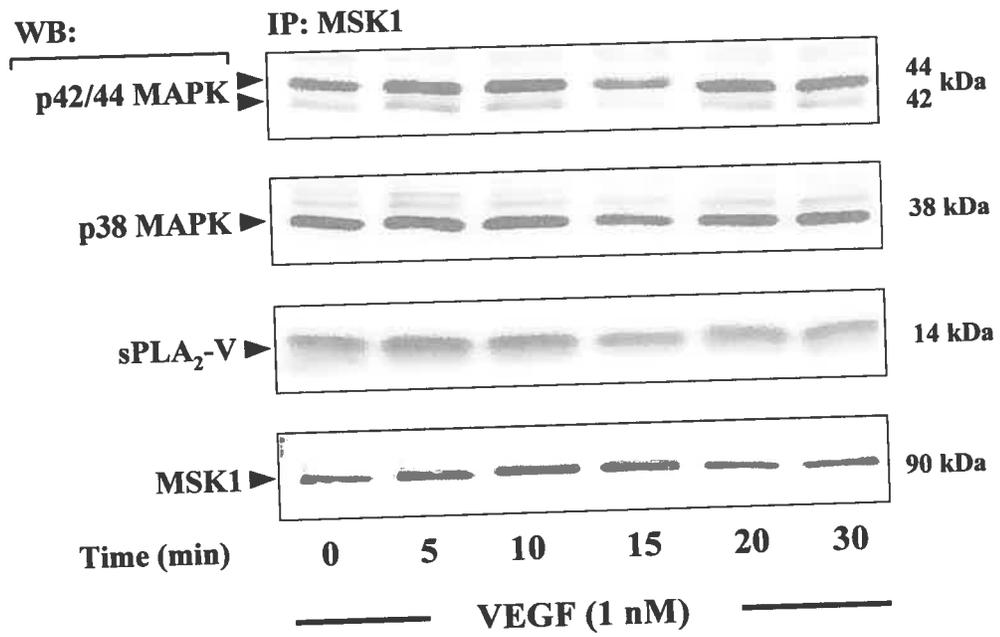
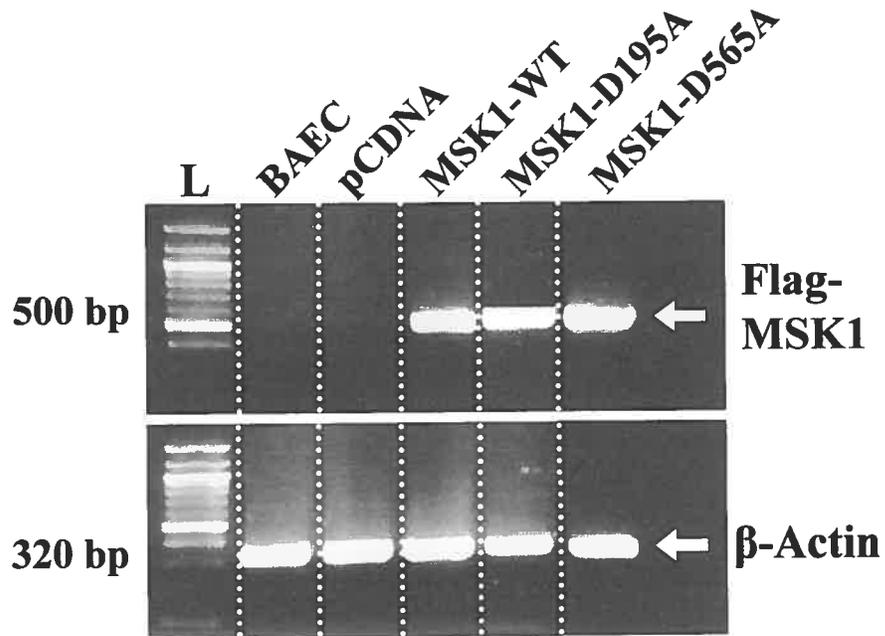
Figure 2

Figure 3

A



B

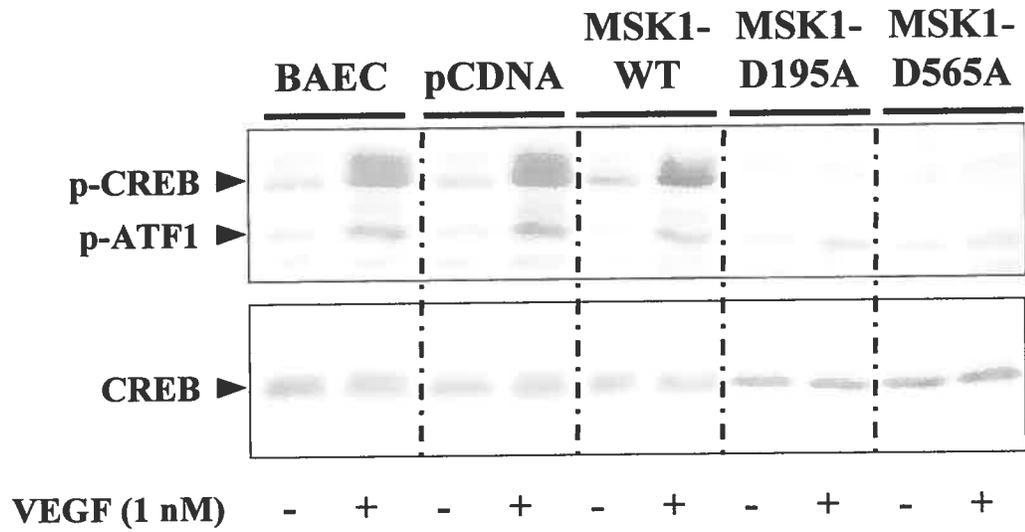


Figure 4

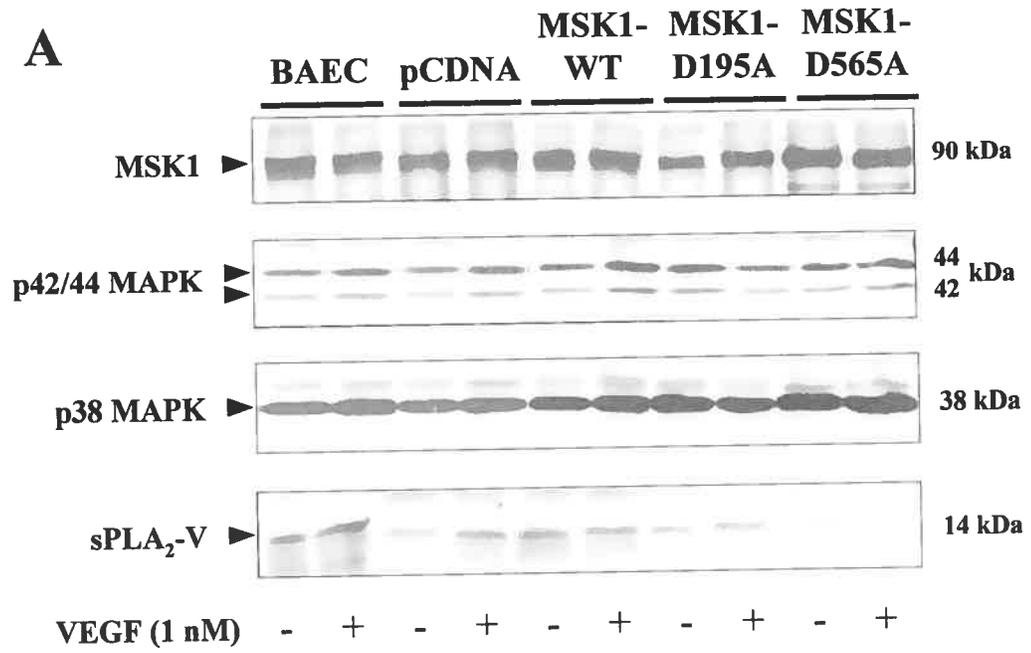


Figure 5

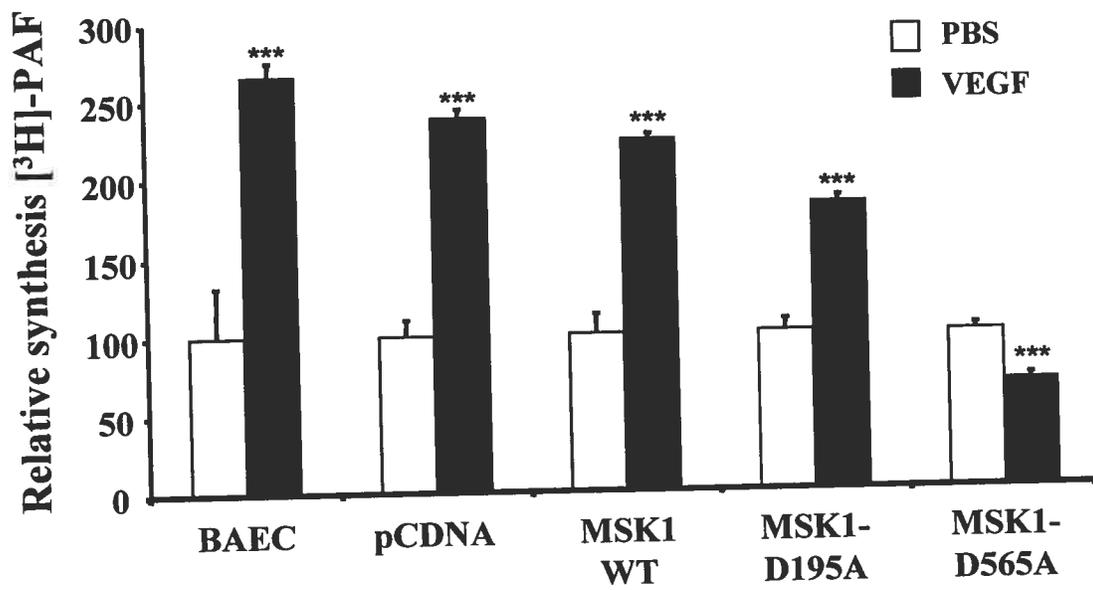
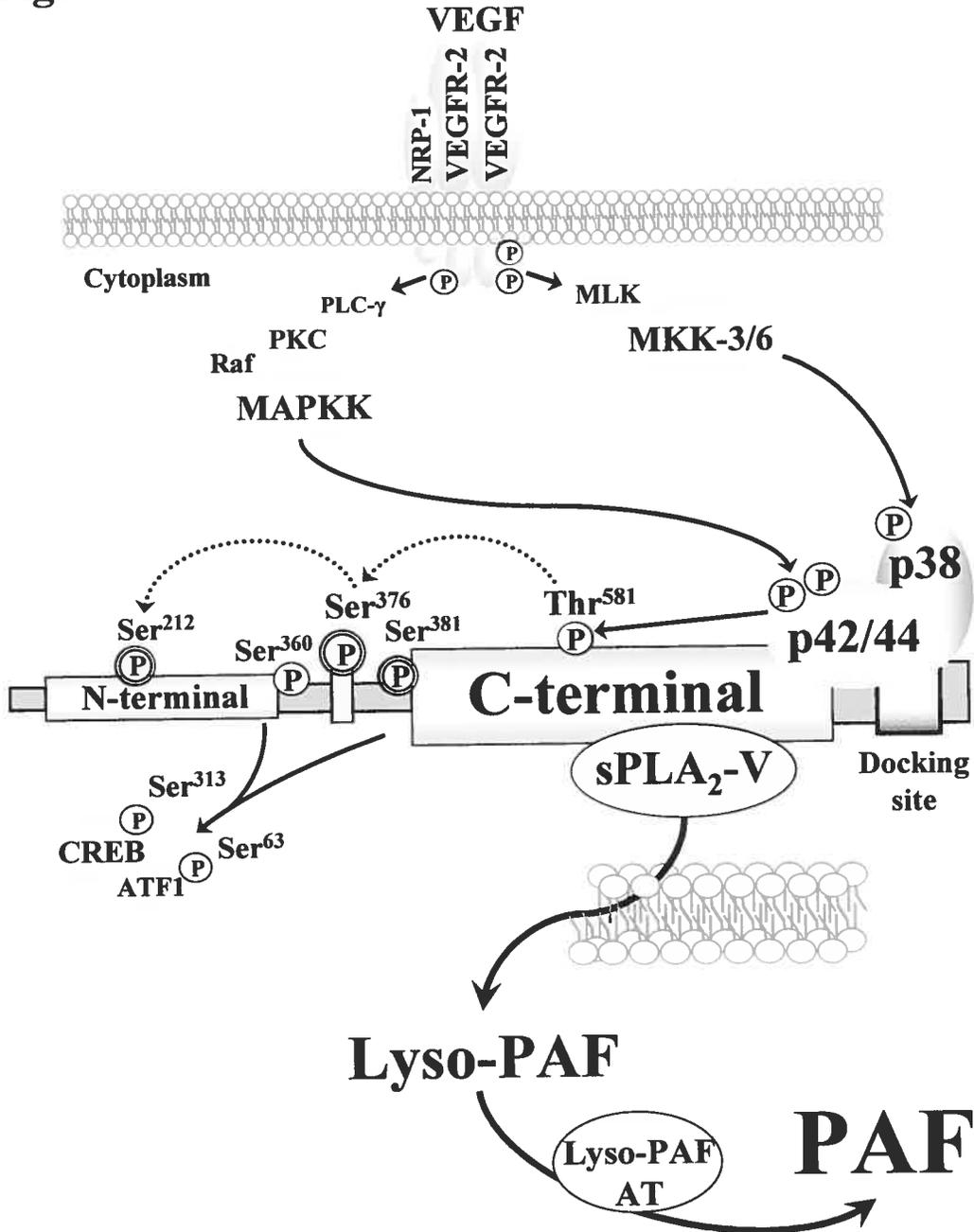


Figure 6



3 DISCUSSION

Au cours de cette étude, nous avons démontré que la MSK1 activée par le VEGF-A₁₆₅ contribue à la séquence des événements intracellulaires menant à la synthèse endothéliale de PAF. Tout d'abord, nous avons observé une interaction protéique constitutive entre la MSK1 et les trois enzymes clés de la synthèse de PAF, soit la p38 MAPKs, la p42/44 MAPKs et la sPLA₂-V. Le rôle central de la MSK1 au sein de ces interactions, a été démontré suite aux résultats obtenus avec des BAEC transfectées exprimant la forme mutée de la MSK1 inactivant son domaine kinase en C-terminale, soit la MSK1-D565A. Nos résultats ont démontré une perte de l'interaction protéique avec la sPLA₂-V, ainsi que l'inhibition de la synthèse du PAF induite par le VEGF-A₁₆₅ dans les BAEC exprimant la MSK1-D565A.

3.1 Contribution de la MSK1 dans la synthèse du PAF

Nous savons que la synthèse de PAF endothéliale induite par le VEGF-A₁₆₅, nécessite à la fois l'activation parallèle des voies p38 et p42/44 MAPKs et l'action de la sPLA₂-V sur la voie de remodelage des phospholipides. À partir de ces prémisses, nous avons identifié la MSK1 comme une kinase potentiellement intéressante à notre étude, puisqu'elle peut être activée par des stimuli activant les voies p38 et p42/44 MAPKs^{176, 206}. De plus, comme elle peut être activée par le VEGF-A₁₆₅²⁰⁷ et qu'elle peut induire la phosphorylation de la cPLA₂¹²⁷, nous avons donc émis l'hypothèse que la MSK1 pourrait être impliquée dans la synthèse du PAF induite par le VEGF-A₁₆₅. La contribution de la MSK1 au sein de ces cascades d'événements intracellulaires menant à la synthèse du PAF a donc été évaluée de différentes manières.

3.2 Le VEGF-A₁₆₅ induit la phosphorylation de la MSK1

Dans un premier temps, nous avons remarqué que la stimulation des cellules endothéliales par le VEGF-A₁₆₅ induit une augmentation rapide et transitoire de la phosphorylation de la MSK1 pour deux des trois sites de phosphorylation étudiés, soient la Ser³⁷⁶ et la Thr⁵⁸¹. Ce profil de phosphorylation pour ces deux résidus correspond à ceux observés dans différentes études utilisant divers types cellulaires (Hela, SK-N-MC, PC12 et myocytes) et agonistes tels que le TNF- α , le FGF, le *neuronal growth factor* (NGF) et l'endothéline-1 (ET-1). L'activité kinase de la MSK1 résulte d'un processus d'activation en séquence dont la première étape est dépendante des MAPKs via la phosphorylation des résidus suivis de proline et plus particulièrement du résidu Thr⁵⁸¹. La phosphorylation de ce résidu est essentielle à l'activation du domaine kinase en C-terminale et permet l'autophosphorylation de plusieurs autres résidus, dont la Ser³⁷⁶, que nous avons également détectée¹⁸⁹. La phosphorylation spécifique du résidu Ser³⁶⁰ par les MAPKs a, quant à elle, été observée dans des cellules HEK 293, suite à la stimulation au TPA qui active la voie p42/44 MAPK et suite à l'effet des rayons UV qui activent la voie p38 MAPK¹⁸⁹. Toutefois, dans notre étude, la stimulation des cellules endothéliales avec le VEGF-A₁₆₅ n'induit pas la phosphorylation du résidu Ser³⁶⁰, tout comme il a été observé dans d'autres études effectuées avec divers types cellulaires et agonistes appropriés^{208, 209}.

Par ailleurs, il est intéressant de noter que le profil d'activation de la MSK1 s'intègre à ceux de la p38 et p42/44 MAPKs qui surviennent dans les quelques minutes, soient 10 et 7,5 minutes respectivement¹⁴⁵, précédant son activation maximale retrouvée entre 10-15 minutes. De plus, le profil d'activation de la MSK1 coïncide avec la fenêtre de temps où l'on détecte la synthèse maximale de PAF, soit 15 minutes après la stimulation au VEGF-A₁₆₅. Ces observations supportent donc la possibilité que la MSK1 puisse être impliquée dans la cascade d'activation induite par le VEGF-A₁₆₅ menant à la synthèse du PAF.

3.3 Co-précipitation de la MSK1 avec la p38, p42/44 MAPKs et la sPLA₂-V : Complexe multiprotéiques

Les MAPKs ont la capacité de former différents complexes multiprotéiques via des sites et des protéines d'ancrage spécifiques aux différentes voies de signalisation ²¹⁰. La MSK1 possède également un site d'ancrage localisé en C-terminale à l'extérieur du domaine kinase, dont la séquence spécifique est essentielle à son activation, puisqu'elle permet la liaison de la p38 et de la p42/44 MAPKs ¹⁸⁹. Comme la synthèse du PAF induite par le VEGF-A₁₆₅ nécessite l'activation parallèle de la p38, p42/44 MAPKs et de la sPLA₂-V, nous avons investigué leurs interactions avec la MSK1. L'analyse des protéines coimmunoprécipitant avec la MSK1 nous a permis de détecter la présence constitutive de la p38, p42/44 MAPKs et de la sPLA₂-V. À la lumière de ces résultats, nous avons émis l'hypothèse que ces protéines puissent se retrouver dans un complexe multiprotéique constitutif.

3.3.1 Rôle des p38 et p42/44 MAPKs dans l'activation de la MSK1 induite par le VEGF-A₁₆₅

La transduction des signaux de l'espace extracellulaire à l'espace intracellulaire se transmet via le phénomène de phosphorylation-déphosphorylation des protéines-kinases faisant suite à une interaction protéique. L'activation de la MSK1, démontrée par la phosphorylation des sites Ser³⁷⁶ et Thr⁵⁸¹ et de son substrat CREB, nous indique qu'elle résulte d'une interaction physique avec les formes phosphorylées de la p42/44 et possiblement p38 MAPKs. Cependant, lors de notre étude, la détection constitutive de la MSK1 avec la p38 et p42/44 MAPKs observée se rapporte seulement aux formes non-phosphorylées de ces MAPKs ce qui explique qu'elles ne soient pas nécessairement régulées par la stimulation au VEGF-A₁₆₅. Par ailleurs, afin de contrôler pour la spécificité du complexe nous avons effectué un immunoprécipité

utilisant des billes non liées à la MSK1 (et non pas liées à des IgG non-immuns). La coimmunoprécipitation de la p38 et p42/44 MAPKs et de la MSK1 a aussi été observée de façon constitutive dans une autre étude et comme dans notre étude, ces résultats ne permettent pas de distinguer s'il existe différentes formes de complexe MSK1, les uns liés à la p38 MAPK et d'autres liés à la p42/44 MAPK. De plus, cette détection constitutive de la p38 et p42/44 MAPKs ne nous permet pas d'affirmer si ces deux kinases sont liées sur le même site à l'intérieur de la séquence définie comme étant le site d'ancrage. Néanmoins, il est possible de supposer que l'interaction des formes phosphorylées de la p38 et p42/44 MAPKs avec la MSK1 soit régulée par le VEGF-A₁₆₅, ce qui pourrait mener à la détection de différentes formes de complexe multiprotéique MSK1.

La coimmunoprécipitation constitutive de la p38 et de la p42/44 MAPKs avec la MSK1 suggère que ces kinases jouent un rôle dans l'activation de la MSK1 suite à la stimulation au VEGF-A₁₆₅. En effet, nos résultats démontrent que seul le traitement des cellules endothéliales avec l'inhibiteur de la voie p42/44 MAPK, inhibe la phosphorylation des résidus Ser³⁷⁶ et Thr⁵⁸¹ de la MSK1 contrairement à l'inhibiteur de la voie p38 MAPK. Ceci suggère, suite à une stimulation au VEGF-A₁₆₅, que la phosphorylation endothéliale de la MSK1 au résidu Thr⁵⁸¹ requiert l'activation par la p42/44 MAPK, et par la suite déclenche l'autophosphorylation du résidu Ser³⁷⁶; tandis que l'action de la p38 MAPK ne semble pas être impliquée dans la phosphorylation de ces résidus. (Il est à noter que dans la figure 1, les immunobuvardages présentés en 1B par rapport à ceux en 1A contiennent la moitié moins de protéines immunoprécipitées, ce qui explique que la phosphorylation observée soit plus faible.) Dans l'étude de la synthèse du PAF induite par le VEGF, le rôle de la p38 MAPK est indéniable, puisque seule l'action de cette kinase est capable d'activer la lyso-PAF AT qui peut alors convertir le lyso-PAF en PAF^{151, 211}. Ainsi, bien que la p38 MAPK puisse lier la MSK1 sur son site de liaison, jusqu'à présent son rôle dans la synthèse du PAF réside dans sa capacité à activer la lyso-PAF acetyltransferase.

Toutefois, dans la littérature, différentes études soutiennent que la p38 MAPK régule l'activation de la MSK1. En effet, une première étude effectuée avec des Hela cells a démontré que, suite à une stimulation au TNF, l'effet de la p38 MAPK sur l'activité kinase de la MSK1 aurait lieu dans les cinq premières minutes, tandis que la p42/44 MAPK agirait plus tard, entre 5 et 15 minutes suivant la stimulation. Cette étude démontre aussi qu'après 15 minutes de stimulation, l'activité kinase de la MSK1 en présence des inhibiteurs des voies p38 et p42/44 MAPKs, est réduite partiellement et que la combinaison des deux inhibiteurs bloque complètement l'activité kinase ¹⁷⁶. Une seconde étude effectuée avec des cellules neuronales rapporte que la phosphorylation de la MSK1, suite à l'activation des récepteurs NMDA (en présence de 15 mM K⁺), résulte principalement de l'activation de la p42/44 MAPK, mais requiert aussi un niveau basal d'activité de la p38 MAPK, puisque l'inhibiteur SB203580 atténue la phosphorylation de la MSK1 ²¹². Finalement, une étude a démontré que la phosphorylation de la MSK1 était complètement inhibée en présence de l'un ou l'autre des inhibiteurs des voies de la p38 ou de la p42/44 MAPKs, suite à la stimulation des cardiomyocytes avec la phényléphrine (PE) ou l'ET-1 ²⁰⁸. L'activation de la MSK1 peut ainsi résulter de l'activation de la voie de la p38 MAPK et/ou la p42/44 MAPK selon l'agoniste et le type cellulaire.

3.3.2 Coimmunoprécipitation constitutive de la MSK1 avec la sPLA₂-V : Rôle de la MSK1 dans la synthèse de PAF induite par le VEGF-A₁₆₅

La coimmunoprécipitation constitutive de la sPLA₂-V avec la MSK1 ne révèle pas de quelle façon ces protéines interagissent, mais suggère qu'elles sont localisées dans un même compartiment. La MSK1 possède un signal bipartite de localisation nucléaire, ce qui explique qu'elle soit localisée dans le noyau des cellules tant au niveau basal que suite à une stimulation ^{176, 213}. Toutefois, elle a récemment été détectée dans des granules enrichies de cavéoline-3 suite à

l'isolation de fractions membranaires ¹⁹³. La présence de ces granules de cavéolines est d'ailleurs de plus en plus observée dans les mécanismes de transduction des signaux intracellulaires ²¹⁴. De façon intéressante, une récente étude a aussi indiqué que la sPLA₂-V est retrouvée dans des granules cytoplasmiques enrichies de cavéolines-2 localisées autour de la région périnucléaire ²¹⁵. Cette encapsulation de la sPLA₂-V dans les granules de cavéolines la protégerait des conditions réductrices de l'environnement cytoplasmique et lui permettrait de conserver son activité enzymatique puisque ces granules contiennent d'importantes quantités de calcium ²¹⁶. D'autres études réalisées avec différents types cellulaires ont aussi observé une localisation de la sPLA₂-V près de la région nucléaire ^{111, 215, 217}. De plus, des mécanismes d'internalisation de la sPLA₂-V vers la membrane nucléaire ont été démontrés ^{155, 215}. Ces différentes observations sur la localisation intracellulaire de la MSK1 et de la sPLA₂-V supportent la possibilité qu'il y ait une interaction protéique entre ces deux enzymes.

Il est aussi intéressant de noter que de plus en plus d'études démontrent que la cPLA₂, un autre membre de la superfamille des phospholipases, a été identifiée comme un des substrats de la MSK1 ^{127, 193, 208}. La MSK1 possède la capacité de phosphoryler le résidu Ser⁷²⁷ de la cPLA₂ ¹²⁷. D'autre part, suite à l'analyse de la séquence protéique de la sPLA₂-V, nous avons récemment identifié cinq sites de phosphorylation potentiels. Par la suite, lors d'une étude d'incorporation de ³²P, nous avons observé une phosphorylation de la sPLA₂-V après 10 minutes de traitement au VEGF-A₁₆₅. (résultats non publiés). La sPLA₂-V peut donc être activée suite à une stimulation au VEGF-A₁₆₅. Il est envisageable d'attribuer cette activation à l'effet de la MSK1 suite à son activation par les p38 et p42/44 MAPKs, qui sont déjà impliquées dans la synthèse de PAF via la cPLA₂ dans les neutrophiles ¹⁴⁸. D'autre part, dans notre modèle cellulaire, comme les deux seules enzymes responsables de la voie de remodelage des phospholipides sont la sPLA₂-V et la lyso-PAF AT et que la p42/44 MAPK ne

participe pas à l'activation de cette dernière et induit la phosphorylation de la MSK1, ceci suggère que le rôle de la p42/44 MAPK dans la synthèse du PAF soit via l'activation directe ou indirecte de la sPLA₂-V. Ces différentes observations sur la localisation et la phosphorylation de la sPLA₂-V, nous laissent supposer que l'activation de la MSK1, suite à une stimulation au VEGF-A₁₆₅, pourrait réguler de façon directe ou indirecte l'activité de la sPLA₂-V et mener à la synthèse du PAF.

3.4 Contribution des domaines kinases de la MSK1 dans la synthèse du PAF induite par le VEGF-A₁₆₅

La MSK1 est une kinase particulière, puisqu'elle est composée de deux domaines kinase à l'intérieur d'un même polypeptide, où l'activation initiale du domaine kinase en C-terminale est essentielle pour induire l'activation du domaine kinase en N-terminale^{175, 189}. Il a été démontré que l'activité catalytique totale de la MSK1 est nécessaire pour agir sur ses substrats. Par exemple, la phosphorylation de CREB requiert la contribution des deux domaines kinases à l'état actif^{176, 187, 191, 192, 197}. Pour évaluer le rôle de chacun des domaines kinases dans la formation constitutive de ce complexe multiprotéique, nous avons utilisé des cellules endothéliales transfectées exprimant la forme mutée « dead-kinase » des domaines kinases en N- et C-terminale, soit les mutants MSK1-D195A et MSK1-D565A respectivement. Les mutations effectuées inactivant l'un ou l'autre des domaines kinases de la MSK1 nous ont tout d'abord permis de confirmer l'importance des deux domaines kinases dans l'activité catalytique de la MSK1, puisque pour chacune des formes mutées, le VEGF-A₁₆₅ n'a pas induit la phosphorylation de CREB.

Par la suite, nous avons évalué l'effet de l'expression exogène de ces formes mutées de la MSK1 sur la formation constitutive du complexe

multiprotéique endogène. Lors de ces études de coimmunoprécipitation, il est à noter qu'il aurait été intéressant d'utiliser l'anticorps anti-FLAG pour s'assurer de la spécificité des interactions MOCKs (les formes mutées de la MSK1 possèdent l'épitope FLAG), mais le résultat de l'immunobuvardage obtenu était non-spécifique. Par conséquent, les études de coimmunoprécipitation ont été réalisées à l'aide de l'anticorps anti-MSK1 et reflètent donc la précipitation d'un mélange de l'expression endogène et exogène de la protéine MSK1.

Ainsi, l'expression de l'une ou l'autre des deux formes mutées de la MSK1 n'a pas du tout affecté l'interaction constitutive avec la p38 et la p42/44 MAPK. Cette observation s'explique par la localisation du domaine d'ancrage des MAPKs qui se trouve à l'extérieur des domaines kinases de la MSK1 et à l'extrémité C-terminale. Ce domaine d'ancrage n'est donc pas influencé par un changement de conformation qu'engendreraient ces mutations. Toutefois, bien que l'interaction constitutive de la sPLA₂-V ait été maintenue dans les cellules endothéliales exprimant la forme mutée MSK1-D195A, elle a été presque complètement supprimée dans les cellules endothéliales exprimant la forme mutée MSK1-D565A, et ce, autant en condition basale que stimulée au VEGF-A₁₆₅. Ces résultats obtenus démontrant une interaction protéique qui soit différente pour chacune des deux formes mutées de la MSK1 sont les premiers exemples retrouvés dans la littérature. Jusqu'à présent, aucune autre étude n'a examiné le rôle des domaines kinases de la MSK1 au niveau des interactions protéiques.

Finalement, les résultats obtenus de la synthèse de PAF supportent le rôle essentiel de l'interaction observée entre la MSK1 et la sPLA₂-V. En effet, la synthèse de PAF induite par le VEGF-A₁₆₅ est inhibée spécifiquement dans les cellules endothéliales exprimant la forme mutée MSK1-D565A. L'ensemble de ces résultats suggère donc que l'interaction protéique constitutive de la MSK1 avec la sPLA₂-V se fait spécifiquement via le domaine kinase en C-terminale de la MSK1 et qu'elle est essentielle à la synthèse du PAF induite par le VEGF-A₁₆₅.

Cette étude démontre bien le rôle important joué par la sPLA₂-V dans la synthèse de PAF, ce qui est en accord avec une étude récente où nous avons démontré qu'en présence d'un inhibiteur de l'activité de la sPLA₂-V la synthèse du PAF induite par le VEGF-A₁₆₅ est inhibée. Comme nous ne savons pas si cette interaction est directe ou indirecte, il est aussi possible que d'autres kinases ou protéines d'ancrage soient présentes dans cette interaction. L'identification précise des différents constituants de ce complexe multiprotéiques permettra de mieux comprendre le rôle de la MSK1 dans la réponse inflammatoire induite par le VEGF-A₁₆₅.

Nos résultats démontrent la contribution de la MSK1 au sein des mécanismes intracellulaires activés lors de la réponse inflammatoire induite par le VEGF-A₁₆₅. Ainsi, notre étude soutient aussi l'implication de la MSK1 dans la signalisation intracellulaire au sein de processus inflammatoires, puisque son activité inflammatoire était jusqu'à présent davantage associée à la régulation de facteurs de transcription, étant donné sa localisation dans le noyau.

4 CONCLUSION

En résumé, cette étude est la première à démontrer la contribution de la MSK1 dans les mécanismes intracellulaires menant à la synthèse du PAF induite par le VEGF-A₁₆₅.

L'activation du complexe VEGFR-2/NRP-1 par le VEGF-A₁₆₅ active les voies de signalisation p38 et p42/44 MAPKs ainsi que la sPLA₂-V, lesquelles forment un complexe multiprotéique avec la MSK1. L'interaction constitutive de la MSK1 avec la p38 et la p42/44 MAPK a lieu via un site d'ancrage spécifique aux MAPKs localisé à l'extérieur des domaines kinases et à l'extrémité C-terminale. Nous avons démontré que c'est l'activation de la p42/44 MAPK qui induit la phosphorylation du résidu Thr⁵⁸¹ de la MSK1. La phosphorylation de ce résidu est essentielle à l'activation du domaine kinase en C-terminale et permet l'autophosphorylation de plusieurs autres résidus, dont la Ser³⁷⁶, que nous avons également détectée. Par la suite, nous avons étudié le rôle de la MSK1, suite à la transfection de notre modèle cellulaire exprimant des formes mutées pour chacun des domaines kinases. La mutation inactivant le domaine kinase en C-terminale, contrairement à celle inactivant le domaine kinase en N-terminale, a presque complètement supprimée l'interaction protéique préalablement observée entre la MSK1 et la sPLA₂-V, ainsi que la synthèse de PAF induite par le VEGF-A₁₆₅.

Nos résultats démontrent pour la première fois le rôle primordial de la MSK1, et en particulier, de son domaine kinase en C-terminale dans la formation d'un complexe constitutif avec la sPLA₂-V, ce qui représente une étape limitante dans l'induction des activités proinflammatoires du VEGF-A₁₆₅ (Figure11). Cette étude éclaire les mécanismes par lesquels le VEGF-A₁₆₅ mène à la synthèse du PAF dans les cellules endothéliales, un processus jouant un rôle important dans l'angiogenèse pathologique. Ainsi, la compréhension des mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans les phénomènes d'angiogenèse physiologique et pathologique permettra l'identification de nouveaux acteurs et le développement de cibles thérapeutiques plus spécifiques.

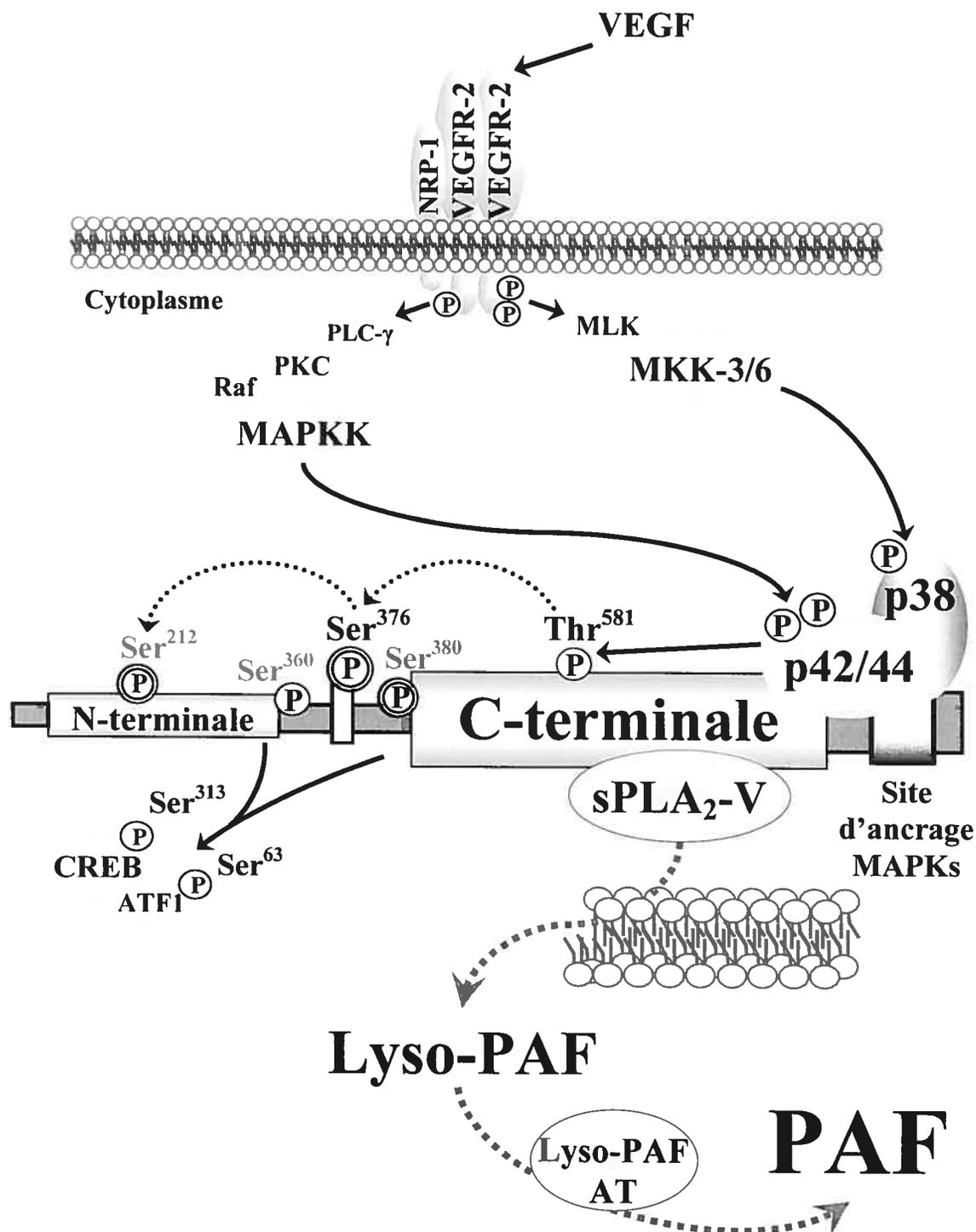


Figure 10 : Résumé schématique illustrant l'implication de la MSK1 dans les événements intracellulaires menant à la synthèse de PAF induite par le VEGF-A₁₆₅.

5 BIBLIOGRAPHIE

1. Hamilton WJ, B. J., Mossman HW, *Human Embryology*,
2. Risau, W., *Mechanisms of angiogenesis*, Nature, 1997; 386:671-4
3. Gonzalez-Crussi, F., *Vasculogenesis in the chick embryo. An ultrastructural study*, Am J Anat, 1971; 130:441-60
4. Folkman, J., *Tumor angiogenesis*, Adv Cancer Res, 1985; 43:175-203
5. Ortega, N., Hutchings, H., Plouet, J., *Signal relays in the VEGF system*, Front Biosci, 1999; 4:D141-52
6. Carmeliet, P., *Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis*, Nat Med, 2000; 6:389-95
7. Folkman, J., Klagsbrun, M., *Angiogenic factors*, Science, 1987; 235:442-7
8. Ferrara, N., *Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress*, Endocr Rev, 2004; 25:581-611
9. Carmeliet, P., Jain, R. K., *Angiogenesis in cancer and other diseases*, Nature, 2000; 407:249-57
10. Bergers, G., Benjamin, L. E., *Tumorigenesis and the angiogenic switch*, Nat Rev Cancer, 2003; 3:401-10
11. Klagsbrun, M., D'Amore, P. A., *Regulators of angiogenesis*, Annu Rev Physiol, 1991; 53:217-39
12. Folkman, J., Shing, Y., *Angiogenesis*, J Biol Chem, 1992; 267:10931-4
13. Ferrara, N., Bunting, S., *Vascular endothelial growth factor, a specific regulator of angiogenesis*, Curr Opin Nephrol Hypertens, 1996; 5:35-44
14. Ferrara, N., Carver-Moore, K., Chen, H., Dowd, M., Lu, L., O'Shea, K. S., Powell-Braxton, L., Hillan, K. J., Moore, M. W., *Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene*, Nature, 1996; 380:439-42
15. Carmeliet, P., Ferreira, V., Breier, G., Pollefeyt, S., Kieckens, L., Gertsenstein, M., Fahrig, M., Vandenhoeck, A., Harpal, K., Eberhardt, C., Declercq, C., Pawling, J., Moons, L., Collen, D., Risau, W., Nagy, A., *Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele*, Nature, 1996; 380:435-9
16. Drake, C. J., Little, C. D., *Exogenous vascular endothelial growth factor induces malformed and hyperfused vessels during embryonic neovascularization*, Proc Natl Acad Sci U S A, 1995; 92:7657-61
17. Ferrara, N., Davis-Smyth, T., *The biology of vascular endothelial growth factor*, Endocr Rev, 1997; 18:4-25

18. Clauss, M., Gerlach, M., Gerlach, H., Brett, J., Wang, F., Familletti, P. C., Pan, Y. C., Olander, J. V., Connolly, D. T., Stern, D., *Vascular permeability factor: a tumor-derived polypeptide that induces endothelial cell and monocyte procoagulant activity, and promotes monocyte migration*, J Exp Med, 1990; 172:1535-45
19. Senger, D. R., Galli, S. J., Dvorak, A. M., Perruzzi, C. A., Harvey, V. S., Dvorak, H. F., *Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid*, Science, 1983; 219:983-5
20. Ferrara, N., Henzel, W. J., *Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells*, Biochem Biophys Res Commun, 1989; 161:851-8
21. Connolly, D. T., Olander, J. V., Heuvelman, D., Nelson, R., Monsell, R., Siegel, N., Haymore, B. L., Leimgruber, R., Feder, J., *Human vascular permeability factor. Isolation from U937 cells*, J Biol Chem, 1989; 264:20017-24
22. Leung, D. W., Cachianes, G., Kuang, W. J., Goeddel, D. V., Ferrara, N., *Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen*, Science, 1989; 246:1306-9
23. Vincenti, V., Cassano, C., Rocchi, M., Persico, G., *Assignment of the vascular endothelial growth factor gene to human chromosome 6p21.3*, Circulation, 1996; 93:1493-5
24. Houck, K. A., Ferrara, N., Winer, J., Cachianes, G., Li, B., Leung, D. W., *The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA*, Mol Endocrinol, 1991; 5:1806-14
25. Tischer, E., Mitchell, R., Hartman, T., Silva, M., Gospodarowicz, D., Fiddes, J. C., Abraham, J. A., *The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing*, J Biol Chem, 1991; 266:11947-54
26. Plouet, J., Schilling, J., Gospodarowicz, D., *Isolation and characterization of a newly identified endothelial cell mitogen produced by AtT-20 cells*, Embo J, 1989; 8:3801-6
27. Houck, K. A., Leung, D. W., Rowland, A. M., Winer, J., Ferrara, N., *Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms*, J Biol Chem, 1992; 267:26031-7
28. Park, J. E., Keller, G. A., Ferrara, N., *The vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms: differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of extracellular matrix-bound VEGF*, Mol Biol Cell, 1993; 4:1317-26

29. Plouet, J., Moro, F., Bertagnolli, S., Coldeboeuf, N., Mazarguil, H., Clamens, S., Bayard, F., *Extracellular cleavage of the vascular endothelial growth factor 189-amino acid form by urokinase is required for its mitogenic effect*, J Biol Chem, 1997; 272:13390-6
30. Deryugina, E. I., Soroceanu, L., Strongin, A. Y., *Up-regulation of vascular endothelial growth factor by membrane-type 1 matrix metalloproteinase stimulates human glioma xenograft growth and angiogenesis*, Cancer Res, 2002; 62:580-8
31. Dor, Y., Porat, R., Keshet, E., *Vascular endothelial growth factor and vascular adjustments to perturbations in oxygen homeostasis*, Am J Physiol Cell Physiol, 2001; 280:C1367-74
32. Pugh, C. W., Ratcliffe, P. J., *Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system*, Nat Med, 2003; 9:677-84
33. Forsythe, J. A., Jiang, B. H., Iyer, N. V., Agani, F., Leung, S. W., Koos, R. D., Semenza, G. L., *Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1*, Mol Cell Biol, 1996; 16:4604-13
34. Neufeld, G., Cohen, T., Gengrinovitch, S., Poltorak, Z., *Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors*, Faseb J, 1999; 13:9-22
35. Shibuya, M., Yamaguchi, S., Yamane, A., Ikeda, T., Tojo, A., Matsushime, H., Sato, M., *Nucleotide sequence and expression of a novel human receptor-type tyrosine kinase gene (flt) closely related to the fms family*, Oncogene, 1990; 5:519-24
36. Terman, B. I., Carrion, M. E., Kovacs, E., Rasmussen, B. A., Eddy, R. L., Shows, T. B., *Identification of a new endothelial cell growth factor receptor tyrosine kinase*, Oncogene, 1991; 6:1677-83
37. Joukov, V., Pajusola, K., Kaipainen, A., Chilov, D., Lahtinen, I., Kukk, E., Saksela, O., Kalkkinen, N., Alitalo, K., *A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C, is a ligand for the Flt4 (VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2) receptor tyrosine kinases*, Embo J, 1996; 15:290-98
38. Ferrara, N., Gerber, H. P., LeCouter, J., *The biology of VEGF and its receptors*, Nat Med, 2003; 9:669-76
39. Zachary, I., Glikli, G., *Signaling transduction mechanisms mediating biological actions of the vascular endothelial growth factor family*, Cardiovasc Res, 2001; 49:568-81
40. Petrova, T. V., Makinen, T., Alitalo, K., *Signaling via vascular endothelial growth factor receptors*, Exp Cell Res, 1999; 253:117-30
41. Matsumoto, T., Claesson-Welsh, L., *VEGF receptor signal transduction*, Sci STKE, 2001; 2001:RE21

42. Waltenberger, J., Claesson-Welsh, L., Siegbahn, A., Shibuya, M., Heldin, C. H., *Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor*, J Biol Chem, 1994; 269:26988-95
43. Seetharam, L., Gotoh, N., Maru, Y., Neufeld, G., Yamaguchi, S., Shibuya, M., *A unique signal transduction from FLT tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor VEGF*, Oncogene, 1995; 10:135-47
44. Kendall, R. L., Thomas, K. A., *Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor*, Proc Natl Acad Sci U S A, 1993; 90:10705-9
45. Huang, K., Andersson, C., Roomans, G. M., Ito, N., Claesson-Welsh, L., *Signaling properties of VEGF receptor-1 and -2 homo- and heterodimers*, Int J Biochem Cell Biol, 2001; 33:315-24
46. Dixelius, J., Makinen, T., Wirzenius, M., Karkkainen, M. J., Wernstedt, C., Alitalo, K., Claesson-Welsh, L., *Ligand-induced vascular endothelial growth factor receptor-3 (VEGFR-3) heterodimerization with VEGFR-2 in primary lymphatic endothelial cells regulates tyrosine phosphorylation sites*, J Biol Chem, 2003; 278:40973-9
47. Neagoe, P. E., Lemieux, C., Sirois, M. G., *Vascular endothelial growth factor (VEGF)-A165-induced prostacyclin synthesis requires the activation of VEGF receptor-1 and -2 heterodimer*, J Biol Chem, 2005; 280:9904-12
48. de Vries, C., Escobedo, J. A., Ueno, H., Houck, K., Ferrara, N., Williams, L. T., *The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor*, Science, 1992; 255:989-91
49. Fong, G. H., Rossant, J., Gertsenstein, M., Breitman, M. L., *Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium*, Nature, 1995; 376:66-70
50. Hiratsuka, S., Minowa, O., Kuno, J., Noda, T., Shibuya, M., *Flt-1 lacking the tyrosine kinase domain is sufficient for normal development and angiogenesis in mice*, Proc Natl Acad Sci U S A, 1998; 95:9349-54
51. Park, J. E., Chen, H. H., Winer, J., Houck, K. A., Ferrara, N., *Placenta growth factor. Potentiation of vascular endothelial growth factor bioactivity, in vitro and in vivo, and high affinity binding to Flt-1 but not to Flk-1/KDR*, J Biol Chem, 1994; 269:25646-54
52. Olofsson, B., Korpelainen, E., Pepper, M. S., Mandriota, S. J., Aase, K., Kumar, V., Gunji, Y., Jeltsch, M. M., Shibuya, M., Alitalo, K., Eriksson, U., *Vascular endothelial growth factor B (VEGF-B) binds to VEGF receptor-1 and regulates plasminogen activator activity in endothelial cells*, Proc Natl Acad Sci U S A, 1998; 95:11709-14

53. Davis-Smyth, T., Chen, H., Park, J., Presta, L. G., Ferrara, N., *The second immunoglobulin-like domain of the VEGF tyrosine kinase receptor Flt-1 determines ligand binding and may initiate a signal transduction cascade*, *Embo J*, 1996; 15:4919-27
54. Cunningham, S. A., Waxham, M. N., Arrate, P. M., Brock, T. A., *Interaction of the Flt-1 tyrosine kinase receptor with the p85 subunit of phosphatidylinositol 3-kinase. Mapping of a novel site involved in binding*, *J Biol Chem*, 1995; 270:20254-7
55. Ito, N., Wernstedt, C., Engstrom, U., Claesson-Welsh, L., *Identification of vascular endothelial growth factor receptor-1 tyrosine phosphorylation sites and binding of SH2 domain-containing molecules*, *J Biol Chem*, 1998; 273:23410-8
56. Barleon, B., Sozzani, S., Zhou, D., Weich, H. A., Mantovani, A., Marme, D., *Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor flt-1*, *Blood*, 1996; 87:3336-43
57. Hiratsuka, S., Nakamura, K., Iwai, S., Murakami, M., Itoh, T., Kijima, H., Shipley, J. M., Senior, R. M., Shibuya, M., *MMP9 induction by vascular endothelial growth factor receptor-1 is involved in lung-specific metastasis*, *Cancer Cell*, 2002; 2:289-300
58. Rollin, S., Lemieux, C., Maliba, R., Favier, J., Villeneuve, L. R., Allen, B. G., Soker, S., Bazan, N. G., Merhi, Y., Sirois, M. G., *VEGF-mediated endothelial P-selectin translocation: role of VEGF receptors and endogenous PAF synthesis*, *Blood*, 2004; 103:3789-97
59. Shalaby, F., Rossant, J., Yamaguchi, T. P., Gertsenstein, M., Wu, X. F., Breitman, M. L., Schuh, A. C., *Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice*, *Nature*, 1995; 376:62-6
60. Terman, B. I., Dougher-Vermazen, M., Carrion, M. E., Dimitrov, D., Armellino, D. C., Gospodarowicz, D., Bohlen, P., *Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial cell growth factor*, *Biochem Biophys Res Commun*, 1992; 187:1579-86
61. Guo, D., Jia, Q., Song, H. Y., Warren, R. S., Donner, D. B., *Vascular endothelial cell growth factor promotes tyrosine phosphorylation of mediators of signal transduction that contain SH2 domains. Association with endothelial cell proliferation*, *J Biol Chem*, 1995; 270:6729-33
62. Kroll, J., Waltenberger, J., *The vascular endothelial growth factor receptor KDR activates multiple signal transduction pathways in porcine aortic endothelial cells*, *J Biol Chem*, 1997; 272:32521-7

63. Takahashi, T., Ueno, H., Shibuya, M., *VEGF activates protein kinase C-dependent, but Ras-independent Raf-MEK-MAP kinase pathway for DNA synthesis in primary endothelial cells*, *Oncogene*, 1999; 18:2221-30
64. Rousseau, S., Houle, F., Landry, J., Huot, J., *p38 MAP kinase activation by vascular endothelial growth factor mediates actin reorganization and cell migration in human endothelial cells*, *Oncogene*, 1997; 15:2169-77
65. Gerber, H. P., McMurtrey, A., Kowalski, J., Yan, M., Keyt, B. A., Dixit, V., Ferrara, N., *Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation*, *J Biol Chem*, 1998; 273:30336-43
66. Fulton, D., Gratton, J. P., McCabe, T. J., Fontana, J., Fujio, Y., Walsh, K., Franke, T. F., Papapetropoulos, A., Sessa, W. C., *Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt*, *Nature*, 1999; 399:597-601
67. Gitay-Goren, H., Soker, S., Vlodavsky, I., Neufeld, G., *The binding of vascular endothelial growth factor to its receptors is dependent on cell surface-associated heparin-like molecules*, *J Biol Chem*, 1992; 267:6093-8
68. Kitsukawa, T., Shimono, A., Kawakami, A., Kondoh, H., Fujisawa, H., *Overexpression of a membrane protein, neuropilin, in chimeric mice causes anomalies in the cardiovascular system, nervous system and limbs*, *Development*, 1995; 121:4309-18
69. Soker, S., Fidler, H., Neufeld, G., Klagsbrun, M., *Characterization of novel vascular endothelial growth factor (VEGF) receptors on tumor cells that bind VEGF165 via its exon 7-encoded domain*, *J Biol Chem*, 1996; 271:5761-7
70. Soker, S., Takashima, S., Miao, H. Q., Neufeld, G., Klagsbrun, M., *Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor*, *Cell*, 1998; 92:735-45
71. Bernatchez, P. N., Rollin, S., Soker, S., Sirois, M. G., *Relative effects of VEGF-A and VEGF-C on endothelial cell proliferation, migration and PAF synthesis: Role of neuropilin-1*, *J Cell Biochem*, 2002; 85:629-39
72. Kawasaki, T., Kitsukawa, T., Bekku, Y., Matsuda, Y., Sanbo, M., Yagi, T., Fujisawa, H., *A requirement for neuropilin-1 in embryonic vessel formation*, *Development*, 1999; 126:4895-902
73. Dvorak, H. F., Brown, L. F., Detmar, M., Dvorak, A. M., *Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis*, *Am J Pathol*, 1995; 146:1029-39

74. Detmar, M., Brown, L. F., Schon, M. P., Elicker, B. M., Velasco, P., Richard, L., Fukumura, D., Monsky, W., Claffey, K. P., Jain, R. K., *Increased microvascular density and enhanced leukocyte rolling and adhesion in the skin of VEGF transgenic mice*, J Invest Dermatol, 1998; 111:1-6
75. Dvorak, H. F., Detmar, M., Claffey, K. P., Nagy, J. A., van de Water, L., Senger, D. R., *Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: an important mediator of angiogenesis in malignancy and inflammation*, Int Arch Allergy Immunol, 1995; 107:233-5
76. Ku, D. D., Zaleski, J. K., Liu, S., Brock, T. A., *Vascular endothelial growth factor induces EDRF-dependent relaxation in coronary arteries*, Am J Physiol, 1993; 265:H586-92
77. Gelinas, D. S., Bernatchez, P. N., Rollin, S., Bazan, N. G., Sirois, M. G., *Immediate and delayed VEGF-mediated NO synthesis in endothelial cells: role of PI3K, PKC and PLC pathways*, Br J Pharmacol, 2002; 137:1021-30
78. Wheeler-Jones, C., Abu-Ghazaleh, R., Cospedal, R., Houlston, R. A., Martin, J., Zachary, I., *Vascular endothelial growth factor stimulates prostacyclin production and activation of cytosolic phospholipase A2 in endothelial cells via p42/p44 mitogen-activated protein kinase*, FEBS Lett, 1997; 420:28-32
79. Sirois, M. G., Edelman, E. R., *VEGF effect on vascular permeability is mediated by synthesis of platelet-activating factor*, Am J Physiol, 1997; 272:H2746-56
80. Folkman, J., *Angiogenesis and angiogenesis inhibition: an overview*, Exs, 1997; 79:1-8
81. Zucker, S., Mirza, H., Conner, C. E., Lorenz, A. F., Drews, M. H., Bahou, W. F., Jesty, J., *Vascular endothelial growth factor induces tissue factor and matrix metalloproteinase production in endothelial cells: conversion of prothrombin to thrombin results in progelatinase A activation and cell proliferation*, Int J Cancer, 1998; 75:780-6
82. Pepper, M. S., Ferrara, N., Orci, L., Montesano, R., *Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces plasminogen activators and plasminogen activator inhibitor-1 in microvascular endothelial cells*, Biochem Biophys Res Commun, 1991; 181:902-6
83. Unemori, E. N., Ferrara, N., Bauer, E. A., Amento, E. P., *Vascular endothelial growth factor induces interstitial collagenase expression in human endothelial cells*, J Cell Physiol, 1992; 153:557-62
84. Pepper, M. S., Ferrara, N., Orci, L., Montesano, R., *Potent synergism between vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in the induction of angiogenesis in vitro*, Biochem Biophys Res Commun, 1992; 189:824-31

85. Nakatsu, M. N., Sainson, R. C., Perez-del-Pulgar, S., Aoto, J. N., Aitkenhead, M., Taylor, K. L., Carpenter, P. M., Hughes, C. C., *VEGF(121) and VEGF(165) regulate blood vessel diameter through vascular endothelial growth factor receptor 2 in an in vitro angiogenesis model*, *Lab Invest*, 2003; 83:1873-85
86. Pekala, P., Marlow, M., Heuvelman, D., Connolly, D., *Regulation of hexose transport in aortic endothelial cells by vascular permeability factor and tumor necrosis factor-alpha, but not by insulin*, *J Biol Chem*, 1990; 265:18051-4
87. Zhang, H., Issekutz, A. C., *Growth factor regulation of neutrophil-endothelial cell interactions*, *J Leukoc Biol*, 2001; 70:225-32
88. Le Boeuf, F., Houle, F., Huot, J., *Regulation of vascular endothelial growth factor receptor 2-mediated phosphorylation of focal adhesion kinase by heat shock protein 90 and Src kinase activities*, *J Biol Chem*, 2004; 279:39175-85
89. Abedi, H., Zachary, I., *Signalling mechanisms in the regulation of vascular cell migration*, *Cardiovasc Res*, 1995; 30:544-56
90. Tran, J., Rak, J., Sheehan, C., Saibil, S. D., LaCasse, E., Korneluk, R. G., Kerbel, R. S., *Marked induction of the IAP family antiapoptotic proteins survivin and XIAP by VEGF in vascular endothelial cells*, *Biochem Biophys Res Commun*, 1999; 264:781-8
91. Gerber, H. P., Dixit, V., Ferrara, N., *Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells*, *J Biol Chem*, 1998; 273:13313-6
92. Franke, T. F., Kaplan, D. R., Cantley, L. C., Toker, A., *Direct regulation of the Akt proto-oncogene product by phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate*, *Science*, 1997; 275:665-8
93. Toker, A., Newton, A. C., *Akt/protein kinase B is regulated by autophosphorylation at the hypothetical PDK-2 site*, *J Biol Chem*, 2000; 275:8271-4
94. Gratton, J. P., Morales-Ruiz, M., Kureishi, Y., Fulton, D., Walsh, K., Sessa, W. C., *Akt down-regulation of p38 signaling provides a novel mechanism of vascular endothelial growth factor-mediated cytoprotection in endothelial cells*, *J Biol Chem*, 2001; 276:30359-65
95. Jain, R. K., Munn, L. L., *Leaky vessels? Call Ang1!* *Nat Med*, 2000; 6:131-2
96. Sato, T. N., Tozawa, Y., Deutsch, U., Wolburg-Buchholz, K., Fujiwara, Y., Gendron-Maguire, M., Gridley, T., Wolburg, H., Risau, W., Qin, Y., *Distinct roles of the receptor tyrosine kinases Tie-1 and Tie-2 in blood vessel formation*, *Nature*, 1995; 376:70-4

97. Puri, M. C., Rossant, J., Alitalo, K., Bernstein, A., Partanen, J., *The receptor tyrosine kinase TIE is required for integrity and survival of vascular endothelial cells*, *Embo J*, 1995; 14:5884-91
98. Suri, C., Jones, P. F., Patan, S., Bartunkova, S., Maisonpierre, P. C., Davis, S., Sato, T. N., Yancopoulos, G. D., *Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis*, *Cell*, 1996; 87:1171-80
99. Gale, N. W., Thurston, G., Hackett, S. F., Renard, R., Wang, Q., McClain, J., Martin, C., Witte, C., Witte, M. H., Jackson, D., Suri, C., Campochiaro, P. A., Wiegand, S. J., Yancopoulos, G. D., *Angiopoietin-2 is required for postnatal angiogenesis and lymphatic patterning, and only the latter role is rescued by Angiopoietin-1*, *Dev Cell*, 2002; 3:411-23
100. Thurston, G., Suri, C., Smith, K., McClain, J., Sato, T. N., Yancopoulos, G. D., McDonald, D. M., *Leakage-resistant blood vessels in mice transgenically overexpressing angiopoietin-1*, *Science*, 1999; 286:2511-4
101. Maisonpierre, P. C., Suri, C., Jones, P. F., Bartunkova, S., Wiegand, S. J.; Radziejewski, C., Compton, D., McClain, J., Aldrich, T. H., Papadopoulos, N., Daly, T. J., Davis, S., Sato, T. N., Yancopoulos, G. D., *Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis*, *Science*, 1997; 277:55-60
102. Holash, J., Wiegand, S. J., Yancopoulos, G. D., *New model of tumor angiogenesis: dynamic balance between vessel regression and growth mediated by angiopoietins and VEGF*, *Oncogene*, 1999; 18:5356-62
103. Teichert-Kuliszewska, K., Maisonpierre, P. C., Jones, N., Campbell, A. I., Master, Z., Bendeck, M. P., Alitalo, K., Dumont, D. J., Yancopoulos, G. D., Stewart, D. J., *Biological action of angiopoietin-2 in a fibrin matrix model of angiogenesis is associated with activation of Tie2*, *Cardiovasc Res*, 2001; 49:659-70
104. Mochizuki, Y., Nakamura, T., Kanetake, H., Kanda, S., *Angiopoietin 2 stimulates migration and tube-like structure formation of murine brain capillary endothelial cells through c-Fes and c-Fyn*, *J Cell Sci*, 2002; 115:175-83
105. Lemieux, C., Maliba, R., Favier, J., Theoret, J. F., Merhi, Y., Sirois, M. G., *Angiopoietins can directly activate endothelial cells and neutrophils to promote proinflammatory responses*, *Blood*, 2005; 105:1523-30
106. Roviezzo, F., Tsigkos, S., Kotanidou, A., Bucci, M., Brancaleone, V., Cirino, G., Papapetropoulos, A., *Angiopoietin-2 causes inflammation in vivo by promoting vascular leakage*, *J Pharmacol Exp Ther*, 2005; 314:738-44
107. Tortora, G., Grabowski, S., *Principe d'anatomie et de physiologie, ERPI*

108. Dennis, E. A., *The growing phospholipase A2 superfamily of signal transduction enzymes*, Trends Biochem Sci, 1997; 22:1-2
109. Murakami, M., Kudo, I., *Diversity and regulatory functions of mammalian secretory phospholipase A2s*, Adv Immunol, 2001; 77:163-94
110. Kudo, I., Murakami, M., *Phospholipase A2 enzymes*, Prostaglandins Other Lipid Mediat, 2002; 68-69:3-58
111. Bingham, C. O., 3rd, Fijneman, R. J., Friend, D. S., Goddeau, R. P., Rogers, R. A., Austen, K. F., Arm, J. P., *Low molecular weight group IIA and group V phospholipase A(2) enzymes have different intracellular locations in mouse bone marrow-derived mast cells*, J Biol Chem, 1999; 274:31476-84
112. Nevalainen, T. J., Haapamaki, M. M., Gronroos, J. M., *Roles of secretory phospholipases A(2) in inflammatory diseases and trauma*, Biochim Biophys Acta, 2000; 1488:83-90
113. Jackson, J. R., Bolognese, B., Mangar, C. A., Hubbard, W. C., Marshall, L. A., Winkler, J. D., *The role of platelet activating factor and other lipid mediators in inflammatory angiogenesis*, Biochim Biophys Acta, 1998; 1392:145-52
114. Balboa, M. A., Balsinde, J., Winstead, M. V., Tischfield, J. A., Dennis, E. A., *Novel group V phospholipase A2 involved in arachidonic acid mobilization in murine P388D1 macrophages*, J Biol Chem, 1996; 271:32381-4
115. Balsinde, J., Balboa, M. A., Dennis, E. A., *Functional coupling between secretory phospholipase A2 and cyclooxygenase-2 and its regulation by cytosolic group IV phospholipase A2*, Proc Natl Acad Sci U S A, 1998; 95:7951-6
116. Shinohara, H., Balboa, M. A., Johnson, C. A., Balsinde, J., Dennis, E. A., *Regulation of delayed prostaglandin production in activated P388D1 macrophages by group IV cytosolic and group V secretory phospholipase A2s*, J Biol Chem, 1999; 274:12263-8
117. Satake, Y., Diaz, B. L., Balestrieri, B., Lam, B. K., Kanaoka, Y., Grusby, M. J., Arm, J. P., *Role of group V phospholipase A2 in zymosan-induced eicosanoid generation and vascular permeability revealed by targeted gene disruption*, J Biol Chem, 2004; 279:16488-94
118. Sawada, H., Murakami, M., Enomoto, A., Shimbara, S., Kudo, I., *Regulation of type V phospholipase A2 expression and function by proinflammatory stimuli*, Eur J Biochem, 1999; 263:826-35
119. Ishikawa, Y., Komiyama, K., Masuda, S., Murakami, M., Akasaka, Y., Ito, K., Akishima-Fukasawa, Y., Kimura, M., Fujimoto, A., Kudo, I., Ishii, T., *Expression of type V secretory phospholipase A in myocardial remodelling after infarction*, Histopathology, 2005; 47:257-67

120. Balsinde, J., Balboa, M. A., Insel, P. A., Dennis, E. A., *Regulation and inhibition of phospholipase A2*, *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 1999; 39:175-89
121. Winstead, M. V., Balsinde, J., Dennis, E. A., *Calcium-independent phospholipase A(2): structure and function*, *Biochim Biophys Acta*, 2000; 1488:28-39
122. Atsumi, G., Murakami, M., Kojima, K., Hadano, A., Tajima, M., Kudo, I., *Distinct roles of two intracellular phospholipase A2s in fatty acid release in the cell death pathway. Proteolytic fragment of type IVA cytosolic phospholipase A2alpha inhibits stimulus-induced arachidonate release, whereas that of type VI Ca2+-independent phospholipase A2 augments spontaneous fatty acid release*, *J Biol Chem*, 2000; 275:18248-58
123. Fonteh, A. N., Atsumi, G., LaPorte, T., Chilton, F. H., *Secretory phospholipase A2 receptor-mediated activation of cytosolic phospholipase A2 in murine bone marrow-derived mast cells*, *J Immunol*, 2000; 165:2773-82
124. Pickard, R. T., Striffler, B. A., Kramer, R. M., Sharp, J. D., *Molecular cloning of two new human paralogs of 85-kDa cytosolic phospholipase A2*, *J Biol Chem*, 1999; 274:8823-31
125. Hirabayashi, T., Shimizu, T., *Localization and regulation of cytosolic phospholipase A(2)*, *Biochim Biophys Acta*, 2000; 1488:124-38
126. Lin, L. L., Wartmann, M., Lin, A. Y., Knopf, J. L., Seth, A., Davis, R. J., *cPLA2 is phosphorylated and activated by MAP kinase*, *Cell*, 1993; 72:269-78
127. Hefner, Y., Borsch-Haubold, A. G., Murakami, M., Wilde, J. I., Pasquet, S., Schieltz, D., Ghomashchi, F., Yates, J. R., 3rd, Armstrong, C. G., Paterson, A., Cohen, P., Fukunaga, R., Hunter, T., Kudo, I., Watson, S. P., Gelb, M. H., *Serine 727 phosphorylation and activation of cytosolic phospholipase A2 by MNK1-related protein kinases*, *J Biol Chem*, 2000; 275:37542-51
128. Hattori, K., Adachi, H., Matsuzawa, A., Yamamoto, K., Tsujimoto, M., Aoki, J., Hattori, M., Arai, H., Inoue, K., *cDNA cloning and expression of intracellular platelet-activating factor (PAF) acetylhydrolase II. Its homology with plasma PAF acetylhydrolase*, *J Biol Chem*, 1996; 271:33032-8
129. Henson, P. M., *Release of vasoactive amines from rabbit platelets induced by sensitized mononuclear leukocytes and antigen*, *J Exp Med*, 1970; 131:287-306
130. Prescott, S. M., Zimmerman, G. A., McIntyre, T. M., *Platelet-activating factor*, *J Biol Chem*, 1990; 265:17381-4

131. Peplow, P. V., *Regulation of platelet-activating factor (PAF) activity in human diseases by phospholipase A2 inhibitors, PAF acetylhydrolases, PAF receptor antagonists and free radical scavengers*, Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 1999; 61:65-82
132. Montrucchio, G., Alloatti, G., Camussi, G., *Role of platelet-activating factor in cardiovascular pathophysiology*, Physiol Rev, 2000; 80:1669-99
133. Stafforini, D. M., McIntyre, T. M., Zimmerman, G. A., Prescott, S. M., *Platelet-activating factor, a pleiotrophic mediator of physiological and pathological processes*, Crit Rev Clin Lab Sci, 2003; 40:643-72
134. Lorant, D. E., Topham, M. K., Whatley, R. E., McEver, R. P., McIntyre, T. M., Prescott, S. M., Zimmerman, G. A., *Inflammatory roles of P-selectin*, J Clin Invest, 1993; 92:559-70
135. Prescott, S. M., McIntyre, T. M., Zimmerman, G. A., Stafforini, D. M., *Inflammation as an early component of atherosclerosis and vascular damage--a role for P-selectin and platelet-activating factor*, Jpn Circ J, 1996; 60:137-41
136. Kester, M., Ledvora, R. F., Barany, M., *The potentiation of arterial contraction with platelet activating factor*, Pflugers Arch, 1984; 400:200-2
137. Bussolino, F., Camussi, G., *Platelet-activating factor produced by endothelial cells. A molecule with autocrine and paracrine properties*, Eur J Biochem, 1995; 229:327-37
138. Bussolino, F., Camussi, G., Aglietta, M., Braquet, P., Bosia, A., Pescarmona, G., Sanavio, F., D'Urso, N., Marchisio, P. C., *Human endothelial cells are target for platelet-activating factor. I. Platelet-activating factor induces changes in cytoskeleton structures*, J Immunol, 1987; 139:2439-46
139. Peplow, P. V., Mikhailidis, D. P., *Platelet-activating factor (PAF) and its relation to prostaglandins, leukotrienes and other aspects of arachidonate metabolism*, Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 1990; 41:71-82
140. Albert, D. H., Snyder, F., *Biosynthesis of 1-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine (platelet-activating factor) from 1-alkyl-2-acyl-sn-glycero-3-phosphocholine by rat alveolar macrophages. Phospholipase A2 and acetyltransferase activities during phagocytosis and ionophore stimulation*, J Biol Chem, 1983; 258:97-102
141. Zimmerman, G. A., Lorant, D. E., McIntyre, T. M., Prescott, S. M., *Juxtacrine intercellular signaling: another way to do it*, Am J Respir Cell Mol Biol, 1993; 9:573-7
142. Zimmerman, G. A., McIntyre, T. M., Prescott, S. M., Otsuka, K., *Brief review: molecular mechanisms of neutrophil binding to endothelium involving*

- platelet-activating factor and cytokines*, J Lipid Mediat, 1990; 2 Suppl:S31-43
143. Satoh, K., Imaizumi, T., Kawamura, Y., Yoshida, H., Hiramoto, M., Takamatsu, S., Takamatsu, M., *Platelet-activating factor (PAF) stimulates the production of PAF acetylhydrolase by the human hepatoma cell line, HepG2*, J Clin Invest, 1991; 87:476-81
 144. Bernatchez, P. N., Soker, S., Sirois, M. G., *Vascular endothelial growth factor effect on endothelial cell proliferation, migration, and platelet-activating factor synthesis is Flk-1-dependent*, J Biol Chem, 1999; 274:31047-54
 145. Bernatchez, P. N., Allen, B. G., Gelinas, D. S., Guillemette, G., Sirois, M. G., *Regulation of VEGF-induced endothelial cell PAF synthesis: role of p42/44 MAPK, p38 MAPK and PI3K pathways*, Br J Pharmacol, 2001; 134:1253-62
 146. Nemenoff, R. A., Winitz, S., Qian, N. X., Van Putten, V., Johnson, G. L., Heasley, L. E., *Phosphorylation and activation of a high molecular weight form of phospholipase A2 by p42 microtubule-associated protein 2 kinase and protein kinase C*, J Biol Chem, 1993; 268:1960-4
 147. Uozumi, N., Kume, K., Nagase, T., Nakatani, N., Ishii, S., Tashiro, F., Komagata, Y., Maki, K., Ikuta, K., Ouchi, Y., Miyazaki, J., Shimizu, T., *Role of cytosolic phospholipase A2 in allergic response and parturition*, Nature, 1997; 390:618-22
 148. Baker, P. R., Owen, J. S., Nixon, A. B., Thomas, L. N., Wooten, R., Daniel, L. W., O'Flaherty, J. T., Wykle, R. L., *Regulation of platelet-activating factor synthesis in human neutrophils by MAP kinases*, Biochim Biophys Acta, 2002; 1592:175-84
 149. Murakami, M., Nakatani, Y., Atsumi, G., Inoue, K., Kudo, I., *Regulatory functions of phospholipase A2*, Crit Rev Immunol, 1997; 17:225-83
 150. Uemura, Y., Lee, T. C., Snyder, F., *A coenzyme A-independent transacylase is linked to the formation of platelet-activating factor (PAF) by generating the lyso-PAF intermediate in the remodeling pathway*, J Biol Chem, 1991; 266:8268-72
 151. Nixon, A. B., O'Flaherty, J. T., Salyer, J. K., Wykle, R. L., *Acetyl-CoA:1-O-alkyl-2-lyso-sn-glycero-3-phosphocholine acetyltransferase is directly activated by p38 kinase*, J Biol Chem, 1999; 274:5469-73
 152. Bernatchez, P. N., Winstead, M. V., Dennis, E. A., Sirois, M. G., *VEGF stimulation of endothelial cell PAF synthesis is mediated by group V 14 kDa secretory phospholipase A2*, Br J Pharmacol, 2001; 134:197-205
 153. Cho, W., *Structure, function, and regulation of group V phospholipase A(2)*, Biochim Biophys Acta, 2000; 1488:48-58

154. Marshall, L. A., Bolognese, B., Roshak, A., *Respective roles of the 14 kDa and 85 kDa phospholipase A2 enzymes in human monocyte eicosanoid formation*, *Adv Exp Med Biol*, 1999; 469:215-9
155. Murakami, M., Koduri, R. S., Enomoto, A., Shimbara, S., Seki, M., Yoshihara, K., Singer, A., Valentin, E., Ghomashchi, F., Lambeau, G., Gelb, M. H., Kudo, I., *Distinct arachidonate-releasing functions of mammalian secreted phospholipase A2s in human embryonic kidney 293 and rat mastocytoma RBL-2H3 cells through heparan sulfate shuttling and external plasma membrane mechanisms*, *J Biol Chem*, 2001; 276:10083-96
156. Camussi, G., Montrucchio, G., Lupia, E., De Martino, A., Perona, L., Arese, M., Vercellone, A., Toniolo, A., Bussolino, F., *Platelet-activating factor directly stimulates in vitro migration of endothelial cells and promotes in vivo angiogenesis by a heparin-dependent mechanism*, *J Immunol*, 1995; 154:6492-501
157. Andrade, S. P., Vieira, L. B., Bakhle, Y. S., Piper, P. J., *Effects of platelet activating factor (PAF) and other vasoconstrictors on a model of angiogenesis in the mouse*, *Int J Exp Pathol*, 1992; 73:503-13
158. Bussolino, F., Arese, M., Montrucchio, G., Barra, L., Primo, L., Benelli, R., Sanavio, F., Aglietta, M., Ghigo, D., Rola-Pleszczynski, M. R., et al., *Platelet activating factor produced in vitro by Kaposi's sarcoma cells induces and sustains in vivo angiogenesis*, *J Clin Invest*, 1995; 96:940-52
159. Pitton, C., Lanson, M., Besson, P., Fetissoff, F., Lansac, J., Benveniste, J., Bougnoux, P., *Presence of PAF-acether in human breast carcinoma: relation to axillary lymph node metastasis*, *J Natl Cancer Inst*, 1989; 81:1298-302
160. Montrucchio, G., Sapino, A., Bussolati, B., Ghisolfi, G., Rizea-Savu, S., Silvestro, L., Lupia, E., Camussi, G., *Potential angiogenic role of platelet-activating factor in human breast cancer*, *Am J Pathol*, 1998; 153:1589-96
161. Maggi, M., Bonaccorsi, L., Finetti, G., Carloni, V., Muratori, M., Laffi, G., Forti, G., Serio, M., Baldi, E., *Platelet-activating factor mediates an autocrine proliferative loop in the endometrial adenocarcinoma cell line HEC-1A*, *Cancer Res*, 1994; 54:4777-84
162. Biancone, L., Cantaluppi, V., Boccellino, M., Bussolati, B., Del Sorbo, L., Conaldi, P. G., Albini, A., Toniolo, A., Camussi, G., *Motility induced by human immunodeficiency virus-1 Tat on Kaposi's sarcoma cells requires platelet-activating factor synthesis*, *Am J Pathol*, 1999; 155:1731-9
163. Ferreira, M. A., Barcelos, L. S., Campos, P. P., Vasconcelos, A. C., Teixeira, M. M., Andrade, S. P., *Sponge-induced angiogenesis and inflammation in PAF receptor-deficient mice (PAFR-KO)*, *Br J Pharmacol*, 2004; 141:1185-92

164. Folkman, J., *Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease*, Nat Med, 1995; 1:27-31
165. Jackson, J. R., Seed, M. P., Kircher, C. H., Willoughby, D. A., Winkler, J. D., *The codependence of angiogenesis and chronic inflammation*, Faseb J, 1997; 11:457-65
166. Montrucchio, G., Lupia, E., Battaglia, E., Del Sorbo, L., Boccellino, M., Biancone, L., Emanuelli, G., Camussi, G., *Platelet-activating factor enhances vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell motility and neoangiogenesis in a murine matrigel model*, Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2000; 20:80-8
167. Bussolati, B., Biancone, L., Cassoni, P., Russo, S., Rola-Pleszczynski, M., Montrucchio, G., Camussi, G., *PAF produced by human breast cancer cells promotes migration and proliferation of tumor cells and neo-angiogenesis*, Am J Pathol, 2000; 157:1713-25
168. Kyriakis, J. M., Avruch, J., *Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation*, Physiol Rev, 2001; 81:807-69
169. Chen, Z., Gibson, T. B., Robinson, F., Silvestro, L., Pearson, G., Xu, B., Wright, A., Vanderbilt, C., Cobb, M. H., *MAP kinases*, Chem Rev, 2001; 101:2449-76
170. Edelman, A. M., Blumenthal, D. K., Krebs, E. G., *Protein serine/threonine kinases*, Annu Rev Biochem, 1987; 56:567-613
171. Krebs, E. G., *The phosphorylation of proteins: a major mechanism for biological regulation. Fourteenth Sir Frederick Gowland Hopkins memorial lecture*, Biochem Soc Trans, 1985; 13:813-20
172. Cohen, P., *The structure and regulation of protein phosphatases*, Annu Rev Biochem, 1989; 58:453-508
173. O'Neill, E., Kolch, W., *Conferring specificity on the ubiquitous Raf/MEK signalling pathway*, Br J Cancer, 2004; 90:283-8
174. Seger, R., Krebs, E. G., *The MAPK signaling cascade*, Faseb J, 1995; 9:726-35
175. Frodin, M., Gammeltoft, S., *Role and regulation of 90 kDa ribosomal S6 kinase (RSK) in signal transduction*, Mol Cell Endocrinol, 1999; 151:65-77
176. Deak, M., Clifton, A. D., Lucocq, L. M., Alessi, D. R., *Mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1) is directly activated by MAPK and SAPK2/p38, and may mediate activation of CREB*, Embo J, 1998; 17:4426-41

177. Fukunaga, R., Hunter, T., *MNK1, a new MAP kinase-activated protein kinase, isolated by a novel expression screening method for identifying protein kinase substrates*, *Embo J*, 1997; 16:1921-33
178. Klemke, R. L., Cai, S., Giannini, A. L., Gallagher, P. J., de Lanerolle, P., Cheresh, D. A., *Regulation of cell motility by mitogen-activated protein kinase*, *J Cell Biol*, 1997; 137:481-92
179. Hunger-Glaser, I., Salazar, E. P., Sinnott-Smith, J., Rozengurt, E., *Bombesin, lysophosphatidic acid, and epidermal growth factor rapidly stimulate focal adhesion kinase phosphorylation at Ser-910: requirement for ERK activation*, *J Biol Chem*, 2003; 278:22631-43
180. Glading, A., Bodnar, R. J., Reynolds, I. J., Shiraha, H., Satish, L., Potter, D. A., Blair, H. C., Wells, A., *Epidermal growth factor activates m-calpain (calpain II), at least in part, by extracellular signal-regulated kinase-mediated phosphorylation*, *Mol Cell Biol*, 2004; 24:2499-512
181. Liu, Z. X., Yu, C. F., Nickel, C., Thomas, S., Cantley, L. G., *Hepatocyte growth factor induces ERK-dependent paxillin phosphorylation and regulates paxillin-focal adhesion kinase association*, *J Biol Chem*, 2002; 277:10452-8
182. Tibbles, L. A., Woodgett, J. R., *The stress-activated protein kinase pathways*, *Cell Mol Life Sci*, 1999; 55:1230-54
183. Rousseau, S., Houle, F., Kotanides, H., Witte, L., Waltenberger, J., Landry, J., Huot, J., *Vascular endothelial growth factor (VEGF)-driven actin-based motility is mediated by VEGFR2 and requires concerted activation of stress-activated protein kinase 2 (SAPK2/p38) and geldanamycin-sensitive phosphorylation of focal adhesion kinase*, *J Biol Chem*, 2000; 275:10661-72
184. Pierrat, B., Correia, J. S., Mary, J. L., Tomas-Zuber, M., Lesslauer, W., *RSK-B, a novel ribosomal S6 kinase family member, is a CREB kinase under dominant control of p38alpha mitogen-activated protein kinase (p38alphaMAPK)*, *J Biol Chem*, 1998; 273:29661-71
185. Frodin, M., Antal, T. L., Dummler, B. A., Jensen, C. J., Deak, M., Gammeltoft, S., Biondi, R. M., *A phosphoserine/threonine-binding pocket in AGC kinases and PDK1 mediates activation by hydrophobic motif phosphorylation*, *Embo J*, 2002; 21:5396-407
186. Williams, M. R., Arthur, J. S., Balendran, A., van der Kaay, J., Poli, V., Cohen, P., Alessi, D. R., *The role of 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1 in activating AGC kinases defined in embryonic stem cells*, *Curr Biol*, 2000; 10:439-48
187. Arthur, J. S., Cohen, P., *MSK1 is required for CREB phosphorylation in response to mitogens in mouse embryonic stem cells*, *FEBS Lett*, 2000; 482:44-8

188. Caivano, M., Cohen, P., *Role of mitogen-activated protein kinase cascades in mediating lipopolysaccharide-stimulated induction of cyclooxygenase-2 and IL-1 beta in RAW264 macrophages*, J Immunol, 2000; 164:3018-25
189. McCoy, C. E., Campbell, D. G., Deak, M., Bloomberg, G. B., Arthur, J. S., *MSK1 activity is controlled by multiple phosphorylation sites*, Biochem J, 2005; 387:507-17
190. Smith, K. J., Carter, P. S., Bridges, A., Horrocks, P., Lewis, C., Pettman, G., Clarke, A., Brown, M., Hughes, J., Wilkinson, M., Bax, B., Reith, A., *The structure of MSK1 reveals a novel autoinhibitory conformation for a dual kinase protein*, Structure (Camb), 2004; 12:1067-77
191. Arthur, J. S., Fong, A. L., Dwyer, J. M., Davare, M., Reese, E., Obrietan, K., Impey, S., *Mitogen- and stress-activated protein kinase 1 mediates cAMP response element-binding protein phosphorylation and activation by neurotrophins*, J Neurosci, 2004; 24:4324-32
192. Delghandi, M. P., Johannessen, M., Moens, U., *The cAMP signalling pathway activates CREB through PKA, p38 and MSK1 in NIH 3T3 cells*, Cell Signal, 2005; 17:1343-51
193. Ait-Mamar, B., Cailleret, M., Rucker-Martin, C., Bouabdallah, A., Candiani, G., Adamy, C., Duvaldestin, P., Pecker, F., Defer, N., Pavoine, C., *The cytosolic phospholipase A2 pathway, a safeguard of beta2-adrenergic cardiac effects in rat*, J Biol Chem, 2005; 280:18881-90
194. Vermeulen, L., De Wilde, G., Van Damme, P., Vanden Berghe, W., Haegeman, G., *Transcriptional activation of the NF-kappaB p65 subunit by mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1)*, Embo J, 2003; 22:1313-24
195. Markou, T., Vassort, G., Lazou, A., *Regulation of MAPK pathways in response to purinergic stimulation of adult rat cardiac myocytes*, Mol Cell Biochem, 2003; 242:163-71
196. Pavoine, C., Defer, N., *The cardiac beta2-adrenergic signalling a new role for the cPLA2*, Cell Signal, 2005; 17:141-52
197. Wiggin, G. R., Soloaga, A., Foster, J. M., Murray-Tait, V., Cohen, P., Arthur, J. S., *MSK1 and MSK2 are required for the mitogen- and stress-induced phosphorylation of CREB and ATF1 in fibroblasts*, Mol Cell Biol, 2002; 22:2871-81
198. Thomson, S., Clayton, A. L., Hazzalin, C. A., Rose, S., Barratt, M. J., Mahadevan, L. C., *The nucleosomal response associated with immediate-early gene induction is mediated via alternative MAP kinase cascades: MSK1 as a potential histone H3/HMG-14 kinase*, Embo J, 1999; 18:4779-93

199. Soloaga, A., Thomson, S., Wiggin, G. R., Rampersaud, N., Dyson, M. H., Hazzalin, C. A., Mahadevan, L. C., Arthur, J. S., *MSK2 and MSK1 mediate the mitogen- and stress-induced phosphorylation of histone H3 and HMG-14*, *Embo J*, 2003; 22:2788-97
200. Zhang, Y., Griffin, K., Mondal, N., Parvin, J. D., *Phosphorylation of histone H2A inhibits transcription on chromatin templates*, *J Biol Chem*, 2004; 279:21866-72
201. Janknecht, R., *Regulation of the ER81 transcription factor and its coactivators by mitogen- and stress-activated protein kinase 1 (MSK1)*, *Oncogene*, 2003; 22:746-55
202. Liu, G., Zhang, Y., Bode, A. M., Ma, W. Y., Dong, Z., *Phosphorylation of 4E-BP1 is mediated by the p38/MSK1 pathway in response to UVB irradiation*, *J Biol Chem*, 2002; 277:8810-6
203. Zhang, Y., Cho, Y. Y., Petersen, B. L., Zhu, F., Dong, Z., *Evidence of STAT1 phosphorylation modulated by MAPKs, MEK1 and MSK1*, *Carcinogenesis*, 2004; 25:1165-75
204. Zhang, Y., Liu, G., Dong, Z., *MSK1 and JNKs mediate phosphorylation of STAT3 in UVA-irradiated mouse epidermal JB6 cells*, *J Biol Chem*, 2001; 276:42534-42
205. Nomura, M., Kaji, A., Ma, W. Y., Zhong, S., Liu, G., Bowden, G. T., Miyamoto, K. I., Dong, Z., *Mitogen- and stress-activated protein kinase 1 mediates activation of Akt by ultraviolet B irradiation*, *J Biol Chem*, 2001; 276:25558-67
206. Dunn, K. L., Espino, P. S., Drobnic, B., He, S., Davie, J. R., *The Ras-MAPK signal transduction pathway, cancer and chromatin remodeling*, *Biochem Cell Biol*, 2005; 83:1-14
207. Mayo, L. D., Kessler, K. M., Pincheira, R., Warren, R. S., Donner, D. B., *Vascular endothelial cell growth factor activates CRE-binding protein by signaling through the KDR receptor tyrosine kinase*, *J Biol Chem*, 2001; 276:25184-9
208. Markou, T., Lazou, A., *Phosphorylation and activation of mitogen- and stress-activated protein kinase-1 in adult rat cardiac myocytes by G-protein-coupled receptor agonists requires both extracellular-signal-regulated kinase and p38 mitogen-activated protein kinase*, *Biochem J*, 2002; 365:757-63
209. Webber, K. M., Smith, M. A., Lee, H. G., Harris, P. L., Moreira, P., Perry, G., Zhu, X., *Mitogen- and stress-activated protein kinase 1: convergence of the ERK and p38 pathways in Alzheimer's disease*, *J Neurosci Res*, 2005; 79:554-60

210. Kolch, W., *Coordinating ERK/MAPK signalling through scaffolds and inhibitors*, Nat Rev Mol Cell Biol, 2005; 6:827-37
211. Owen, J. S., Baker, P. R., O'Flaherty, J. T., Thomas, M. J., Samuel, M. P., Wooten, R. E., Wykle, R. L., *Stress-induced platelet-activating factor synthesis in human neutrophils*, Biochim Biophys Acta, 2005; 1733:120-9
212. Rakhit, S., Clark, C. J., O'Shaughnessy C, T., Morris, B. J., *N-methyl-D-aspartate and brain-derived neurotrophic factor induce distinct profiles of extracellular signal-regulated kinase, mitogen- and stress-activated kinase, and ribosomal s6 kinase phosphorylation in cortical neurons*, Mol Pharmacol, 2005; 67:1158-65
213. Tomas-Zuber, M., Mary, J. L., Lamour, F., Bur, D., Lesslauer, W., *C-terminal elements control location, activation threshold, and p38 docking of ribosomal S6 kinase B (RSKB)*, J Biol Chem, 2001; 276:5892-9
214. Gratton, J. P., Bernatchez, P., Sessa, W. C., *Caveolae and caveolins in the cardiovascular system*, Circ Res, 2004; 94:1408-17
215. Balboa, M. A., Shirai, Y., Gaietta, G., Ellisman, M. H., Balsinde, J., Dennis, E. A., *Localization of group V phospholipase A2 in caveolin-enriched granules in activated P388D1 macrophage-like cells*, J Biol Chem, 2003; 278:48059-65
216. Anderson, R. G., *The caveolae membrane system*, Annu Rev Biochem, 1998; 67:199-225
217. Kim, Y. J., Kim, K. P., Rhee, H. J., Das, S., Rafter, J. D., Oh, Y. S., Cho, W., *Internalized group V secretory phospholipase A2 acts on the perinuclear membranes*, J Biol Chem, 2002; 277:9358-65

