

FABRICE LE BOEUF

**MÉCANISMES RÉGULANT L'ACTIVATION ET LES
FONCTIONS DE LA KINASE D'ADHÉRENCE
FOCALE (FAK) EN RÉPONSE AU *VASCULAR
ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR* (VEGF) DANS
LES CELLULES ENDOTHELIALES**

Thèse présentée
à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval
dans le cadre du programme de doctorat en Biologie Moléculaire et Cellulaire
pour l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph. D.)

Biologie cellulaire et moléculaire
FACULTÉ DE MÉDECINE
UNIVERSITÉ LAVAL
QUÉBEC

2006

Résumé

L'activation des cellules endothéliales par le *vascular endothelial growth factor* (VEGF) conduit à la formation d'un complexe contenant le VEGFR2 et l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. Dans ce projet de recherche, nous avons cherché à déterminer les mécanismes par lesquels l'association des récepteurs VEGFR2- $\alpha_v\beta_3$ régule l'activation de la kinase d'adhérence focale (FAK) par le VEGF.

La constitution du complexe VEGFR2- $\alpha_v\beta_3$ est associée au recrutement de la protéine chaperonne *Heat shock protein 90* (HSP90) sur le VEGFR2. L'interaction de ce dernier avec HSP90 implique les 130 derniers acides aminés du récepteur et est nécessaire à l'activation de la petite GTPase RhoA et de la *RhoA dépendant kinase* (ROCK) en réponse au VEGF. L'activation de la kinase ROCK conduit par la suite et de manière directe, à la phosphorylation de FAK sur le résidu sérine 732. Ceci entraîne un changement de conformation dans la structure tridimensionnelle de FAK qui rend son résidu tyrosine 407 accessible à la phosphorylation par un membre de la famille de protéines FAK à activité tyrosine kinase non récepteur : la *Proline-rich tyrosine kinase- 2* (Pyk2). Pyk2 est en effet activée par le VEGF en aval de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. Ces résultats ont été confirmés par l'utilisation de *siRNA* ciblant ROCK et Pyk2. La phosphorylation des résidus sérine 732 et tyrosine 407 sont tous deux impliqués dans le recrutement de la vinculine aux plaques ventrales dans les cellules endothéliales en réponse au VEGF. Finalement, en utilisant des cellules embryonnaires MEF FAK^{-/-} et des *siRNA* ciblant FAK dans les cellules HUVEC, nous avons démontré le rôle crucial de la phosphorylation de ces deux résidus dans la migration cellulaire.

Nos résultats montrent pour la première fois que l'activation des voies VEGFR2/ HSP90/ ROCK-Ser732 et de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ / Pyk2-Y407 en réponse au VEGF sont toutes deux nécessaires aux fonctions par lesquelles FAK régule le recrutement de protéines aux points focaux d'adhérence et la migration cellulaire.

Abstract

Exposure of endothelial cells to vascular endothelial growth factor (VEGF) induces the formation of an oligomeric complex that contains VEGFR2 and integrin $\alpha_v\beta_3$. In the present study, we investigated the mechanisms by which HSP90 and the VEGFR2- $\alpha_v\beta_3$ integrin complex regulates VEGF-dependant phosphorylation of Focal Adhesion Kinase (FAK).

We show that the formation of this complex of receptors is associated with the recruitment of the chaperon *Heat shock protein 90* (HSP90) on VEGFR2. The VEGFR2/HSP90 interaction implicates the last 130 amino acids of VEGFR2 and is necessary for the activation of the RhoA small GTPase and RhoA-dependant kinase (ROCK). Then, ROCK activation triggers the direct phosphorylation of FAK on serine residue 732. In turn, phosphorylation of Ser732 changes the conformation of FAK making the tyrosine residue 407 accessible to a member of the FAK family of nonreceptor protein tyrosine kinases, the Proline rich tyrosine kinase 2 (Pyk2). In fact, we show that Pyk2 is activated in response to VEGF-dependant activation of integrin β_3 . These results were confirmed by the use of siRNA against ROCK and Pyk2. Phosphorylation of serine 732 and tyrosine 407 residues are both implicated in vinculine recruitment at the ventral plaques in endothelial cells in response to VEGF. Finally, by using embryonic MEF FAK^{-/-} cells and siRNA against FAK in HUVEC, we show that the phosphorylation of these two residues is critical to promoting cell migration.

Our findings underscore for the first time the complementary role played by the VEGFR2-HSP90-RhoA-ROCK-FAK-S732 and $\alpha_v\beta_3$ -Pyk2-Y407 pathways in transducing the VEGF signal that leads to the assembly of focal adhesions and endothelial cell migration.

Avant-propos

Par l'écriture de cette partie de thèse, j'aborde la fin d'une aventure scientifique et humaine. Ce doctorat, loin de mon pays natal, m'aura beaucoup enrichi intellectuellement mais aussi et je dirais même surtout, enrichi au niveau personnel.

Scientifiquement, mon choix de partir à l'étranger pour réaliser ce doctorat aura été une décision très bénéfique. J'ai beaucoup appris au niveau des techniques utilisés, et surtout j'ai appris à être autonome sur un projet. Ce dernier point est primordial pour moi car je sais à présent que c'est ce que je venais chercher ici, l'autonomie scientifique.

Humainement parlant, j'ai rencontré des gens formidables. Tout d'abord mon directeur de thèse, Jacques Huot. Notre premier contact s'est déroulé par... Internet. Je lui ai écrit afin de lui demander s'il cherchait un étudiant pour faire un doctorat et, sans même pouvoir me rencontrer, il a pris le risque de m'accepter dans son laboratoire. De mon côté, j'ai également pris le risque de m'engager pour quatre ans dans un laboratoire où je ne connaissais personne et dont la photo du chercheur, sur le site du CRHDQ, me semblait sympathique... Lorsque je repense à ce choix, je me dis vraiment qu'il faut parfois avoir une grande confiance en la vie et qu'il ne faut pas toujours rationaliser ses décisions. Jacques Huot est un scientifique qui ne fait pas son âge! C'est un homme passionné qui garde un regard brillant et curieux sur tout. J'aimerais prendre l'occasion pour le remercier pour tout. *Il m'aura offert un environnement de travail dans lequel j'ai pu m'épanouir, alors Merci.*

Dans ce laboratoire, j'ai tout d'abord rencontré des collègues qui sont par la suite devenus des amis.

Je ne peux m'empêcher de parler de Laurent. Nous avons commencé notre Doctorat en même temps et, nous avons passé les quatre dernières années en tant que voisin de paille. Ses très larges talents que ce soient scientifiques ou artistiques m'ont beaucoup impressionné et, au fil des ans et de nos incalculables conversations sur tous les domaines,

nous avons développé une complicité, une très profonde amitié. À ce propos, je dirais que si Laurent porte le même prénom que mon frère, cela n'est pas dû au hasard.

Bien sûr, je ne peux passer sous silence l'assistant de recherche du laboratoire, François. Sans François, le laboratoire ne serait pas ce qu'il est aujourd'hui. Passé son côté parfois assez froid, François se révèle un amoureux inconditionnel de la Nature ; c'est une personne de très grande qualité scientifique qui m'aura toujours énormément apporté dans la conception et l'interprétation des manipulations.

J'aimerais également cité Pierre-Luc, Jessie, Chantale, Andrée et Stéphanie. Leur présence a été pour moi très enrichissante et, je considère que l'on formait tous ensemble une superbe équipe où les échanges nous ont beaucoup permis d'avancer dans nos projets respectifs et, donc d'évoluer.

Enfin, j'aimerais remercier toutes les personnes du centre de recherche que j'ai côtoyé durant ces quatre années, que ce soient les chercheurs, les étudiants, les personnels du secrétariat ou de la maintenance. Leur présence m'ont également permis de me sentir à l'aise dans mon milieu de travail. Merci !

Je me dois également à ce stade de remercier les personnes ou organismes qui m'ont permis financièrement parlant de réaliser mes études de Doctorat. En premier lieu, j'aimerais remercier Dr Huot pour m'avoir financé durant les deux tiers de mes études. J'aimerais remercier l'Aide à la Recherche-Fond de Recherche en Santé du Québec (FRSQ) qui m'a accordé une bourse pour me financer. J'aimerais à nouveau remercier le laboratoire du Dr Huot pour m'avoir permis de participer aux congrès de Cold Spring Harbor (NY) et du Mont St Anne, l'institut Marie-Curie pour les deux bourses de congrès qui m'ont été accordées et qui m'ont permis de participer aux IV^{ème} et V^{ème} congrès portant sur l'angiogenèse (Helsinki et Sitges). La participation à ces congrès m'a beaucoup stimulé à travers la rencontre de scientifiques fascinants et je considère que ces participations ont fait partie intégrante de ma formation. Enfin, j'aimerais remercier le Centre de Recherche de l'Hôtel-Dieu de Québec et l'Université Laval pour les concours qu'ils organisent nous

donnant ainsi l'occasion de présenter nos travaux de recherches et pour les premiers prix qu'ils m'ont attribués.

J'aimerais ici remercier particulièrement mes parents et la famille de mon frère. Tout au long de mes études, ils m'auront toujours soutenu inconditionnellement même si mon travail et mon avenir professionnel leur ont souvent paru assez flou... Le jour où je leur ai annoncé que je partais pour, au moins trois ans au Canada, faire mon Doctorat, ils m'ont tout d'abord demandé si cela serait bénéfique pour moi. Puis, assurés de cela, ils m'ont encouragé. Merci pour tout ce que vous m'avez apporté.

Enfin, je remercie ma compagne de vie, Elsa. Au cours de mon Doctorat, elle m'a permis de relativiser les moments difficiles en me ramenant aux vraies valeurs de la vie. Cette période de ma vie, ici, à Québec avec Elsa, restera à jamais en moi associée à un épanouissement personnel. Merci Elsa.

Comme vous pourrez le lire, le cœur de cette thèse est composé de deux articles pour lesquels je suis premier auteur. Le premier a été publié dans la revue *Journal of Biological Chemistry* et le second est soumis à *Molecular Biology of the Cell*. Dans ces articles, j'ai réalisé l'ensemble des manipulations qui y sont figurées avec les conseils tant au niveau de l'élaboration que de l'interprétation des deuxièmes et derniers auteurs que sont respectivement François Houle et Dr Jacques Huot. Le troisième auteur du second manuscrit, Dr Mark Sussman, a participé en nous fournissant des constructions adénovirales. J'ai réalisé la première version de chacun de ces manuscrits qui a ensuite été révisée par chacun des auteurs.

Ainsi, mes travaux tendent à mieux comprendre les mécanismes moléculaires mis en jeu lors de l'angiogenèse dans les cellules endothéliales afin de développer des outils thérapeutiques pour inhiber l'angiogenèse tumorale et la progression tumorale qui lui est associée. J'espère que cette lecture de thèse vous sera instructive et plaisante.

La réalisation d'une thèse n'apporte ni bonheur, ni fortune, mais nous apprend à mieux nous connaître.

À Elsa

À mes parents.

Table des matières

RÉSUMÉ	II
ABSTRACT	III
AVANT-PROPOS	IV
TABLE DES MATIÈRES	VIII
LISTE DES TABLEAUX	XI
LISTE DES FIGURES	XII
LISTE DES ABRÉVIATIONS	XIV
1. INTRODUCTION	2
1.1. <i>Problématique et vue d'ensemble</i>	2
1.2. <i>Le cancer</i>	7
1.3. <i>L'angiogenèse</i>	13
1.4. <i>Le VEGF et ses Récepteurs</i>	19
1.4.1. Les protéines VEGFs.....	19
1.4.2. Les récepteurs du VEGF.....	24
1.4.3. Les corécepteurs des VEGFRs.....	27
1.4.4. Activation et régulation du VEGFR2 : signalisation.....	28
1.5. <i>Les Intégrines</i>	33
1.5.1. Expression, rôle et structure.....	33
1.5.2. Intégrine $\alpha_3\beta_3$ et l'angiogenèse	35
1.6. <i>Thérapies antiangiogéniques</i>	38
1.7. <i>La Heat Shock Protein 90 (HSP90)</i>	41
1.7.1. Aperçu général.....	41
1.7.2. Expression et caractéristiques de HSP90	42
1.7.3. Régulation de HSP90.....	43
1.7.4. Inhibiteurs de HSP90.....	46
1.8. <i>La Kinase d'Adhérence Focale (FAK)</i>	48
1.8.1. La structure de FAK	48
1.8.2. Activation-phosphorylation de FAK.....	53
1.8.3. Pyk2.....	56
1.8.4. Fonctions de FAK.....	59
1.8.4.1. Migration cellulaire	59
1.8.4.2. Survie, prolifération cellulaire et apoptose	61
1.8.5. FAK et le cancer	62

1.9. Objectifs du projet de recherche.....	63
1.10. Aperçu de la thèse	64
2. RÉGULATION DE LA PHOSPHORYLATION DE LA KINASE D'ADHÉRENCE FOCALE (FAK) PAR LA PROTÉINE DE CHOC THERMIQUE 90 (HSP90) ET LES ACTIVITÉS SRC EN RÉPONSE À L'ACTIVATION DU RÉCEPTEUR VEGFR2	68
2.1. Résumé.....	69
2.2. Article.....	70
2.2.1. Summary.....	71
2.2.2. Footnotes	72
2.2.3. Introduction.....	72
2.2.4. Experimental procedures	74
2.2.5. Results	80
2.2.6. Discussion.....	104
2.2.7. Acknowledgments	109
2.2.8. References.....	110
3. LA PHOSPHORYLATION DE FAK SUR RÉSIDU SÉRINE 732 PAR LA KINASE ROCK EST ESSENTIELLE POUR LA PHOSPHORYLATION DE FAK SUR TYROSINE 407 EN RÉPONSE AU VEGF	115
3.1. Résumé.....	116
3.2. Article.....	117
3.2.1. Abbreviations used	118
3.2.2. Abstract.....	119
3.2.3. Introduction.....	120
3.2.4. MATERIALS and METHODS.....	123
3.2.5. RESULTS.....	130
3.2.6. DISCUSSION.....	156
3.2.7. Acknowledgements.....	161
3.2.8. References.....	162
3.2.9. Supplemental data.....	168
4. DISCUSSION GÉNÉRALE.....	171
4.1. La voie VEGFR2-HSP90-RhoA-ROCK.....	174
4.1.1. Le rôle de HSP90.....	175
4.2. La voie $\alpha_v\beta_3$ -Src-Pyk2.....	176
4.3. Complémentarité des voies VEGFR2-HSP90-Rhoa-ROCK et $\alpha_v\beta_3$ -Src-Pyk2	178
5. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	180
5.1. Conclusions générales.....	180
5.2. Perspectives et orientations futures.....	180
5.2.1. Déterminer précisément le site d'interaction du VEGFR2 avec HSP90	181

5.2.2. Confirmer le changement moléculaire qui s'opère dans la protéine FAK suite à la phosphorylation du résidu sérine 732	182
5.2.3. Déterminer le rôle du résidu sérine 843 de FAK phosphorylable en réponse au VEGF	185
5.2.4. Déterminer si la Proline-rich tyrosine kinase-2 (Pyk2) peut phosphoryler directement FAK sur son site Tyrosine 407	185
A. L'INTERNALISATION DU VEGFR2 DÉPENDANTE DE LA DYNAMINE MODULE LA PHOSPHORYLATION SUR TYROSINE DE HSP90 ET DE LA VOIE SIGNALÉTIQUE ENOS DANS LES CELLULES ENDOTHÉLIALES.	188
B. CV CURRICULUM VITAE	228
<i>B.1 Publications</i>	228
<i>B.2 Communications</i>	229
B.2.1 communications Orales	229
B.2.2. Autres réalisations	230
BIBLIOGRAPHIE.....	232

Liste des tableaux

Tableau 1-1 : Faits saillants 1 sur la situation du cancer au Canada en 2005. Source : Institut National du Cancer Canada	8
Tableau 1-2 : Faits saillants 2 sur la situation du cancer au Canada en 2005. Source : Institut National du Cancer Canada	9
Tableau 1-3 : Nombres estimés de nouveaux cas et de décès pour divers sièges ou types ..	10
Tableau 1-4 : Le processus de l'angiogenèse : Comment se forment les nouveaux vaisseaux ?	15
Tableau 1-5: Liste des facteurs de croissance angiogénique et des inhibiteurs de l'angiogenèse dans le corps.	17
Tableau 1-6 : Localisation chromosomique des VEGFs et de leurs récepteurs	22

Liste des figures

Figure 1-1 : Photos d'un crabe, d'une mammographie et de la nébuleuse du crabe	4
Figure 1-2: Répartition en pourcentage des nouveaux cas et des décès estimés pour certains sièges ou types de cancer, hommes, Canada, 2005. Source : Institut National du cancer Canada	11
Figure 1-3: Répartition en pourcentage des nouveaux cas et des décès estimés pour certains sièges ou types de cancer, femmes, Canada, 2005. Source : Institut National du cancer Canada	12
Figure 1-4: Etapes du processus de l'angiogenèse	14
Figure 1-5 : Représentations des VEGFs et VEGFRs	21
Figure 1-6 : Structures du VEGFR2	26
Figure 1-7 : Représentations du domaine intracellulaire du VEGFR2 avec les sites	29
Figure 1-8 : Voies signalétiques activées en réponse à l'activation du récepteur	31
Figure 1-9 : Les sous-unités des intégrines et leurs ligands	34
Figure 1-10: Classification des intégrines selon leur ligand.....	36
Figure 1-11: Thérapie antiangiogénique.....	40
Figure 1-12 : Le cycle de la molécule chaperonne HSP90.....	45
Figure 1-13 : Structure de différents inhibiteurs de HSP90.....	47
Figure 1-14 : Schéma représentant les principaux domaines de la kinase d'adhérence focale	52
Figure 1-15 : Comparaison de structure entre FAK et PYK2.....	58
Figure 1-16 : : Modèle de travail	66
Figure 2-1 : VEGF-but not bFGF-induced tyrosine phosphorylation of FAK is inhibited by geldanamycin.	82
Figure 2-2 : HSP90 associates with the carboxyl-terminal tail of VEGFR2 in HUVECs exposed to VEGF.....	85
Figure 2.3 : HSP90 co-precipitates with integrin β •3 in response to VEGF.	88

Figure 2-4 : The VEGF-induced activation of FAK is modulated by Src but is independent of HSP90.....	91
Figure 2-5 : HSP90 and Src regulate the phosphorylation of different tyrosine residues on FAK in response to VEGF.....	94
Figure 2-6 : HSP90 regulates the VEGF-induced activation of RhoA and ROCK downstream of VEGFR2.	97
Figure 2-7 : The HSP90-and Src-dependent pathways trigger a differential recruitment of focal adhesion proteins to FAK and focal adhesions.....	100
Figure 2-8 : The association of VEGFR2 with HSP90 is required for endothelial cell migration.....	103
Figure 3-1 : VEGF induces phosphorylation of FAK on serine residues.....	132
Figure 3-2 : VEGF-induced phosphorylation of FAK on Ser732 but not on Ser843 is inhibited in by geldanamycin or Y27632.	134
Figure 3-3 : VEGF-induced phosphorylation of FAK on Tyr407, but not on Tyr397 requires the phosphorylation of FAK on Ser732.	138
Figure 3-4 : Phosphorylation FAK on Ser732 is necessary for recruitment of vinculin in response to VEGF.....	140
Figure 3-5 : ROCK directly phosphorylates FAK on Ser732 in response to VEGF.....	144
Figure 3-6 : Pyk2 is phosphorylated in an HSP90- and ROCK-independent manner in response to VEGF and it associates with integrin β 3 sub-unit.	148
Figure 3-7 : Pyk2 mediates the phosphorylation of FAK on Tyr407 in response to VEGF.	151
Figure 3-8 : Phosphorylation of Ser732 and Tyr407 are required for cell migration in response to VEGF.....	155
Figure 4-1 : Modèle de travail	173
Figure 5-1 : Modèle montrant la complexification de représentation de la kinase FAK.....	184

Liste des abréviations

GÉNÉRALES

5-FU 5-Fluorouracile

ADN Acide désoxyribonucléique

AMPc Adénosine Monophosphate cyclique

AP Protéine activatrice (*Activator Protein*)

ATF-2 Facteur d'activation de transcription-2 (*Activation Transcription Factor*)

BAEC Cellules endothéliales aortiques bovines (*Bovine aortic endothelial cells*)

CAM Molécule d'adhérence cellulaire (*Cellular Adhesion Molecule*)

CDKs Kinases dépendantes des cyclines (*Cyclin-Dependent Kinases*)

EGF Facteur de croissance épidermique (*Epidermal Growth Factor*)

EGFR Récepteur du facteur de croissance épidermique (*Epidermal Growth Factor Receptor*)

ERM Ezrine-Radixine-Moesine

ERK Kinase régulée par un signal extracellulaire (*Extracellular signal-Regulated Kinase*)

FAK Kinase d'adhérence focale (*Focal Adhesion Kinase*)

FGF Facteur de croissance fibroblastique (*Fibroblast Growth Factor*)

GF Facteur de croissance (Growth Factor)

GFP Protéine fluorescente verte (Green Fluorescent Protein)

GDP Guanosine di-phosphate

GTP Guanosine tri-phosphate

HSPs Protéines de choc thermique (*Heat Shock Proteins*)

HSP27 Protéine de choc thermique 27 (*Heat Shock protein of 27 kDa*)

HUVEC Cellules endothéliales de la veine du cordon ombilical humain (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*)

- I κ K Kinase de I κ B (*I κ B kinase*)
- ILK Kinase liée aux intégrines (*Integrin-linked kinase*)
- MAP Protéine activée par les mitogènes (*Mitogen Activated Protein*)
- MAPK Protéine-kinase activée par les mitogènes (*Mitogen Activated Protein Kinase*)
- Mapkapk-2/3 *MAPK-activated protein kinase 2/3*
- MAPKK Protéine-kinase kinase activée par les mitogènes (*Mitogen Activated Protein Kinase Kinase*)
- MEC Matrice extra-cellulaire
- MEK MAP/ERK kinase
- MKK MAP kinase kinases
- MKKK MAP kinase kinase kinases
- MMPs Métalloprotéinases de la matrice (*Matrix Metallproteinase*)
- MNK *MAP kinase-interacting kinase*
- MSK *mitogen- and stress-activated protein kinase*
- Oligo Oligonucléotide
- PAF Fateur activateur des plaquettes (*Platelet-activating factor*)
- PAGE Électrophorèse en gel de polyacrylamide (*Polyacrylamide gel electrophoresis*)
- PCR Réaction de polymérisation en chaîne (*Polymerase Chain Reaction*)
- pI Point isoélectrique
- P13K Kinase-3 phosphoinositide (*Phosphoinositide 3-Kinase*)
- p38 Protéine-kinase de 38 kDa
- PDGF Facteur de croissance dérivé des plaquettes (*Platelet-derived growth factor*)
- PKA Protéine kinase A
- PKC Protéine kinase C
- PTB Domaine d'attachement phosphotyrosine (*Phosphotyrosine binding domain*)

PYK2 Kinase riche en résidus proline (*prolin rich kinase-2*)

SAPK Protéine-kinase activée par le stress (*Stress Activated Protein Kinase*)

SAPK2 Protéine-kinase 2 activée par le stress (*Stress Activated Protein Kinase-2*)

SOS Facteur d'échange de GTP pour Ras (*Son of Sevenless*)

TCF Facteur de transcription (*ternaray complex factor*)

TGF- β Facteur de croissance tumorale-béata (*Tumor growth factor- β*)

VEGF Facteur de croissance endothélial vasculaire (*Vascular Endothelial Growth Factor*)

WT Wild Type

UNITÉS

μ Micro

Ci Curie

Da Dalton

g Gramme

h Heure

kb Kilobase

m Milli

M Molaire

min Minute

mm Millimètre

n Nano

RÉACTIFS ET SUBSTANCES CHIMIQUES

DMEM Dulbecco's modified Eagle's medium

DMSO Sulfoxyde de diméthyle

DTT Dithiothréitol

EBSS Earle's balanced salt solution

ECGS Endothelial cell growth supplement

EDTA Acide éthylène-diamine tétra acétique (*ethylene diamine tetraacetic acid*)

EGTA Acide éthylène glycol-bis-b aminoéthyl éther-N, N, N', N'-tétra acétique (*ethylene glycol tetra acetic acid*)

FBS Sérum foetal de bovin (*Fœtal Bovine Serum*)

FBS HI Sérum foetal de bovin inactivé par la chaleur (*Heat inactivated FBS*)

FITC isothiocyanate de fluoresceine

HEPES 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid

HRP Peroxydase de raifort (*Horseradish Peroxidase*)

MOPS Acide propane sulfonique 3-(N-morpholino)

PBS Tampon phosphate saline (*Phosphate buffer salin*)

PMSF Fluorure de phényl-méthyl sulfoxyde (*Phenyl Methyl Sulfonyl Fluoride*)

SDS Dodécyle-sulfate de sodium (*Sodium Dodecyl Sulfate*)

TRIS Tris(hydroxyméthyle)aminométhane

Chapitre 1

Introduction

1. Introduction

1.1. Problématique et vue d'ensemble

Le cancer n'est pas une maladie nouvelle, ni une maladie des temps modernes. Déjà, au 4ème siècle avant Jésus-Christ, Hippocrate en faisait une description précise.

À cette époque, les causes de mortalité étaient nombreuses et l'espérance de vie moindre. Une maladie comme le cancer n'était donc pas forcément le premier souci des hommes de l'Antiquité. Le cancer était alors une maladie parmi tant d'autres devant laquelle les médecins étaient contraints de constater leur impuissance. Cependant, l'augmentation de la durée de vie allait tout changer : le cancer est devenu, dans les années 1950, l'obsession de tout le corps médico-social.

Aujourd'hui, le cancer fait peur !

J'entends encore certains membres de ma famille qui, lorsque *Ce* mot arrivait dans une conversation, une certaine fatalité venait d'entrer dans notre maison et s'installer à notre table...

Mais pourquoi cette exceptionnelle source d'angoisse ? Une réponse à cette question pourrait être la méconnaissance de cette maladie et que, le cancer est encore trop souvent fatal. Par ailleurs, le mot "cancer" est associé à la *souffrance* et à la *mort* et possède actuellement une connotation *très péjorative*.

Néanmoins, des premiers écrits relatant l'existence du cancer sur des papyrus égyptiens (de -3500 avant J-C), sur des écrits mésopotamiens, indiens ou persans, jusqu'à l'avènement de la médecine moléculaire et cellulaire, les connaissances sur les mécanismes conduisant au développement des cancers commencent à se préciser.

Actuellement, la définition du cancer correspond à la transformation et à la division de façon anarchique d'une cellule qui devient maligne ou dangereuse pour son propre environnement : l'hôte que représente le corps. Quand le système immunitaire n'est plus capable de détruire ces cellules malades, leur nombre continue de croître pour former une tumeur. Tout d'abord bien délimitée dans un organe, la tumeur va, dans un premier temps, envahir et détruire progressivement les tissus adjacents puis, éventuellement se disséminer vers des organes plus distants.

Avant d'en arriver à cette « définition » moderne, de nombreux chercheurs ont apporté des contributions majeures à ce domaine. Parmi ceux-ci, Hippocrate (460-370 av. J.-C.) fit des descriptions précises de cancer en utilisant les termes grecs "*carcin*", "*carcinoma*"* pour désigner des ulcérations chroniques ou des grosseurs qui semblaient être des tumeurs malignes. Il utilisa le terme "*squirr(h)e*" pour désigner une forme de cancer (épithéliome) de consistance dure du fait de la prédominance d'une sclérose avec rétraction des tissus.

C'est Hippocrate qui, le premier, compare le cancer à un crabe par ressemblance entre l'aspect des tumeurs du sein lorsqu'elles s'étendent à la peau et cet animal. La tumeur a, en effet, en son centre une formation arrondie entourée de prolongements en rayons, semblables aux pattes d'un crabe (**Figure 1-1**).

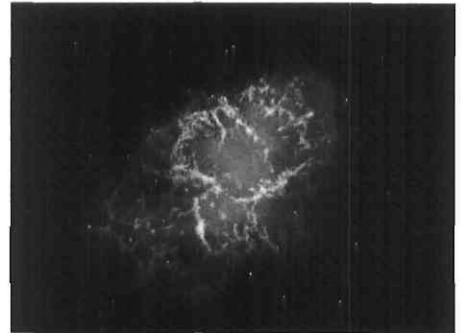
D'après le dictionnaire A. Bailly, ces deux termes grecs signifient respectivement :
- "*carcin*" : 1) écrevisse, 2) chancre, cancer, tumeur
- "*skirros*" : en tant que nom : tumeur dure; en tant d'adjectif : dur, endurci.



Crabe (*Crustacé*)



Mammographie réalisée montrant le développement d'un cancer.



Nébuleuse du Crabe (*Découvreur John Bevis, 1731*) :
Nuage de gaz en expansion situé dans la constellation du Taureau et provient de l'explosion d'une supernova observée le 4 juillet 1054.
La nébuleuse du Crabe doit son nom à sa ressemblance à l'animal sur des dessins effectués par *Lord Rosse vers 1844*.

Figure 1-1 : Photos d'un crabe, d'une mammographie et de la nébuleuse du crabe

Le mot "cancer", tout comme la maladie qu'il désigne, est donc très ancien et n'a, cependant, pas de signification scientifique dans la nomenclature des maladies. Ainsi, il s'utilise pour un grand nombre de maladies différentes avec une étiologie et des manifestations très variées, impliquant des soins et des traitements différents. Le pronostic, après traitement, est également très différent, selon le type de cancer.

La complication majeure du cancer est la formation de foyers cancéreux secondaires à partir des cellules du site primaire. Cela nécessite le passage des cellules cancéreuses dans la circulation sanguine et/ou lymphatique après leur passage à travers l'endothélium.

L'endothélium vasculaire est une interface dynamique entre le sang et les tissus jouant un rôle primordial dans le développement et les fonctions vasculaires. Celui-ci libère des substances vasoconstrictrices ou vasodilatatrices régulant le tonus vasculaire, module la balance entre thrombose et hémorragie, participe à la réponse immunitaire, inflammatoire et, est central à l'angiogenèse. Le processus angiogénique, ou la formation de nouveaux vaisseaux à partir de vaisseaux préexistants, est un processus nécessaire à la progression tumorale. En effet, en réponse à un état d'hypoxie, les cellules cancéreuses sécrètent différents facteurs de croissance qui vont se fixer sur leur récepteur naturel, présent à la surface des cellules endothéliales. Ces dernières, par la présence de ces facteurs de croissance, vont alors recevoir l'information selon laquelle elles doivent s'activer afin de lancer le processus de formation d'un nouveau vaisseau sanguin. Ce processus implique différentes étapes successives dont la migration des cellules endothéliales suite à leur activation par ces facteurs dits angiogéniques dont le principal est le *vascular endothelial growth factor* (VEGF). La formation de nouveaux vaisseaux sanguins permettra alors aux cellules cancéreuses de "détourner" la circulation sanguine à leur profit, de croître et d'envahir les tissus sains de l'organe hôte.

Il est donc particulièrement important de comprendre les mécanismes moléculaires mis en jeu lors de l'angiogenèse dans les cellules endothéliales afin de développer des outils thérapeutiques pour inhiber l'angiogenèse tumorale et la progression tumorale qui lui est associée.

Cette thèse présentée à la faculté de Médecine de l'Université Laval porte sur l'étude de l'endothélium vasculaire en présence d'un facteur activateur sécrété par les cellules cancéreuses. Plus précisément, cette thèse s'inscrit dans le cadre d'une meilleure compréhension des mécanismes de régulation de la migration des cellules endothéliales par le facteur de croissance VEGF.

1.2. Le cancer

Au Canada, en 2005, l'Institut National du Cancer estime à 149 000, le nombre de nouveaux cas de cancer et à 69 500, le nombre de décès causés par cette maladie. Plus précisément, au moins 50 % des nouveaux cas sont attribuables à trois types particuliers de cancer : chez l'homme, il s'agit du cancer de la prostate, du poumon et du colon ; chez la femme, le cancer du sein, du poumon et du colon. Ces données sont résumées aux tableaux 1 à 3 et aux figures 1-2 et 1-3.

Je ne détaillerai pas plus ce paragraphe car les tableaux et figures me paraissent assez explicites. En effet, même s'il existe un grand nombre de facteurs de risque de cancer qui ne peuvent être modifiés, tels que l'âge, le sexe et le bagage génétique, cet état de la réalité m'amène parfois à rêver au fait que si les habitants des pays dits développés reprenaient le pouvoir sur leur santé en se questionnant sur leurs habitudes de vies (cigarette, alimentation, activité sportive, etc), il me semble que l'incidence de nouveaux cas de cancer serait bien moindre.

En fait, certains cancers sont évitables. C'est le cas du cancer du poumon par exemple. Ce dernier cause 29 % des décès chez l'homme et 25 % chez la femme ! Celui-ci demeure la première cause de décès par cancer chez les Canadiens... Le tabagisme est la cause évitable la plus importante du cancer du poumon, représentant 85 % de tous les nouveaux cas de cancer de poumon au Canada (santé Canada, http://www.hc-sc.gc.ca/index_f.html).

Incidence et mortalité actuelles	
✓ On estime que 149 000 nouveaux cas de cancer et 69 500 décès dus à cette maladie seront enregistrés au Canada en 2005.	✓ Le nombre total de cas de cancer du poumon (hommes et femmes combinés) dépasse le nombre de cas de cancer de la prostate et le nombre de cas de cancer du sein.
✓ Le cancer du poumon demeure la principale cause de mortalité par cancer tant chez l'homme que chez la femme.	✓ Le cancer colorectal est la deuxième cause de mortalité par cancer en importance.
Répartition géographique du cancer	
✓ En général, les taux d'incidence et de mortalité sont plus élevés dans les provinces de l'Est, et plus bas dans les provinces de l'Ouest.	✓ Les taux d'incidence du cancer du poumon et de mortalité due à ce dernier continuent d'être plus élevés dans l'Est du Canada que dans l'Ouest.
Tendances relatives à l'incidence et à la mortalité	
✓ L'augmentation du nombre de nouveaux cas de cancer est principalement attribuable à la croissance démographique et au vieillissement de la population.	✓ Les taux de mortalité due au cancer de la prostate diminuent.
✓ Les taux d'incidence du cancer du poumon et de mortalité due à ce dernier continuent d'augmenter chez la femme.	✓ Les taux d'incidence des lymphomes non hodgkiniens et de mortalité due à cette maladie continuent d'augmenter
Répartition des cas selon l'âge et le sexe	
✓ 44 % des nouveaux cas de cancer et 60 % des décès dus à cette maladie surviennent chez les sujets de 70 ans et plus.	✓ Les taux d'incidence du cancer et de mortalité par cancer sont plus élevés chez les femmes que chez les hommes pendant la période de reproduction, bien que les hommes affichent des taux plus élevés à toutes les autres étapes de la vie.
✓ La mortalité diminue chez les hommes à tous les âges et chez les femmes de moins de 70 ans. Ces diminutions sont plus rapides chez les enfants et les adolescents (entre 0 et 19 ans).	
Probabilité d'être atteint du cancer ou d'en mourir	
✓ D'après les taux d'incidence actuels, 38 % des Canadiennes et 44 % des Canadiens seront atteints d'un cancer au cours de leur vie.	✓ D'après les taux de mortalité actuels, 24 % des femmes et 29 % des hommes, soit environ 1 Canadien sur 4, mourront du cancer

Tableau 1-1 : Faits saillants 1 sur la situation du cancer au Canada en 2005. Source : Institut National du Cancer Canada

Années potentielles de vie perdues à cause du cancer	
✓ Le cancer du poumon est de loin la principale cause de décès prématuré imputable au cancer au Canada.	✓ Le tabagisme est responsable de 27 % des années potentielles de vie perdues (APVP) à cause du cancer.
Prévalence	
✓ 2,4 % des Canadiens et 2,7 % des Canadiennes ont reçu un diagnostic de cancer au cours des 15 dernières années.	✓ Chez les femmes, 1 % ont survécu à un cancer du sein diagnostiqué au cours des 15 dernières années, tandis que chez les hommes, 0,7 % ont survécu à un cancer de la prostate diagnostiqué au cours des 15 dernières années.
Cancer chez les enfants	
✓ Environ 1 300 enfants canadiens développent un cancer chaque année, mais en raison de la réussite du traitement des cancers les plus courants, moins de un cinquième des cas se soldent par un décès.	
Progrès dans la prévention du cancer : facteurs de risque modifiables	
✓ De nombreux facteurs de risque de cancer sont à la fois courants et évitables : le tabagisme, la mauvaise alimentation, l'excès de poids, la sédentarité et l'exposition excessive aux rayons ultraviolets du soleil.	✓ En 2002, 21 % des Canadiens âgés de plus de 12 ans et 18 % des jeunes de 15 à 19 ans fumaient.
✓ Le tabagisme diminue, mais demeure élevé dans certains groupes.	✓ La majorité des Canadiens (60 %) ne consomment pas les quantités recommandées de fruits et de légumes.
✓ Environ la moitié des Canadiens (54 % des femmes et 44 % des hommes) sont physiquement inactifs..	✓ Près de la moitié des Canadiens (56 % des hommes et 39 % des femmes) ont un poids corporel défavorable à la santé; 15 % sont obèses.
✓ Les taux de sédentarité diminuent lentement, mais les taux d'excès de poids augmentent, en particulier chez les enfants.	✓ 18 % des Canadiens âgés de plus de 12 ans ont une consommation excessive d'alcool..
✓ La lutte antitabac a permis d'accomplir des progrès dans la prévention du cancer.	✓ La lutte antitabac a permis d'accomplir des progrès dans la prévention du cancer
✓ L'application des leçons tirées de l'expérience de la lutte antitabac à d'autres domaines pourrait se traduire par des gains encore plus importants dans la prévention du cancer.	

Tableau 1-2 : Faits saillants 2 sur la situation du cancer au Canada en 2005. Source : Institut National du Cancer Canada

	Nouveaux cas Estimations pour 2005			Décès Estimations pour 2005			Ratio décès/cas Estimations pour 2005		
	Total	H	F	Total	H	F	Total	H	F
Tous les cancers	149 000	76 200	72 800	69 500	36 700	32 800	0,47	0,48	0,45
Poumon	22 200	12 000	10 200	19 000	10 700	8 300	0,86	0,89	0,82
Sein	21 800	150	21 600	5 300	45	5 300	0,24	0,30	0,24
Prostate	20 500	20 500	–	4 300	4 300	–	0,21	0,21	–
Côlon et rectum	19 600	10 600	9 000	8 400	4 500	3 900	0,43	0,42	0,43
Lymphomes non hodgkiniens	6 400	3 400	3 000	3 000	1 600	1 350	0,46	0,47	0,46
Vessie	5 000	3 700	1 250	1 650	1 150	500	0,34	0,32	0,40
Rein	4 500	2 800	1 650	1 500	950	570	0,34	0,34	0,34
Mélanome	4 400	2 300	2 000	880	540	340	0,20	0,23	0,17
Leucémie	4 000	2 300	1 700	2 200	1 300	940	0,56	0,56	0,56
Corps de l'utérus	3 900	–	3 900	710	–	710	0,18	–	0,18
Pancréas	3 400	1 650	1 750	3 300	1 600	1 750	0,99	0,98	0,99
Cavité buccale	3 200	2 100	1 050	1 050	710	350	0,33	0,34	0,33
Thyroïde	3 100	710	2 400	170	65	100	0,05	0,09	0,04
Estomac	2 800	1 800	1 000	1 900	1 150	730	0,68	0,65	0,72
Encéphale	2 500	1 350	1 100	1 650	940	720	0,67	0,69	0,65
Ovaire	2 400	–	2 400	1 550	–	1 550	0,66	–	0,66
Myélome multiple	1 850	1 000	850	1 250	680	590	0,68	0,67	0,69
Oesophage	1 450	1 050	400	1 600	1 200	420	1,13 ¹	1,16 ¹	1,05 ¹
Col de l'utérus	1 350	–	1 350	400	–	400	0,30	–	0,30
Larynx	1 150	960	210	510	420	85	0,43	0,44	0,41
Testicule	850	850	–	30	30	–	0,04	0,04	–
Maladie de Hodgkin	850	460	390	120	70	55	0,14	0,15	0,14
Tous les autres sièges	12 000	6 400	5 600	8 900	4 800	4 100	0,75	0,75	0,74

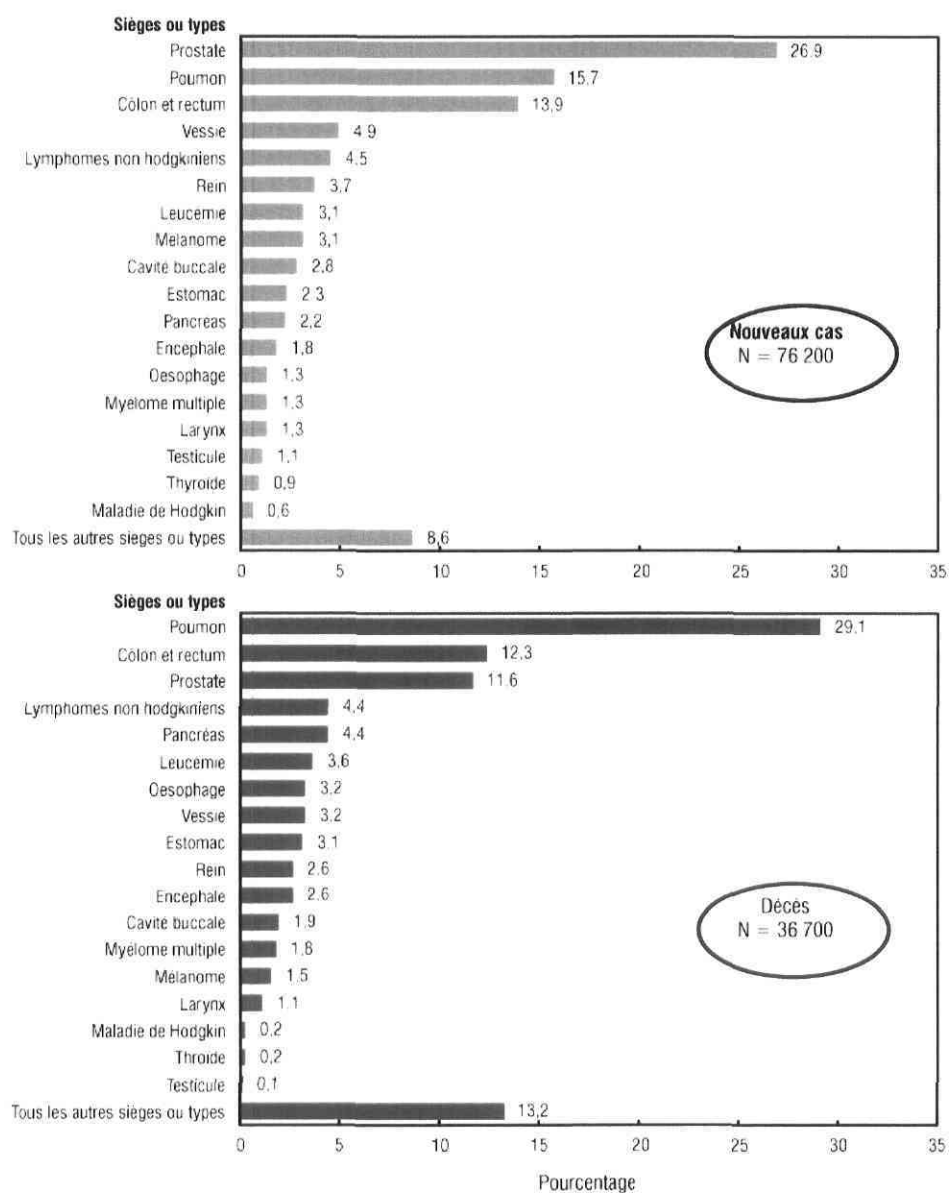
– Sans objet

¹ Le rapport élevé (supérieur à 1,0) enregistré pour le cancer de l'œsophage pourrait s'expliquer par une inscription incomplète des cas de cancer de ce type avant le décès. Pour plus de détails, consulter l'Annexe II : *Méthodologie*.

Nota : Les données sur l'incidence excluent les 78 000 nouveaux cas estimés de cancer cutané autre que le mélanome (carcinomes basocellulaire et squameux). Les chiffres ayant été arrondis, leur somme peut ne pas correspondre aux totaux indiqués. Pour plus de détails, consulter l'Annexe II : *Méthodologie*.

Source : Division de la surveillance et de l'évaluation des risques, CPCMC, Agence de santé publique du Canada

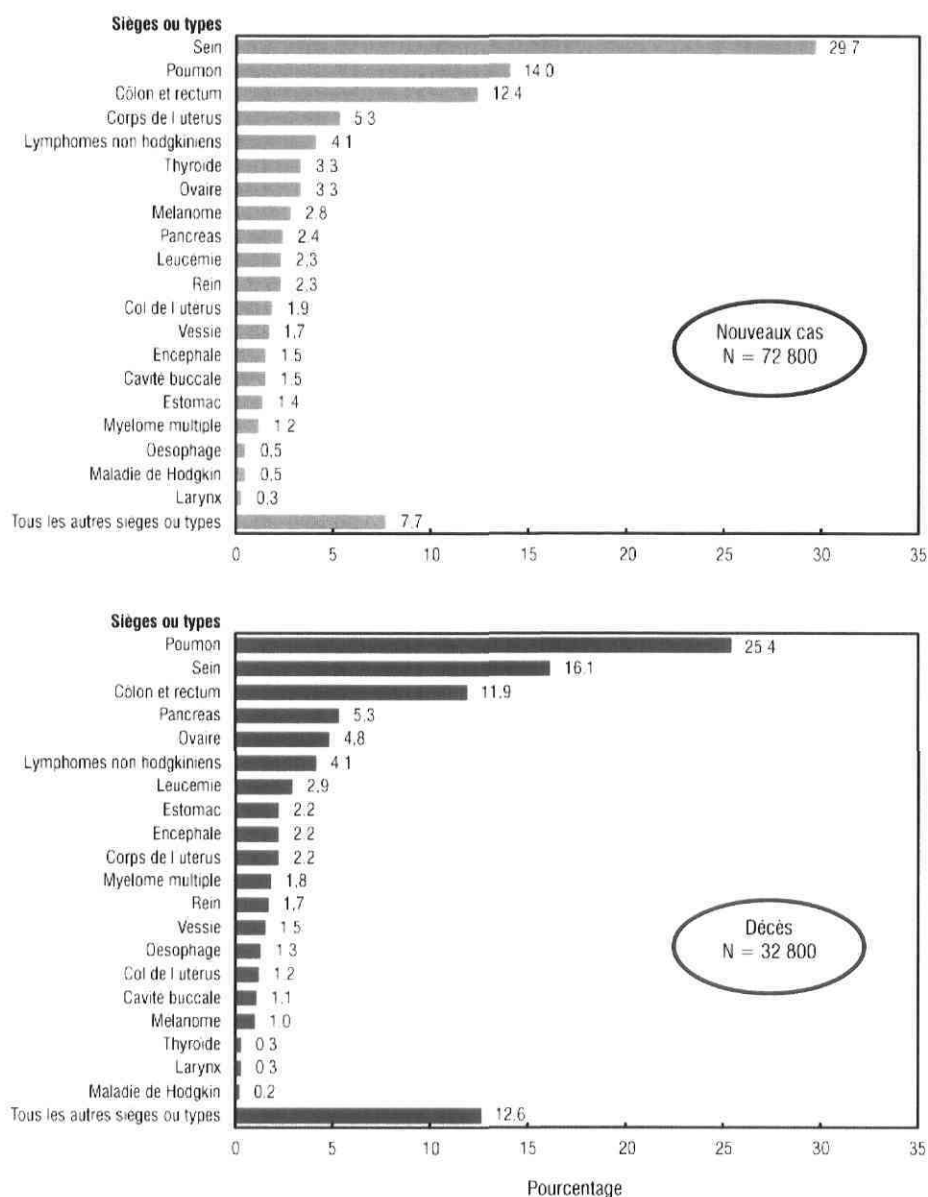
Tableau 1-3 : Nombres estimés de nouveaux cas et de décès pour divers sièges ou types



Nota : Les données sur l'incidence excluent les 78 000 nouveaux cas estimés de cancer cutané autre que le mélanome (carcinomes basocellulaire et squameux) chez les deux sexes combinés.

Source : Division de la surveillance et de l'évaluation des risques, GPCMC, Agence de santé publique du Canada

Figure 1-2: Répartition en pourcentage des nouveaux cas et des décès estimés pour certains sièges ou types de cancer, hommes, Canada, 2005. Source : Institut National du cancer Canada



Nota : Les données sur l'incidence excluent les 78 000 nouveaux cas estimés de cancer cutané autre que le mélanome (carcinomes basocellulaire et squameux) chez les deux sexes combinés.

Source : Division de la surveillance et de l'évaluation des risques, CPCMC, Agence de santé publique du Canada

Figure 1-3: Répartition en pourcentage des nouveaux cas et des décès estimés pour certains sièges ou types de cancer, femmes, Canada, 2005. Source : Institut National du cancer Canada

1.3. L'angiogenèse

Tel que mentionné précédemment, l'angiogenèse est définie comme la néoformation des vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux préexistants. Elle se distingue de la vasculogenèse dans laquelle les vaisseaux sont formés par des précurseurs héamangioblastiques qui se différencient. Elle se distingue également de l'artériogenèse. L'artériogenèse est définie comme la formation d'un vaisseau comportant une paroi vasculaire complexe contenant une intima, une média et une adventice. L'artériogenèse est donc un processus qui fait appel à une interaction cellulaire entre de nombreux types cellulaires incluant les cellules endothéliales, les cellules de soutien, et les cellules musculaires lisses.

À l'heure actuelle, trois mécanismes fondamentaux de l'angiogenèse ont été identifiés : le "sprouting", l'intussusception et la septation (**Figure 1-4 et Tableau 1-4**).

Au cours du "sprouting", des cellules endothéliales sont activées, ce qui conduit à la dégradation de la membrane basale et de la matrice extracellulaire environnante. La migration orientée des cellules endothéliales vers le gradient de facteur de croissance est alors suivie d'une phase de prolifération, puis d'une différenciation en structure capillaire.

L'angiogenèse intussusceptive, quant à elle, est caractérisée par un élargissement et une séparation de vaisseaux déjà formés. Au cours de ce mécanisme, les cellules endothéliales poussent à l'intérieur des vaisseaux pour créer des canaux vasculaires séparés.

Au cours de la septation, les cellules endothéliales poussent à l'intérieur des vaisseaux pour créer des canaux vasculaires séparés.

Les mécanismes moléculaires de ces différentes modes d'angiogenèse sont complexes, puisqu'ils mettent en jeu des signaux extra et intracellulaires.

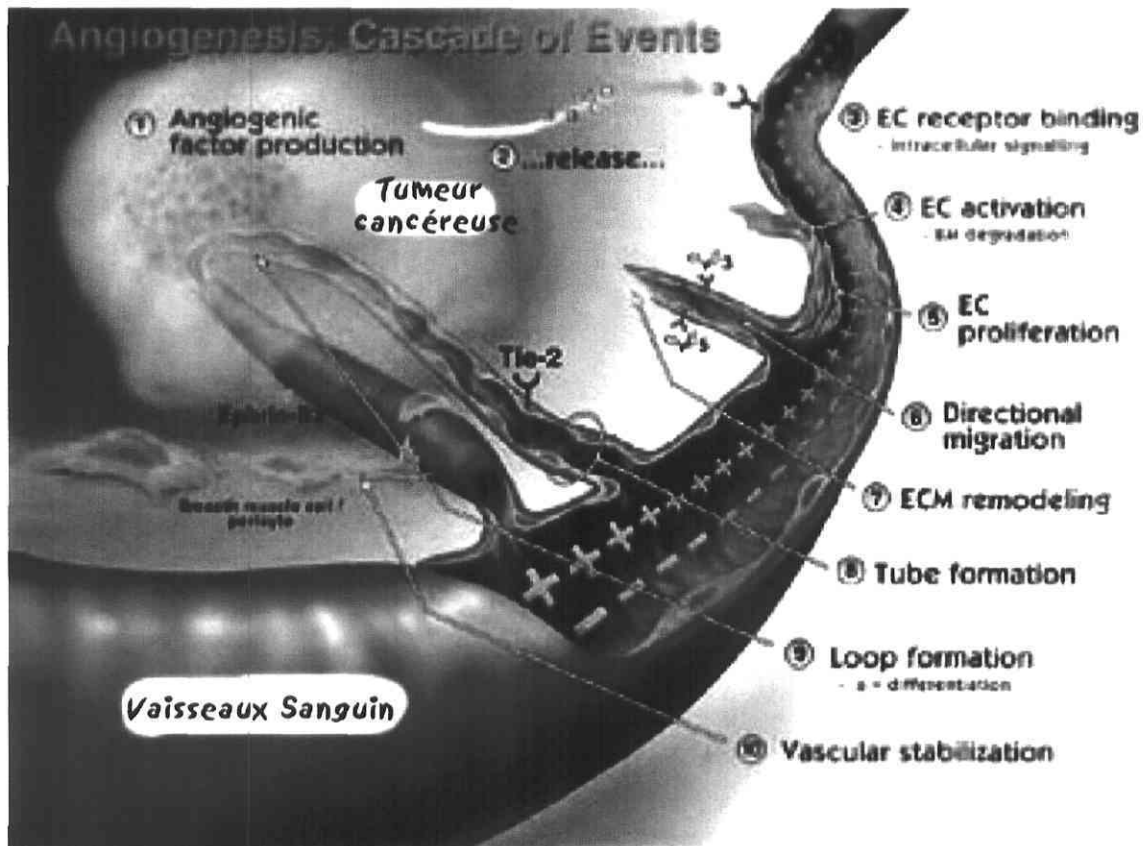


Figure 1-4: Etapes du processus de l'angiogénèse

L'angiogénèse est un processus qui peut être décomposé en différentes étapes. Les cellules cancéreuses en réponse à l'hypoxie sécrètent des facteurs de croissance dont le *vascular endothelial growth factor* (VEGF) qui vont activer les cellules endothéliales. Suite à la fixation des facteurs de croissance sur leurs récepteurs spécifiques, différents sentiers de signalisation vont amener la cellule à proliférer et à migrer en direction de l'origine de sécrétion des facteurs de croissance. Cette migration va alors conduire à la formation d'un nouveau vaisseau sanguin qui alimentera les cellules cancéreuses.

Adapté de foundation of angiogenesis <http://www.angio.org/>

Le processus de l'angiogenèse comprend différents évènements en série :

1. Des tissus malades ou blessés produisent et sécrètent des facteurs de croissance angiogéniques qui se diffusent à travers les tissus environnants.
2. Les facteurs de croissance angiogéniques se fixent à leurs récepteurs spécifiques exprimés à la surface des cellules endothéliales formant les vaisseaux sanguins préexistants.
3. Une fois les facteurs de croissance fixés à leurs récepteurs, les cellules endothéliales s'activent. Les signaux en découlant sont notamment dirigés vers les noyaux. La machinerie des cellules endothéliales commence à produire de nouvelles molécules incluant des enzymes.
4. Les enzymes produisent de minuscules trous au niveau des membranes basales environnant ces cellules endothéliales.
5. Les cellules endothéliales commencent à proliférer et, elles se mettent à migrer à travers les trous en direction du gradient de concentration de facteurs de croissance donc, vers des cellules cancéreuses.
6. Des molécules spécialisées dans l'adhérence, les intégrines ($\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$), « ancrent » les cellules endothéliales, ce qui aidera le vaisseau bourgeonnant à avancer.
7. D'autres enzymes comme les matrix metalloproteinases (MMP) sont produites pour détruire les tissus en avant du vaisseau bourgeonnant. Pendant que les vaisseaux croissent, les tissus environnants sont remodelés.
8. Le bourgeonnement des cellules endothéliales conduit alors à la formation le tube du vaisseau sanguin.
9. Le vaisseau sanguin nouvellement individualisé va se souder aux vaisseaux préexistants assurant ainsi une circulation sanguine adéquate.
10. Finalement, le nouveau vaisseau sanguin est stabilisé par les cellules musculaires lisses (*smooth muscle cells*, pericytes) qui font office de support structurel. Le flux sanguin peut alors débiter.

Tableau 1-4 : Le processus de l'angiogenèse : Comment se forment les nouveaux vaisseaux ?

La régulation de l'angiogenèse implique une pléiade de facteurs positifs et négatifs dont la liste est donnée dans le **tableau 5**. Parmi les régulateurs clés de l'angiogenèse on compte, les *vascular endothelial growth factors* (VEGF) ainsi que ses récepteurs associés (VEGFR), les *fibroblast growth factors* (FGF) et ses récepteurs, les angiopoïétines et leurs récepteurs, tie-1, tie2, les métalloprotéinases et leurs inhibiteurs ainsi que les activateurs du plasminogène (**Tableau 5**). Comme régulateurs négatifs de l'angiogenèse, on compte la thrombospondine, l'angiostatine, l'endostatine, et le facteur plaquettaire-4. De plus, les intégrines sont aussi des joueurs clés dans l'angiogenèse du fait de leur implication dans l'interaction des cellules endothéliales avec la matrice.

L'angiogenèse est impliquée de manière prédominante durant l'embryogenèse. Elle est également impliquée dans différents processus pathologiques incluant la croissance des tumeurs, les maladies cardio-vasculaires, oculaires et inflammatoires (Carmeliet 2003; Ferrara, Gerber et al. 2003). Il faut remarquer que la croissance des tumeurs et l'expansion métastatique sont strictement contrôlées par la néovascularisation. Pour la majorité des cellules cancéreuses, celles-ci croissent, mais restent dans un état de quiescence ou de dormance. Cependant, pour certaines autres cellules cancéreuses, il va se produire un passage dit "*switch*" angiogénique, qui va les rendre angiogéniques et invasives. Le processus cellulaire/moléculaire impliqué dans ce passage reste encore à élucider. À ce stade, il est important de noter qu'une masse cancéreuse n'a aucune possibilité de croître sans une irrigation sanguine adéquate. Ainsi, une stratégie anticancéreuse prometteuse est de bloquer l'angiogenèse induite par les cellules cancéreuses.

Liste des facteurs de croissance Angiogenique	Liste des inhibiteurs de l'Angiogenèse dans le corps
Angiogenine Angiopoietine-1 Del-1 Fibroblast growth factors: acide (aFGF) et basic (bFGF) Follistatine Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) Hepatocyte growth factor (HGF) /scatter factor (SF) Interleukine-8 (IL-8) Leptine Midkine Placental growth factor Platelet-derived endothelial cell growth factor (PD-ECGF) Platelet-derived growth factor-BB (PDGF-BB) Pleiotrophine (PTN) Progranuline Proliferine Transforming growth factor-alpha (TGF-alpha) Transforming growth factor-beta (TGF-beta) Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) Vascular endothelial growth factor (VEGF)/vascular permeability factor (VPF)	Angioarrestine Angiostatine (fragment de plasminogène) Antithrombine Antiangiogenique III Cartilage-derived inhibitor (CDI) Endostatine (fragment de collagène XVIII) Gro-beta Fragment Fibronectine Fragment hexasaccharide Héparine Fragment du complément CD59 Héparinases Human chorionic gonadotropin (hCG) Interféron alpha/beta/gamma Interféron inducible protein (IP-10) Interleukine-12 Kringle 5 (fragment de plasminogène) Metalloproteinase inhibitors (TIMPs) 2-Methoxyestradiol Placental ribonuclease inhibitor Plasminogen activator inhibitor Platelet factor-4 (PF4) Prolactine 16kD fragment Proliferine-related protein (PRP) Retinoids Tetrahydrocortisol-S Thrombospondine-1 (TSP-1) Transforming growth factor-beta (TGF-b) Vasculostatine Vasostatine (calreticulin fragment)

Tableau 1-5: Liste des facteurs de croissance angiogenique et des inhibiteurs de l'angiogenèse dans le corps.

L'un des défis des recherches actuelles est d'élaborer des outils pharmacologiques ou génétiques (par thérapie génique) capables de juguler la croissance tumorale en ciblant spécifiquement l'angiogenèse tumorale pour ainsi détruire les cellules cancéreuses en les limitant en apport nutritionnel et en oxygène. Comme cible, le VEGF est un très bon candidat du fait de sa surproduction par les cellules cancéreuses. Le développement d'anticorps neutralisant l'action du facteur de croissance VEGF ou inhibant la réponse cellulaire, qui lui est associée, est donc une stratégie antiangiogénique privilégiée par les chercheurs. Une autre stratégie a été développée en utilisant des facteurs angiostatiques endogènes ou des analogues synthétiques de la fumagilline comme l'agm1470. L'utilisation de molécules angiostatiques pour le traitement du cancer est une voie prometteuse et présente certains avantages par rapport aux thérapies conventionnelles. Elle fait abstraction de la très grande variété phénotypique et génotypique qui caractérise les cellules tumorales: ces molécules ciblent les cellules endothéliales engagées dans la formation des néovaisseaux tumoraux qui favorisent la propagation de la plupart des cancers. De plus, le risque de résistance aux agents angiostatiques semblerait a priori beaucoup plus faible que celui associé aux agents pharmacologiques (chimiothérapie). Ainsi, des recherches sont effectuées via des outils viraux ou non, des transferts de gènes tels l'angiostatine, l'endostatine, la canstatine et l'inhibiteur de protéase TIMP-2.

1.4. Le VEGF et ses Récepteurs

Le *vascular endothelial growth factor* (VEGF) a été initialement décrit comme un facteur de perméabilité vasculaire (VPF) sécrété par les cellules en réponse à l'hypoxie (Senger, Galli et al. 1983; Connolly, Olander et al. 1989; Marti, Bernaudin et al. 2000), et par les cellules endothéliales en prolifération (Ferrara and Davis-Smyth 1997). Le VEGF est aussi produit durant l'embryogénèse (Carmeliet, Ferreira et al. 1996; Ferrara and Bunting 1996). D'intenses recherches ont été effectuées pour établir le rôle du VEGF notamment durant le développement vasculaire grâce à son pouvoir activateur de la migration cellulaire et de la prolifération des cellules endothéliales.

La dénomination "VEGF" fait référence à une famille de glycoprotéines dimériques appartenant à la superfamille des facteurs de croissance PDGF. Il existe cinq membres de la famille VEGF qui se lient à des récepteurs à activité tyrosine kinase.

J'en ferai une description dans les parties qui suivent.

1.4.1. Les protéines VEGFs

Le nom "VEGF" correspond à une famille de protéines comprenant 6 membres, les VEGF-A, -B, -C, -D, -E et le placenta growth factor (PlGF) (**Figure 1-5, Tableau 1-6**). Les VEGF-A et -B participent à l'haemangiogenèse, les VEGF-C et -D à la lymphangiogenèse et, le PlGF est impliqué dans le recrutement de monocyte et dans le processus de pro-coagulation. Le VEGF-E est, quant à lui, proche du VEGF-A structurellement et fonctionnellement (Meyer, Clauss et al. 1999).

Chez l'humain, le VEGF-A existe sous 5 différents isoformes correspondant à des variants d'épissage incluant les VEGF-A 121, 145, 165, 189 et le 206 (Ferrara 1999). Les variants 121 et 165 correspondent aux variants les plus exprimés. De manière intéressante, il est à noter que l'exon 7 correspond à un motif impliqué dans l'interaction avec l'héparine et que cet exon, ainsi que l'exon 6 ne sont pas présents dans le VEGF-A 121 ce qui suggère que ce dernier peut être exprimé et diffusé sans entrave. Au contraire, les formes 189 et 206 contiennent non seulement l'exon 7 mais aussi d'autres motifs qui conduisent à leur rétention au niveau de la matrice extracellulaire.

Le VEGF-A 165 est le VEGF le plus abondant et est communément appelé VEGF (Petrova, Makinen et al. 1999). Cette forme de facteur de croissance, le VEGF-A, possède un très grand potentiel activateur de l'angiogenèse *in-vivo* en régulant positivement les différentes étapes composant la formation de nouveaux vaisseaux sanguins. Ainsi, le VEGF active la prolifération des cellules endothéliales et leur migration. Il active aussi les voies signalétiques conduisant à la survie cellulaire, augmente la production d'activateurs de plasminogène et la perméabilité de la barrière endothéliale.

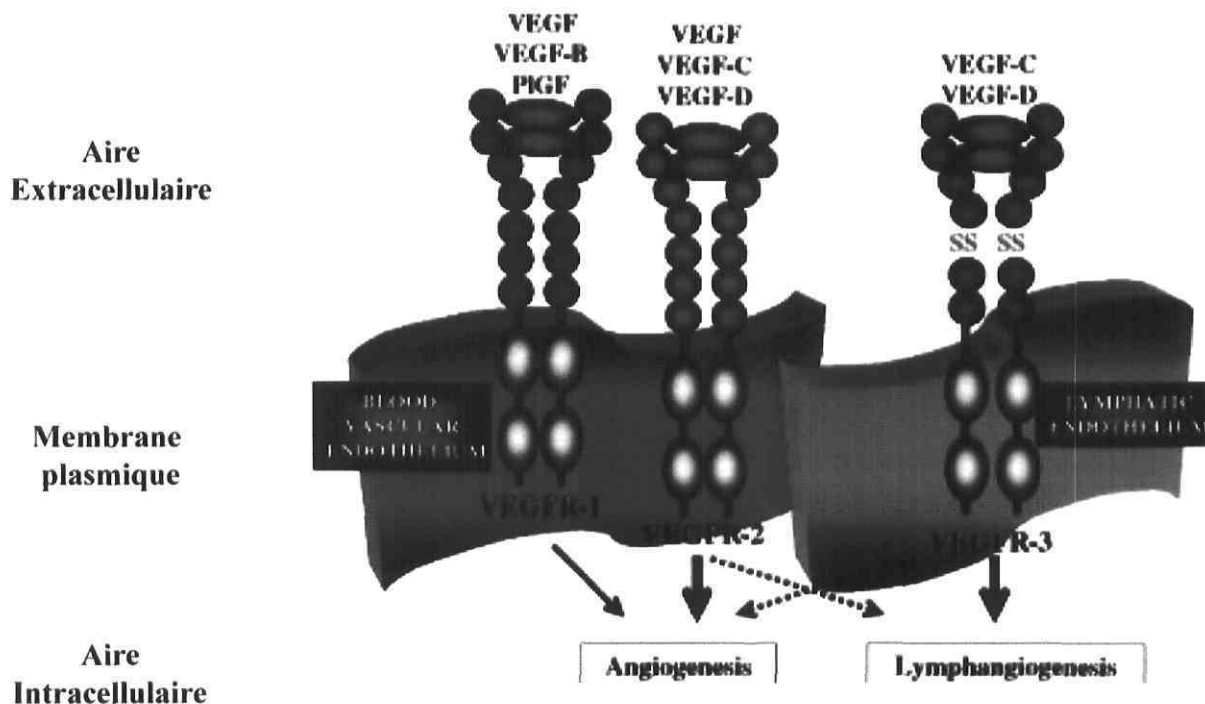


Figure 1-5 : Représentations des VEGFs et VEGFRs

Le nom VEGF correspond à une famille de protéines comprenant 6 membres, les VEGF-A, -B, -C, -D, -E et le placenta growth factor (PlGF). Trois récepteurs à activité tyrosine kinase ont été identifiés comme fixant le VEGF. Ces récepteurs sont : le VEGFR-1 (Flt-1 chez la souris), VEGFR-2 (KDR chez l'homme, Flk-1 chez la souris) et le VEGFR-3 (Flt-4 chez la souris). Le VEGFR1 possède la capacité de fixer les VEGF-A, -B et le PlGF. Ce récepteur est exprimé à la surface des cellules endothéliales et peut initier l'angiogenèse. Le VEGFR2 peut fixer les VEGF-A, -C et -D. Ce récepteur est exprimé à la surface des cellules endothéliales et possède un grand potentiel pour activer l'angiogenèse. Le VEGFR3 peut fixer les VEGF -C et -D. Ce récepteur est exprimé à la surface des cellules endothéliales lymphatiques et possède un grand potentiel pour activer la lymphangiogenèse.

Adapté de (Ferrara and Bunting 1996).

Gène	Localisation Chromosomique	Homologie de Séquence	Variants
VEGF-A	6p23.1		121,145,165,189,206
VEGF-B	11q13	45% avec VEGF-A	167,186
VEGF-C	4q34	30% avec VEGF-A165	
VEGF-D	X	61% avec VEGF-C 31% avec VEGF-A165	
PlGF	14q24	42% avec VEGF-A	131,152,219
VEGFR-1	13q12-13		
VEGFR-2	4q11-12		
VEGFR-3	5q33		

Tableau 1-6 : Localisation chromosomique des VEGFs et de leurs récepteurs

Les facteurs de croissances, ainsi que leurs récepteurs, sont localisés sur des chromosomes différents. Certains VEGF possèdent différentes isoformes. Le VEGF-A possède 5 isoformes dont les plus étudiées actuellement correspondent aux VEGFA165 et VEGFA189. Ces isoformes possèdent le plus grand potentiel pour initier le processus d'angiogenèse.

Adapté de (DiPalma, Tucci et al. 1996; Paavonen, Horelli-Kuitunen et al. 1996; Vincenti, Cassano et al. 1996; Tammela, Enholm et al. 2005).

Durant les premiers stades de l'embryogenèse, le VEGF est exprimé dans les cellules géantes du trophoblaste (Breier, Albrecht et al. 1992). À des stades plus tardifs, le VEGF est détectable dans différents organes de la souris et de l'homme (Ferrara 1999). De plus, différents types cellulaires incluant les macrophages, les cellules gliales, les kératinocytes, les cellules endothéliales ou bien encore les cellules cancéreuses expriment et sécrètent du VEGF. Au niveau de la barrière endothéliale chez l'humain, il est à noter que le VEGF est produit par les cellules musculaires lisses vasculaires en réponse à une activation par l'angiotensine II. Ce phénomène permet d'ailleurs de moduler les fonctions cellulaires des cellules endothéliales par voie paracrine (Williams, Baker et al. 1995). Il est enfin intéressant d'ajouter qu'une voie autocrine impliquant la production de VEGF par les cellules endothéliales est également activée dans des conditions de stress hypoxique (Brogi, Wu et al. 1994). D'autre part, la production par les cellules cancéreuses de VEGF et sa sécrétion dans le milieu environnant contribuent grandement à la croissance de la tumeur en induisant une néovascularisation de la masse cancéreuse (Barleon, Siemeister et al. 1997). L'expression du VEGF est régulée transcriptionnellement et post-transcriptionnellement. Les ARNm codant pour le VEGF sont augmentés dans les cellules soumises à l'hypoxie. Cela est dû à la présence d'un élément de régulation de la réponse à l'hypoxie (HRE) en 5' cistronique du promoteur du gène du VEGF. Cette région régulatrice est appelée la *internal ribosomal entry sites* (IRES) (Ladoux and Frelin 1993; Shweiki, Itin et al. 1993). En comparaison, les autres ARNm codant pour les autres variants VEGF ne sont pas augmentés en réponse à l'hypoxie (Eriksson and Alitalo 1999). De plus, la régulation de l'expression des ARNm du VEGF est dépendante de séquence en 3' du gène dans la région non codante (Levy, Levy et al. 1996).

Le VEGF-B, quant à lui, est fortement exprimé au niveau de l'organe du cœur entre les jours 11,5 et 12,5 du développement embryonnaire (Olofsson, Pajusola et al. 1996). Plus tard, l'expression du VEGF-B est détectable dans différents tissus dont le cœur mais aussi dans la graisse brune et la moelle épinière (Farnebo, Piehl et al. 1999).

Pour le VEGF-C, ses ARNm sont détectés dans un large panel de tissus. Cependant, au stade 12,5 jours du développement embryonnaire, son expression est particulièrement prononcée dans les régions où les vaisseaux lymphatiques sont générés à partir des veines embryonnaires comme les régions axillaires ou jugulaires (Eriksson and Alitalo 1999). Le VEGF-D est très proche du VEGF-C. Son expression est très similaire, mais il existe néanmoins quelques différences. Il a notamment été observé que ce facteur de croissance est prédominant dans les poumons et la peau ce qui n'est pas le cas pour le VEGF-C (Eriksson and Alitalo 1999).

Comme son nom l'indique, le *placenta growth factor* est exprimé de manière prédominante au niveau du placenta durant toutes les étapes de la gestation (Belletti, Ferraro et al. 1999). De manière intéressante, certains types de tumeurs comme les carcinomes de cellules de reins hypervasculaires expriment une quantité très élevée de PlGF (Takahashi, Sasaki et al. 1994).

1.4.2. Les récepteurs du VEGF

À ce jour, trois récepteurs à activité tyrosine kinase ont été identifiés comme fixant le facteur de croissance VEGF. Ces récepteurs sont ainsi dénommés VEGFR-1 (Flt-1 chez la souris), VEGFR-2 (KDR chez l'homme, Flk-1 chez la souris) et le VEGFR-3 (Flt-4 chez la souris) (**Figure 1-5, Tableau 1-6**). Les VEGFR-1 -2 et -3 correspondent, respectivement, à des poids moléculaires de 180, 230 et 195 KDa et sont modifiés post-transcriptionnellement par N-glycosylation. Ces récepteurs ne fixent pas tous les VEGFs existants. En effet, il existe une sélectivité relative se traduisant comme suit : le VEGFR-1 possède le potentiel pour fixer les VEGF-A, -B et le PlGF. Le VEGFR-2 peut se lier aux facteurs de croissance VEGF-A, -C, -D, et -E, le VEGFR-3 peut fixer les VEGF- C et D (**Figure 1-5**). De plus, ces différents récepteurs au VEGF ont une expression différentielle. Le VEGFR-3 est en effet exprimé spécifiquement à la surface des cellules endothéliales composant le système des vaisseaux lymphatiques. Les VEGFR-1 et 2 sont principalement exprimés à la surface des cellules endothéliales vasculaires (Matsumoto and Claesson-Welsh 2001)). Cependant, ces trois récepteurs sont essentiels pour le développement vasculaire embryonnaire. Les

souris *knock out* pour les gènes codant pour ces récepteurs conduisent au décès des embryons.

Les récepteurs du VEGF sont composés de trois principaux domaines : extracellulaire, transmembranaire et intracellulaire.

Le domaine extracellulaire est composé de 7 domaines similaires aux immunoglobulines (IgG like) dont le troisième pour les VEGFR-1 et 2 est nécessaire à la fixation de VEGF-A (Lu, Kussie et al. 2000). Il est à noter que le domaine extracellulaire du VEGFR-3 possède deux peptides liés par un pont disulfure (Pajusola, Aprelikova et al. 1994).

Le domaine intracellulaire est le domaine comportant l'activité tyrosine kinase. En effet, un domaine kinase séparé par un insert domaine de 70 acides aminés représente l'activité du récepteur et correspond à un domaine hautement conservé entre les récepteurs du VEGF avec 80% de similarité (Shibuya, Ito et al. 1999) (**Figure 1-6**).

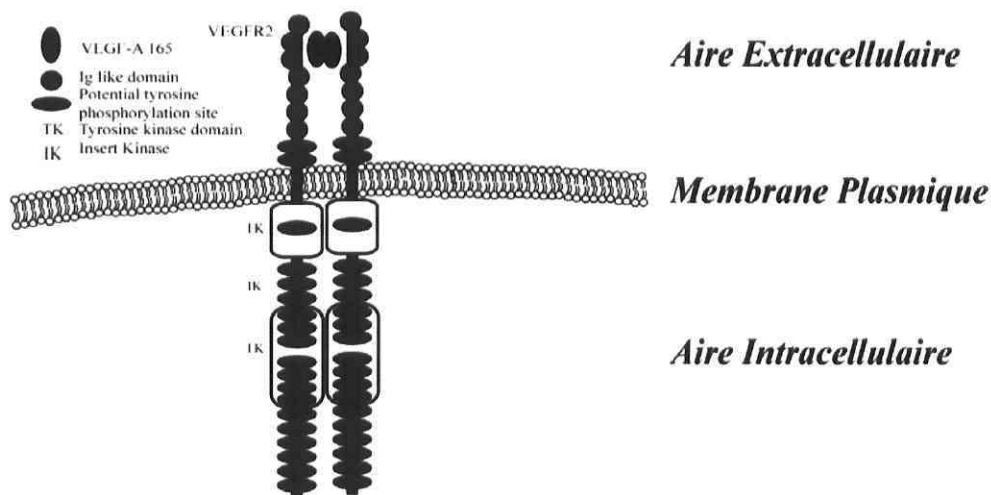


Figure 1-6 : Structures du VEGFR2

Le récepteur 2 du VEGF (VEGFR2) est composé de trois domaines principaux. Le premier domaine est extracellulaire, composé de 7 domaines *IgG like* et permet notamment de fixer l'homodimère de VEGF-A. Le second domaine est un domaine transmembranaire. Le troisième domaine est intracellulaire. Cette portion du récepteur est composée d'un domaine tyrosine kinase séparé par un *insert kinase*.

Adapté de (Shibuya, Ito et al. 1999; Matsumoto and Claesson-Welsh 2001).

1.4.3. Les corécepteurs des VEGFRs

Plusieurs corécepteurs du VEGF ont été décrits. Les neuropilines, les intégrines $\alpha_v\beta_3$, la VE-cadhérine (Rahimi and Kazlauskas 1999) ou bien encore les polysaccharides héparines et héparanes sulfates (Houck, Leung et al. 1992) semblent être les plus impliqués dans la signalisation du VEGF-A165.

Les neuropilines 1 et 2 sont très largement exprimées à la surface des différents types cellulaires et, structurellement, possèdent une courte queue cytoplasmique. Les neuropilines peuvent interagir avec la classe trois des protéines sémaphorine/collapsine telles Sema/3A qui sont des molécules sécrétées par des molécules impliquées dans la guidance axonale. Une inactivation *knock out* du gène de la neuropiline-1 conduit non seulement à une perte de fonction au niveau neuronal mais aussi au niveau de l'endothélium vasculaire (Kawasaki, Kitsukawa et al. 1999). Au contraire, une surexpression de ce même gène conduit à une dérégulation de l'angiogenèse (Kitsukawa, Shimono et al. 1995) et à une augmentation de croissance des tumeurs cancéreuses (Miao, Lee et al. 2000). De plus, il a été montré que différents VEGF tels les VEGF-A165, -A145, PlGF-2 et le VEGF-E peuvent fixer la neuropiline (Makinen, Olofsson et al. 1999; Gluzman-Poltorak, Cohen et al. 2000; Matsumoto and Claesson-Welsh 2001).

Le rôle de la fixation VEGF-neuropiline reste encore à éclaircir. Cependant, l'implication dans la guidance axonale serait une hypothèse acceptée. Comme corécepteur, le rôle de la neuropiline reste encore à définir précisément. Cependant, il semblerait que celle-ci agisse surtout au niveau extracellulaire en augmentant l'affinité du VEGFR pour son ligand. Il n'est par contre pas à exclure l'hypothèse selon laquelle la neuropiline pourrait également jouer un rôle signalétique (Cai and Reed 1999; Takahashi, Ueno et al. 1999).

Les intégrines $\alpha_v\beta_3$ peuvent également agir comme corécepteurs. En effet, le VEGFR2 a été montré comme réalisant des complexes avec les intégrines $\alpha_v\beta_3$ qui sont spécifiquement exprimées au niveau de l'endothélium angiogénique. L'interaction entre les récepteurs est dépendante des domaines extracellulaires du VEGFR et de l'intégrine via son

sous domaine α_v alors que l'activité du VEGFR est en rien impliquée (Borges, Jan et al. 2000). Il est de plus intéressant de noter que les intégrines $\alpha_v\beta_3$ peuvent interagir avec d'autres récepteurs comme le PDGF récepteur- β et le récepteur à l'insuline (Borges, Jan et al. 2000).

1.4.4. Activation et régulation du VEGFR2 : signalisation

La signalisation suivant l'activation du VEGFR1 est peu connue. Ceci est probablement lié au fait que le récepteur VEGFR1 possède une activité kinase faiblement détectable que ce soit dans des cultures de cellules ou de tissus.

Au contraire, bien que le VEGFR2 fixe le VEGF avec une affinité 10 fois moindre par rapport au VEGFR1, celui-ci possède une activité kinase très forte en présence de VEGF-A. En présence de VEGF, les homodimères du récepteur vont s'oligomériser, le récepteur s'activer et une autophosphorylation sur sites tyrosines va en découler (**Figure 1-7**), ce qui créera des sites de fixations pour différentes protéines possédant notamment des domaines SH2 (Src Homology domain).

Les sites phosphorylés, leurs positions et surtout leur rôle signalétique sont encore peu connus (Shibuya, Ito et al. 1999). Parmi les sites tyrosines phosphorylés suite à l'activation du récepteur, il existe les résidus Tyr951, Tyr996, Tyr1054, Tyr1059, Tyr1175 et Tyr1214. La fonction de chacun de ces sites reste encore à être précisée. Cependant, les sites tyrosine 1175 et 1214, qui sont des sites majeurs d'autophosphorylation, ont fait l'objet de recherches intensives. Ainsi, le site tyrosine 1175 semble être associé à la signalisation conduisant à l'activation de la kinase Erk, protéine majeure du contrôle de la prolifération cellulaire (Takahashi, Yamaguchi et al. 2001). La phosphorylation du site tyrosine 1214 est, quant à lui, décrit comme un événement initiant la voie p38 dépendante, voie impliquée dans la régulation de la polymérisation des fibres d'actine (Lamallice, Houle et al. 2004) (**Figure 1-7**).

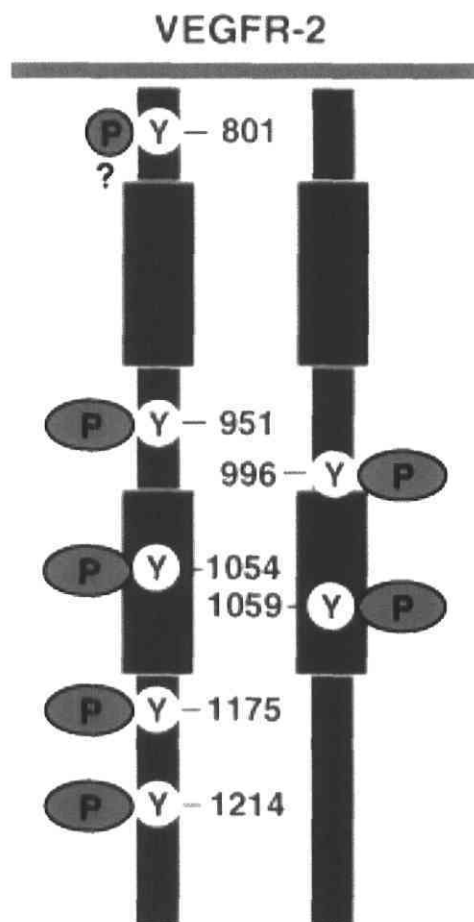


Figure 1-7 : Représentations du domaine intracellulaire du VEGFR2 avec les sites

Comme mentionné plus haut, le domaine intracellulaire du VEGFR2 est composé d'un domaine tyrosine kinase séparé par un *insert kinase*. La fixation du VEGF-A sur le VEGFR2 conduit ce dernier à former un homodimère ce qui aboutit à une auto et transphosphorylation sur différents résidus tyrosines. Ces résidus tyrosines, une fois phosphorylés pourront alors initier différents sentiers signalétiques centraux dans la physiologie de la cellule endothéliale.

Adapté de (Matsumoto and Claesson-Welsh 2001)

Le VEGFR2 est impliqué dans la signalisation cellulaire des cellules endothéliales conduisant à la survie cellulaire, à la prolifération, à la migration et à la différenciation. Ainsi, suite à son activation et la phosphorylation des résidus tyrosines, le VEGFR2 est à l'origine d'une signalisation multiple permettant de réguler les différents effets du VEGF. Par exemple, la prolifération cellulaire est liée à l'activation de voies impliquant les protéines sérine/thréonine kinase PKB (Akt), protéine kinase C (PKC) et *extracellular signal-regulated kinase* (ERK) (**Figure 1-8**) (Gerber, McMurtrey et al. 1998; Zeng, Sanyal et al. 2001).

Par ailleurs, la migration cellulaire est de façon importante liée à l'activation des voies impliquant les protéines SAPK2/p38 et FAK (Rousseau, Houle et al. 2000). L'activation de la voie SAPK2/p38 par le VEGF joue un rôle important dans la migration des cellules endothéliales par la régulation de l'organisation de la dynamique d'actine. En effet, l'exposition de cellules endothéliales provenant de la veine de cordon ombilicaux HUVECs à des doses de VEGF activant la migration cellulaire induit la polymérisation de l'actine et la formation de fibre de stress. L'utilisation d'un inhibiteur spécifique de la kinase p38, le SB203580, bloque la polymérisation de l'actine, la formation de fibre de stress et, par conséquent la migration cellulaire (Rousseau, Houle et al. 1997).

La régulation de la polymérisation d'actine dans les cellules est un processus très complexe impliquant en plus de la voie p38 régulant HSP27, différentes autres voies et protéines dont des protéines impliquées dans l'ancrage des fibres d'actine. L'exposition de cellules endothéliales HUVEC au VEGF conduit au recrutement de protéines aux points focaux d'adhérence telle la vinculine (Rousseau, Houle et al. 1997). Ainsi, dans ce contexte de régulation multiple via différentes voies signalétiques, il n'est pas surprenant que la kinase d'adhérence focale FAK soit impliquée.

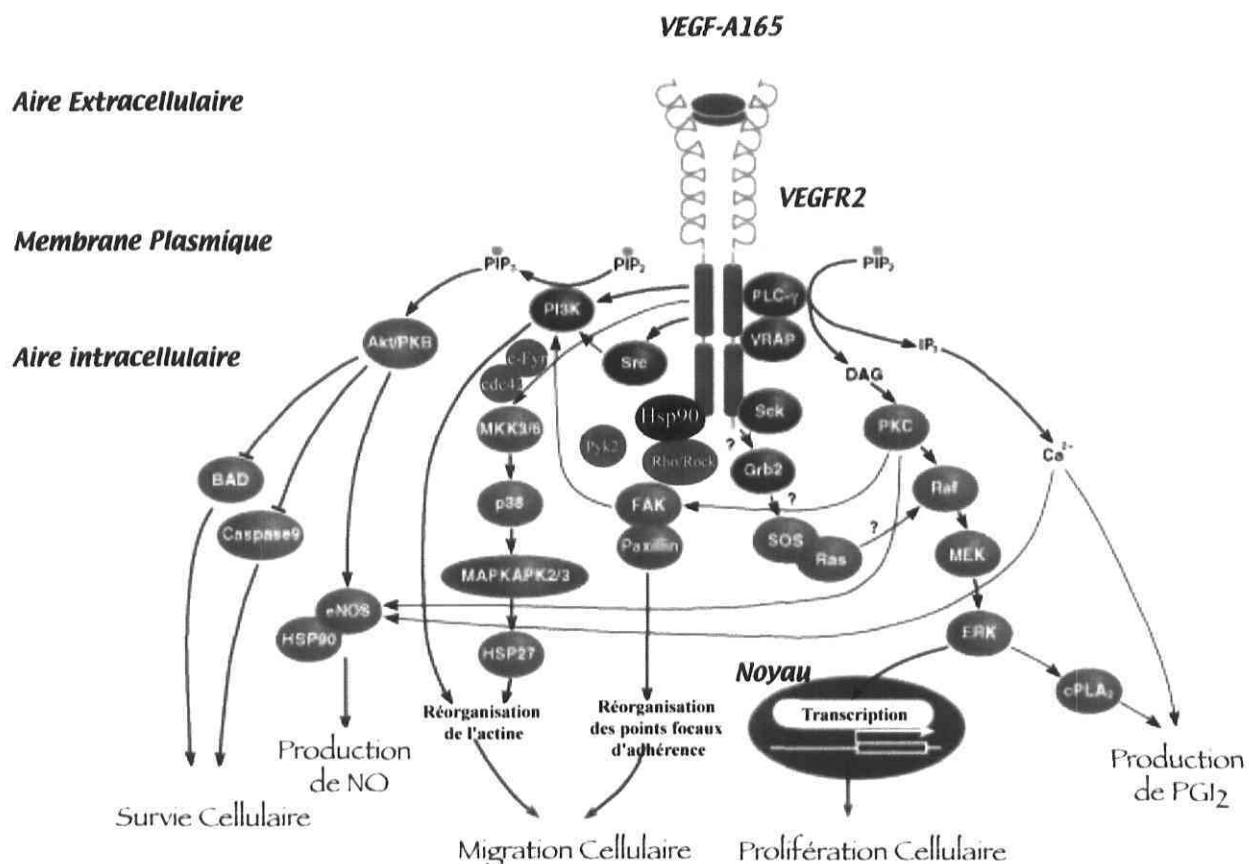


Figure 1-8 : Voies signalétiques activées en réponse à l'activation du récepteur

Le VEGFR2 est impliqué dans la signalisation cellulaire des cellules endothéliales conduisant à la survie cellulaire, à la prolifération, à la migration et à la différenciation. La signalisation régulant ces différentes fonctions physiologiques de la cellule endothéliale est sous le contrôle de protéines comme p38 et FAK pour la migration cellulaire, Akt/PKB pour la survie cellulaire ou Erk pour la prolifération cellulaire. Toutes ces protéines et leurs sentiers signalétiques associés font l'objet de recherches approfondies afin de mieux comprendre le processus angiogénique.

Adaptée de (Matsumoto and Claesson-Welsh 2001).

La protéine tyrosine kinase FAK ainsi qu'un de ses substrats, la paxilline, sont phosphorylés et activés en réponse au VEGF-A dans les cellules endothéliales suite à l'activation du VEGFR-2 (Abedi and Zachary 1997; Kanno, Oda et al. 2000; Rousseau, Houle et al. 2000). Alors que l'activation en réponse au VEGF de la voie p38 conduit à la réorganisation de l'actine, l'activation de la voie FAK conduit au recrutement de protéines aux points focaux d'adhérence telle la vinculine ou la taline, élément essentiel pour la réorganisation des fibres d'actine et la migration des cellules endothéliales. La signalisation en réponse à l'activation du VEGFR2 menant à l'activation de FAK fait l'objet de cette thèse.

La fixation du VEGF à son récepteur, le VEGFR-2, va induire l'activation de phosphatases qui vont contribuer à réguler l'activité du récepteur à activité tyrosine kinase. Les tyrosines phosphatases SHP-1 et -2 contenant des domaines SH2 sont observées pour interagir avec le VEGFR2 in vitro (Kroll and Waltenberger 1997). Le rôle précis de cette interaction n'a pas encore été précisé mais, dans des cellules traitées au facteur nécrose tumorale (TNF), la formation d'un complexe entre SHP-1 et VEGFR-2 a été observée ainsi qu'une déphosphorylation du récepteur. Ce résultat suggère l'implication de SHP-1 dans le retour à un état de repos du récepteur (Guo, Wu et al. 2000). Il est donc tout à fait plausible qu'à travers l'implication des phosphatases, l'activité et la signalisation émanant du récepteur soient régulées négativement. Cependant la boucle "rétro-active" de cette régulation n'a pas encore été démontrée formellement. En effet, le modèle d'activation des phosphatases reste encore à être précisé. Il est notamment peu défini si les phosphatases sont activées de manière directe ou non par le VEGFR2 activé dans les cellules endothéliales.

Par ailleurs, il semble que l'activité du VEGFR-2 soit régulée par la présence du VEGFR-1 qui pourrait agir comme un séquestreur de VEGF du fait de sa haute affinité (Holash, Davis et al. 2002). Ainsi, le VEGF serait capté par le VEGFR1 et neutralisé. Cependant, d'autres voix se sont élevées pour démontrer l'existence d'hétérodimères VEGFR-1 et 2 qui pourraient être signalétiques. En effet, l'association des récepteurs au VEGF de type 1 et 2 pourrait former un hétérodimère (VEGFR-1/R-2) conduisant à la synthèse de prostacycline (PGI₂) (Neagoe, Lemieux et al. 2005).

1.5. Les Intégrines

L'angiogenèse nécessite une coordination entre les facteurs de croissance et les intégrines (Brooks, Clark et al. 1994; Brooks, Montgomery et al. 1994; Friedlander, Brooks et al. 1995) conduisant à l'activation de signaux sous-jacents dans les cellules endothéliales (Eliceiri, Klemke et al. 1998; Short, Talbott et al. 1998).

1.5.1. Expression, rôle et structure

La famille des intégrines comprend de nombreuses molécules d'adhérence qui modulent l'interaction entre l'environnement extracellulaire et le cytoplasme. Les intégrines sont des glycoprotéines transmembranaires qui contrôlent l'interaction cellule-cellule et cellule-matrice extracellulaire (ECM) (Hynes 1992). Durant les dix dernières années, l'analyse de l'expression et des fonctions de ces molécules a révélé que les intégrines régulent plusieurs aspects physiologiques de la cellule tels la mort cellulaire, la prolifération, la migration et la différenciation. Plusieurs très bonnes revues ont fait référence aux rôles des intégrines durant le développement du système nerveux et leurs fonctions dans les leucocytes lors de l'extravasation (Hood and Cheresh 2002).

Les intégrines sont exprimées à la surface des cellules, notamment des cellules endothéliales. Elles sont constituées d'hétérodimères comportant une chaîne alpha (α) et une bêta (β). À ce jour, 8 sous-unités β et 18 α ont été découvertes. La combinaison spécifique des différentes sous-unités α et β donne la spécificité de l'intégrine pour sa matrice ou substrat (Hood and Cheresh 2002). Les vingt-quatre différentes combinaisons possibles entre les sous-unités sont représentées à la **figure 1-9**.

Toutes les intégrines, exceptée $\beta 4$, possèdent un domaine cytosolique très court et aucune ne possède d'activité kinase intrinsèque. Malgré ce fait, les intégrines sont d'importantes molécules dans la signalisation cellulaire en plus de leur rôle d'ancrage avec la matrice extracellulaire (Giancotti and Ruoslahti 1999). Lorsque qu'une intégrine s'engage avec son ligand, celle-ci s'oligomérisse ou se "clusterize" et va alors pouvoir recruter différentes protéines cytosoliques comme FAK (Hauck, Hsia et al. 2002), Src (Parsons and Parsons 1997), la phosphoinositide 3-kinase (PI3K) (Franke, Kaplan et al. 1997), et la *p21-dependent kinases* (PDKs).

1.5.2. Intégrine $\alpha_v\beta 3$ et l'angiogenèse

Les cellules endothéliales expriment au moins 10 intégrines différentes selon la localisation et l'état d'activation de la cellule (**Figure 1-10**). Un certain nombre d'intégrines sont exprimées de façon basale et leur expression ne semble pas évoluer alors que d'autres sont surexprimées lorsque les cellules endothéliales sont activées. L'augmentation d'expression la plus significative concerne l'intégrine $\alpha_v\beta 3$, une intégrine qui fixe différentes composantes de la matrice dont le fibrinogène, la vitronectine, le facteur von Willebrand (Cheresh, Pytela et al. 1987), la fibronectine (Charo, Nannizzi et al. 1990), l'ostéopontine (Ross, Chappel et al. 1993), ainsi qu'avec des composantes de la matrice basale tels la laminine (Clyman, Mauray et al. 1992) et le collagène (Davis 1992). Au cours du développement, l'intégrine $\alpha_v\beta 3$ est exprimée à la surface des cellules endothéliales, des muscles lisses et des ostéoclastes. Chez l'adulte, l'intégrine $\alpha_v\beta 3$ semble être un régulateur clé de l'angiogenèse. En effet, un blocage de ces molécules par de petites molécules ou par des anticorps bloque la néovascularisation dans de nombreux modèles animaux (Brooks, Clark et al. 1994; Brooks, Montgomery et al. 1994; Drake, Cheresh et al. 1995; Friedlander, Brooks et al. 1995; Penta, Varner et al. 1999; Storgard, Stupack et al. 1999; Varner, Nakada et al. 1999; Valencik and McDonald 2001; Nemeth, Cher et al. 2003).

Collagen Binding Integrins	Laminin Binding Integrins	RGD-Binding Integrins
<u>$\alpha 1\beta 1$</u>	<u>$\alpha 3\beta 1$</u>	<u>$\alpha 5\beta 1$</u>
<u>$\alpha 2\beta 1$</u>	<u>$\alpha 6\beta 1$</u>	$\alpha 8\beta 1$
$\alpha 10\beta 1$	<u>$\alpha 6\beta 4$</u>	$\alpha V\beta 1$
$\alpha 11\beta 1$	$\alpha 7\beta 1$	<u>$\alpha V\beta 3$</u> ↑
		$\alpha 11b\beta 3$
		<u>$\alpha V\beta 5$</u>
		$\alpha V\beta 6$
		$\alpha V\beta 8$
Leukocyte Integrins	VCAM-binding Integrins	
$\alpha L\beta 2$	<u>$\alpha 4\beta 1$</u> ↑	
$\alpha M\beta 2$	<u>$\alpha 4\beta 7$</u> ↑	
$\alpha X\beta 2$	$\alpha E\beta 7$	
$\alpha D\beta 2$	$\alpha 9\beta 1$	

Figure 1-10: Classification des intégrines selon leur ligand

Les intégrines possèdent différentes spécificités selon leur ligand. Les intégrines $\alpha_v\beta_3$ sont exprimées à la surface des cellules endothéliales, se lient à des séquences RGD présentes dans la matrice et, ces intégrines peuvent être surexprimées suite à une activation des cellules.

Les intégrines exprimées à la surface des cellules endothéliales sont représentées en encadré rouge. Les intégrines pouvant être surexprimées sont soulignées.

Adapté de (Cheresh, Pytela et al. 1987)

En réponse au VEGF, l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ forme un oligomère avec le récepteur au VEGF, le VEGFR2 dans les cellules endothéliales (Soldi, Mitola et al. 1999). Tel que mentionné précédemment, ce partenariat conduit à l'activation de voies signalétiques spécifiques dont la voie dépendant de la molécule FAK qui est primordiale pour la migration cellulaire (Masson-Gadais, Houle et al. 2003; Le Boeuf, Houle et al. 2004). D'autres part, la voie impliquant la MAPKinase p38, également activée en réponse au facteur de croissance VEGF, ne semble toutefois pas impliquer les intégrines $\alpha_v\beta_3$ (Masson-Gadais, Houle et al. 2003).

Ainsi, l'expression spécifique des intégrines $\alpha_v\beta_3$ à la surface des cellules endothéliales et leurs rôles dans la régulation de ces cellules en réponse à des facteurs angiogéniques comme le VEGF, en font des cibles de choix pour développer des thérapies anti-angiogéniques.

1.6. Thérapies antiangiogéniques

Durant les dix dernières années, les VEGFs et leurs récepteurs ont été l'objet d'attention particulière de la part de nombreux chercheurs. En effet, leur objectif principal était, et reste à ce jour, de développer une thérapie antiangiogénique. Pour cela, différentes stratégies ont été imaginées dont l'utilisation d'anticorps neutralisant le VEGF-A ou son principal récepteur le VEGFR2, d'oligonucléotides antisens, de peptides régulateurs, de récepteurs solubles et des analogues d'ATP permettant d'inhiber l'activité des récepteurs (**Figure 1-11**) (Carmeliet 2005; Ferrara and Kerbel 2005).

L'élaboration de traitements pour tenter de réguler l'angiogenèse s'est rapidement développée et, il est réaliste de penser que ces nouvelles percées, tant au niveau de la compréhension de l'angiogenèse que de sa régulation, pourront être appliquées dans les années à venir dans le cadre de diverses maladies dont le cancer. Cependant, les approches actuellement développées peuvent être contrariées par la complexité du processus angiogénique. En effet, les VEGFs sont connus comme agissant non seulement sur les cellules endothéliales mais aussi sur d'autres types cellulaires. De plus, bien que le VEGF stimule la migration et la survie cellulaire des cellules endothéliales et est unique parmi les facteurs de croissance, de par son habilité à induire la perméabilité vasculaire, il ne semble pas être un activateur puissant de la division des cellules endothéliales. Enfin, la stimulation de l'angiogenèse est un processus impliquant une très grande variété d'agents ayant des rôles bien précis à différents stades du processus de formation du nouveau vaisseau sanguin (Matsumoto and Claesson-Welsh 2001).

Parmi les différents agents chimiques développés pour contrer la progression tumorale, on ne peut passer sous silence le Bevacizumab. Le Bevacizumab ou Avastin™ (rhuMAb-VEGF) est un anticorps monoclonal de type IgG1 qui se lie au VEGF et inhibe de ce fait sa liaison à ses récepteurs, Flt-1 (VEGFR-1) et KDR (VEGFR-2). C'est un médicament qui se présente sous forme injectable. L'efficacité de cet anticorps a été montrée aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*. Il est constitué d'une partie constante d'origine humaine et d'une partie variable d'origine murine. Son mécanisme d'action est essentiellement basé sur la compétition entre la liaison entre le VEGF et ses récepteurs à la surface des cellules endothéliales. L'administration de Bevacizumab dans des modèles de transplantation de cancers coliques humains chez les souris nues montre une réduction de la croissance des micro-vaisseaux et une inhibition de la progression des métastases.

L'indication actuelle de l'Avastin™ est le traitement de première ligne du cancer métastatique du colon ou du rectum en association avec une chimiothérapie comprenant l'administration intraveineuse de 5-fluorouracile/acide folinique (5-FU) avec ou sans irinotécan. On a montré, ainsi, une amélioration nette de la survie des malades et de la survie sans récurrence. D'autres indications sont en cours de validation : cancer du rein, cancer du poumon non à petites cellules.

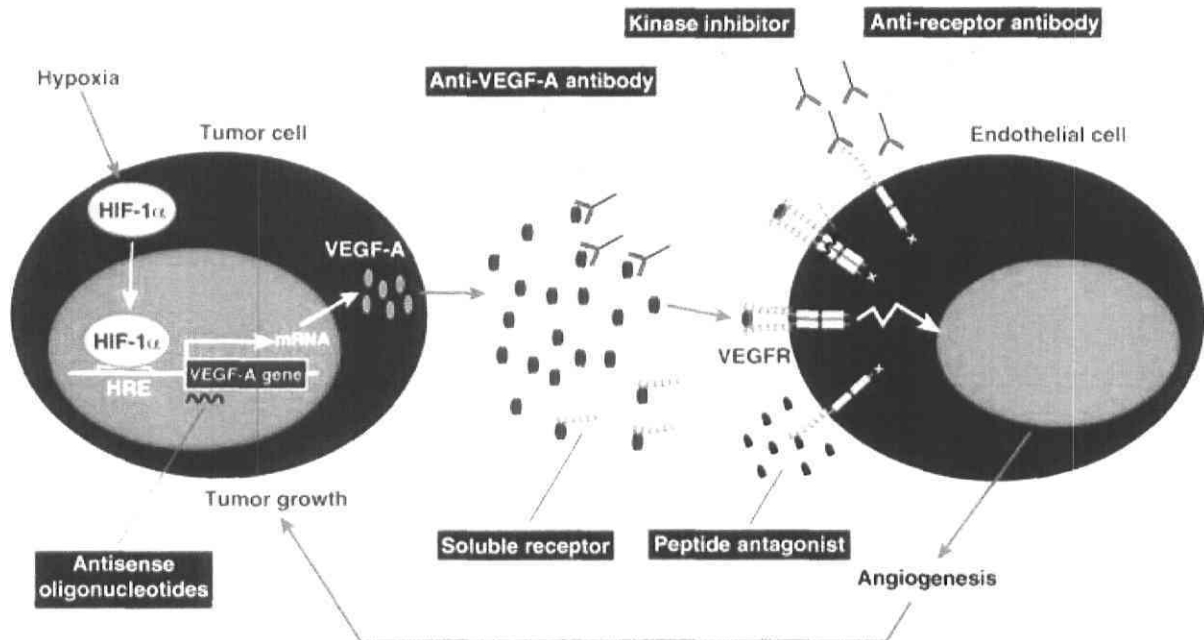


Figure 1-11: Thérapie antiangiogénique

Beaucoup de cellules cancéreuses produisent et sécrètent du VEGF-A. Plus précisément, en réponse à un état d'hypoxie, le facteur de transcription HIF1 α est activé dans les cellules cancéreuses. HIF-1 α va alors reconnaître son domaine HRE pour activer la production de VEGF-A. Plusieurs stratégies antiangiogéniques ont été développées pour inhiber l'action du VEGF-A produit par les cellules cancéreuses. Différentes approches ont comme objectif de bloquer la production de VEGF-A dans les cellules cancéreuses par des oligonucléotides antisens ou, de neutraliser le VEGF-A sécrété par des anticorps ou par des récepteurs solubles. Des peptides antagonistes ont également vu le jour ciblant les récepteurs pour empêcher la fixation du ligand naturel qu'est le VEGF-A. Enfin, des inhibiteurs de kinases ont été l'intérêt de différents groupes. Certaines de ces stratégies sont actuellement en test clinique en phase I, II ou III.

Adapté de (Matsumoto and Claesson-Welsh 2001)

1.7. La Heat Shock Protein 90 (HSP90)

1.7.1. Aperçu général

Les protéines de stress thermique, identifiées par HSP pour *Heat Shock Protein*, ont été découvertes voilà maintenant plus de 40 ans. Les études qui ont amené à une meilleure compréhension de ces protéines ont surtout été réalisées chez des insectes comme la drosophile. Lorsque les insectes subissent des variations de températures, les régions de certains chromosomes s'hypertrophient, dans des conditions hyperthermiques, permettant l'activation de la transcription de certains gènes. Ces gènes néotranscrits, ou simplement surexprimés, sont communément appelés de gènes de choc thermique (Burrows, Zhang et al. 2004).

Les protéines de choc thermique sont des protéines très conservées dans l'évolution des espèces. En effet, leur séquence en acides aminés possède un fort pourcentage d'homologie. Les *Heat Shock Proteins* se regroupent sous cinq grandes familles en fonction de leur poids moléculaire : HSP27 (27 kDa), HSP60 (60 kDa), HSP70 (70 kDa), HSP90 (90 kDa) et HSP110 (110 kDa). Il est intéressant de noter que HSP27 a fait l'objet d'études approfondies dans notre laboratoire. En effet, Huot J et collaborateurs ont observé que HSP27 correspond à un élément crucial dans la polymérisation d'actine dans les cellules endothéliales soumises à un stress oxydant comme le H₂O₂ (Huot, Houle et al. 1996; Huot, Houle et al. 1998).

De son côté, comme un grand nombre des protéines clientes de HSP90 sont des oncoprotéines, cette protéine chaperonne est récemment devenue une cible de choix pour développer des agents anti-tumoraux capables d'inhiber simultanément plusieurs voies de signalisation de l'oncogénèse. En effet, HSP90 est impliquée dans la régulation de protéines qui sont responsables de la malignité des cellules cancéreuses. Ainsi, plusieurs agents qui inactivent la fonction de HSP90 possèdent des propriétés anti-tumorales *in vitro* et *in vivo*.

Chez l'homme et dans le règne des mammifères, deux membres de la famille de HSP90 existent : HSP90 dans le cytoplasme et Grp94 dans le reticulum endoplasmique. La protéine chaperonne possède un poids moléculaire compris entre 87 et 92 kDa. HSP90 est une protéine dimérique constituée de trois régions : un domaine N-terminal qui fixe l'ATP, un domaine central impliqué dans l'activité ATPase et dans la reconnaissance des protéines clientes et, un domaine C-terminal responsable de la dimérisation. De manière très intéressante, HSP90 est une protéine excessivement abondante dans les cellules puisqu'elle représente 1 à 2 % des protéines totales solubles. Comme d'autres protéines chaperonnes, son expression peut fluctuer en réponse à un stress comme un choc thermique. De plus, elle possède un site de liaison de l'ATP. Enfin, les cellules endothéliales humaines comme les HUVEC expriment HSP90 (Kamal, Boehm et al. 2004).

1.7.2. Expression et caractéristiques de HSP90

HSP90 est une protéine chaperonne exprimée de manière ubiquiste. C'est une protéine impliquée dans la conformation, l'activation et l'assemblage de différentes protéines incluant des médiateurs clés de voies signalétiques, de voies contrôlant le cycle cellulaire ou de voies régulant la transcription (Isaacs, Xu et al. 2003; Pratt and Toft 2003).

Contrairement à d'autres protéines HSP, HSP90 n'officierait pas au niveau de la néosynthèse de protéine mais pourrait plutôt empêcher l'agrégation de ses protéines clientes et ainsi favoriser leur renaturation. Les protéines clientes de HSP90 sont très nombreuses et appartiennent à différentes familles comme des protéines transmembranaires à activité tyrosine kinase dont le HER-2/neu, le *epidermal growth factor receptor* (EGFR), le MET et *insulin-like growth factor-1 receptor* (IGF-1R), ou des protéines de signalisation particulièrement importantes dont Akt, Raf-1 ou IKK, d'autres comme p53, Kit, Flt3 ou v-src et bien d'autres encore... De manière intéressante, les protéines de la famille Src correspondent à des protéines clientes de HSP90. Mais, lorsque cette dernière interagit avec Src, ces protéines sont inactives et ce n'est qu'une fois après que HSP90 les ait libérées que les Src deviennent actives. En fait, il semblerait que HSP90 fasse office de transporteur (Helmbrecht, Zeise et al. 2000).

HSP90 est une protéine particulièrement étudiée en recherche sur le cancer. En effet, la HSP90 est connue comme nécessaire à l'activité de différentes protéines régulatrices de l'apoptose et, à travers ces propriétés de chaperonne peut conférer un avantage de survie certain aux cellules cancéreuses. La fonction de la survivine, protéine régulatrice de la prolifération cellulaire et de la mort cellulaire, surexprimée dans la presque totalité des cancers humains, est une cible de la protéine chaperonne HSP90 et, il semble que l'association des deux confère aux cellules cancéreuses un avantage supplémentaire de survie et de prolifération (Fortugno et al. 2003).

De plus, HSP90 joue un rôle antiapoptotique important en s'associant à la protéine RIP et au domaine kinase de IKK α . Une étude récente a montré qu'une surexpression de HSP90, en prévenant le clivage de bid, peut inhiber l'apoptose induite par le tumor necrosis factor α (TNF α) dans des cellules NIH3T3 (Zhao, Wang et al. 2004) Heat shock protein 90 suppresses).

1.7.3. Régulation de HSP90

HSP90 est régulée par différentes protéines co-chaperonnes. En effet, ces dernières, en interagissant avec HSP90, la régulent dans une suite dynamique d'événements moléculaires qui sont liées à la conformation de HSP90 couplée ou non avec l'ATP (**Figure 1-12**) (Pratt and Toft 2003; Kamal, Boehm et al. 2004). Les protéines cibles interagissent avec HSP90 dans ce qui correspond à un premier complexe, contenant différentes protéines co-chaperonnes. Suite à la fixation de l'ATP et de son hydrolyse, HSP90 forme alors un complexe mature qui possède les potentialités pour catalyser la maturation conformationnelle de la protéine cible.

De nombreuses protéines kinases telles Raf, Cdk4/6, v-Src ou AKT/PKB, peuvent s'associer *in vivo* à la protéine HSP90. De plus, un co-chaperon de HSP90 appelé p50 recrute spécifiquement ces protéines kinases pour les associer à HSP90. p50 a été identifiée chez la levure *S. cerevisiae*, comme étant le produit du gène *cdc37*. La mutation du gène *cdc37* conduit à une déficience du cycle cellulaire. La protéine kinase Cdk4 qui contrôle le cycle cellulaire est dépendante de p50/*cdc37* pour son association avec les cyclines. L'association de ces deux protéines, HSP90 et p50/*cdc37*, sont aussi essentielles au fonctionnement de la cascade de phosphorylation des MAP kinases. En particulier Raf-1 est recruté à la membrane plasmique par Ras et activé sous sa forme associée à HSP90 et p50/*cdc37*.

Il est intéressant de noter que p50/*cdc37* possède des propriétés de chaperonne et peut par elle-même contribuer à la fonction de maintien de structure. En effet, p50/*cdc37* interagit et est nécessaire à la fonctionnalité des récepteurs aux androgènes, mais pas aux récepteurs aux glucocorticoïdes (Rao et al, 2001, JBC).

Dans de nombreux cas, l'interaction de HSP90 avec ces partenaires implique sa partie c-terminale, au niveau d'un motif commun d'interactions protéine-protéine : le tetratricopeptide repeat domain (TPR). Ce domaine correspond à un motif de 34 aminoacides qui est répété plusieurs fois. Structurellement, cela forme un élément conservé en hélice α . Ce domaine a été identifié dans bon nombre de protéines partenaire de HSP90 comme Hop/Sti1, la phosphatase Pp5\Ppt1 et les immunophilines FKBP51, FKBP52, et Cyp40/Cpr6/Cpr7. Dans le cas de Hop, les motifs TPRs sont répétés trois fois. Un premier motif est responsable de l'interaction de Hop avec HSP90, un second pour l'interaction avec HSP70, alors que le troisième reste encore à déterminer.

De manière importante, il est à noter que l'interaction entre p50/*cdc37* et HSP90 n'implique pas les motifs TPR. Ainsi, bien que le site de fixation de p50/*cdc37* à HSP90 se situe en c-terminale, proche du site accepteur du motif TPR, la fixation de p50/*cdc37* à HSP90 semble exclusive.

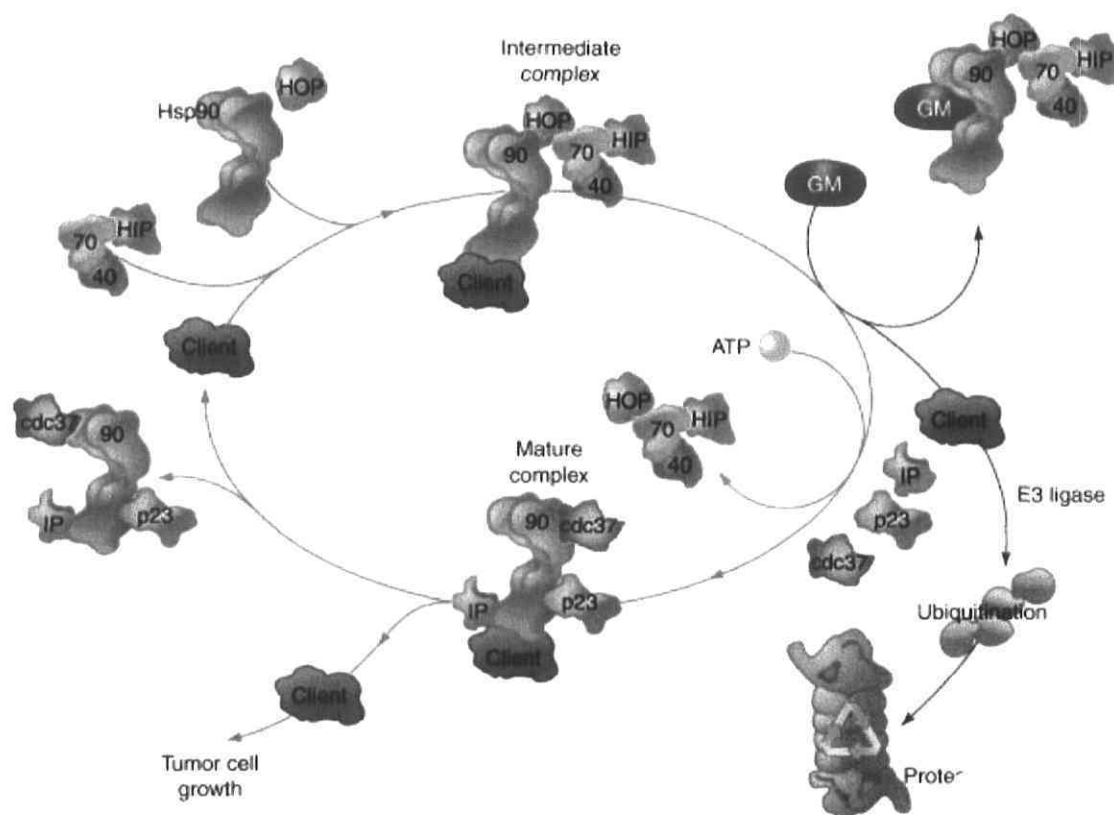


Figure 1-12 : Le cycle de la molécule chaperonne HSP90.

Le cycle de la molécule HSP90 est un processus dynamique dans lequel les protéines cibles fixent HSP90 formant des complexes contenant également des co-chaperonnes comme les HSP70, HSP40, Hip et Hop. HSP90 fixe l'ATP et l'hydrolyse, permettant ainsi de former un complexe mature contenant des protéines comme p23, p50/cdc37. Ces protéines catalysent la maturation conformationnelle des protéines cibles de HSP90. Les inhibiteurs de HSP90 comme la geldanamycine fixe la partie N-terminale de HSP90 au niveau de la poche fixant l'ATP empêchant ainsi l'hydrolyse de l'ATP.

Adapté de (Whitesell, Mimnaugh et al. 1994; Stebbins, Russo et al. 1997; Kamal, Boehm et al. 2004)

1.7.4. Inhibiteurs de HSP90

L'approche pharmacologique présente l'avantage d'inhiber l'ensemble des isoformes de la protéine HSP90. Sachant que la plante *Arabidopsis* comprend sept gènes codant pour cette protéine; cette approche possède par contre l'inconvénient d'être moins spécifique. Parmi les inhibiteurs classiques de HSP90 existe la geldanamycine (**Figure 1-13**). Tel que mentionné précédemment, cet inhibiteur est un antibiotique de la classe des ansamycines et fixe la protéine HSP90 au niveau d'une poche très conservée en N-terminale correspondant au domaine qui interagit l'ATP (Whitesell, Mimnaugh et al. 1994; Stebbins, Russo et al. 1997). L'inhibition de la fixation de l'ATP à son domaine provoque alors l'inhibition de l'activité de HSP90 conduisant les protéines cibles de HSP90 vers le protéasome (Mimnaugh, Chavany et al. 1996). Ces inhibiteurs sont d'une grande utilité pour étudier les fonctions de HSP90. En effet, la geldanamycine a été testée sur la migration des cellules endothéliales et cet inhibiteur possède la capacité de bloquer totalement la migration cellulaire et la formation de fibres de stress sans agir sur l'activation de la voie p38 en réponse au VEGF (Rousseau, Houle et al. 1997; Rousseau, Houle et al. 2000). De plus, l'inhibiteur de HSP90, 17AAG, possède des propriétés anti-tumorales très prometteuses et est testé en essai clinique. En effet, ce médicament, le 17AAG, a montré lors des premiers essais des effets prometteurs dans la lutte contre certains cancers dont le cancer du sein, de l'intestin, de la prostate et de la peau en laboratoire, tout comme chez 30 patients (Bisht, Bradbury et al. 2003). La molécule 17AAG est schématisée dans la **figure 1-13**.

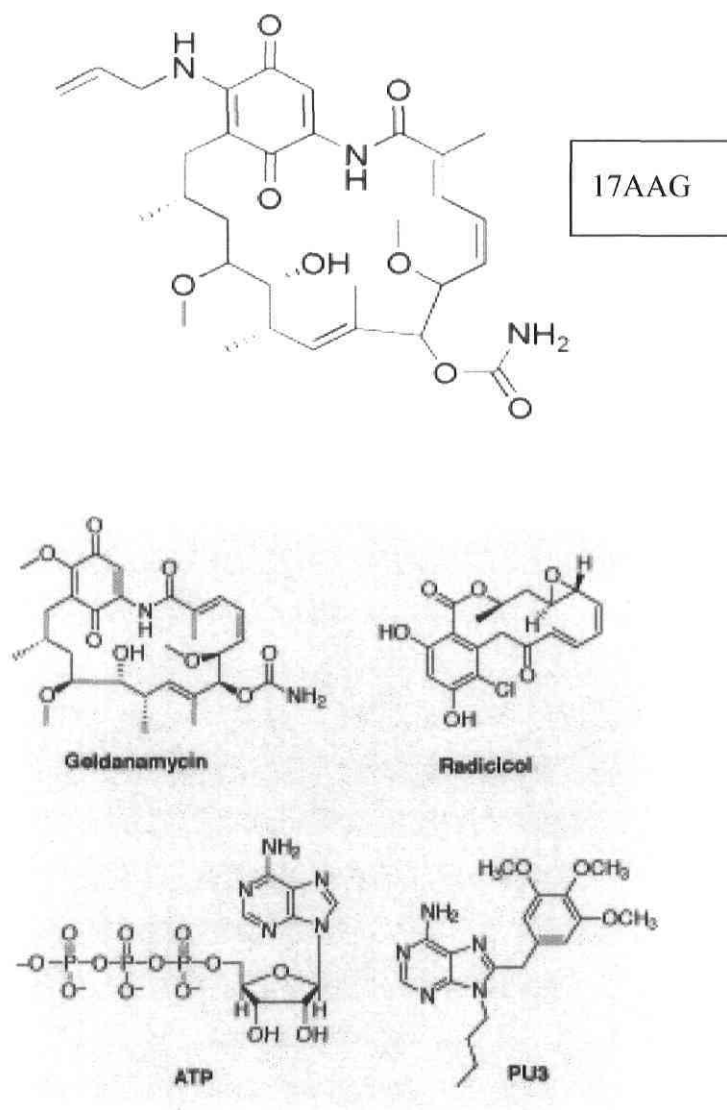


Figure 1-13 : Structure de différents inhibiteurs de HSP90

Différents inhibiteurs de HSP90 existent comme le 17AAG, la geldanamycine, le radicicol ou PU3. Ces inhibiteurs ont tous comme cible la poche de fixation de l'ATP empêchant ainsi l'hydrolyse de cette molécule par HSP90. L'absence d'hydrolyse d'ATP conduit alors HSP90 à rester dans un état conformationnel immature. Les protéines clientes de HSP90 sont alors ubiquitinées (possiblement par une E3 ubiquitine ligase) et dégradées par le protéasome.

Adapté (Kamal, Boehm et al. 2004)

1.8. La Kinase d'Adhérence Focale (FAK)

En 1992, des chercheurs ont découvert la Kinase d'Adhérence Focale FAK (Hanks, Calalb et al. 1992; Schaller, Borgman et al. 1992). Depuis, plus de 1875 recherches ont été publiées sur cette protéine. Par après, les recherches ont rapidement associé FAK aux molécules de la famille Src. En effet, cette kinase a été clonée indépendamment par l'utilisation d'anticorps monoclonaux développés contre la phosphorylation de sites tyrosine dans des cellules v-Src transformées CEFs (Schaller, Borgman et al. 1992). De même, FAK a également été clonée par l'utilisation d'une stratégie basée sur l'homologie de séquence afin d'identifier de nouvelles protéines à activité tyrosine kinase dans une banque d'ADNc de souris (Hanks, Calalb et al. 1992). De plus, plusieurs équipes ont démontré le rôle prédominant de FAK dans la signalisation émanant des intégrines (Guan, Trevithick et al. 1991; Kornberg, Earp et al. 1992). Cependant, malgré ces avancées, notre compréhension sur FAK reste insuffisante. En effet, comment la signalisation émanant des récepteurs à activité tyrosine kinase et des intégrines contribue-t-elle à la régulation des complexes dynamiques de la mobilité cellulaire, à la progression du cycle cellulaire et à la survie cellulaire ? Toutes ces questions demeurent un challenge excitant à relever.

1.8.1. La structure de FAK

FAK fait partie d'une famille récemment décrite, celle des kinases de l'adhérence focale correspondant à des protéines tyrosine kinases (PTK) cytoplasmiques riches en proline, dépourvues d'activité réceptrice membranaire. FAK est une protéine d'un poids moléculaire de 125 kDa et possède une structure très conservée au sein des espèces. Son gène est localisé sur le chromosome 8q24term, un locus qui est sujet à être activé dans les cellules cancéreuses. FAK est exprimée dans beaucoup de tissus et types cellulaires différents. La protéine FAK ne possède ni région transmembranaire ni domaines SH2 ou SH3 (*Src homology regions 2 and 3*). Elle est divisée en trois domaines, un domaine amino-terminal et un domaine carboxy-terminal délimitant le domaine kinase central (**Figure 1-14**) (Cornillon, Campos et al. 2003; Parsons 2003).

Le domaine central porte l'activité catalytique de la protéine (Schaller, Borgman et al. 1992). Le domaine kinase de FAK contient des séquences similaires à d'autres protéines, récepteurs ou non, à activité tyrosine kinase. De manière intéressante, la structure en cristal du domaine kinase de FAK révèle la présence d'un pont disulfure dans le domaine N-terminal. Cette caractéristique inhabituelle pour une kinase confère à ce pont un possible rôle dans la fonction kinase (Nowakowski, Cronin et al. 2002).

Le domaine N-terminal possède une séquence homologue à celles des protéines du groupe 4.1/ERM (ezrine, radixine et moésine) correspondant au domaine FERM (F pour protéine 4.1, E pour ezrine, R pour radixine, M pour moésine). Le domaine FERM de FAK peut interagir avec différents récepteurs comme l'intégrine $\alpha_v\beta_5$ (Schaller, Otey et al. 1995; Eliceiri 2003) et $\alpha_v\beta_3$ (Courter, Lomas et al. 2005). Le domaine FERM de FAK interagit avec des récepteurs de facteur de croissance, comme, par exemple avec la forme activée du récepteur de l'*epidermal growth factor* (EGF) bien qu'il reste à déterminer si cette interaction est directe (Sieg, Hauck et al. 2000). De plus, l'activation de Ekt/BMX (un membre de la famille à activité tyrosine kinase Btk) par des protéines de la matrice extracellulaire a été décrite. Cette activation est régulée par FAK et nécessite une interaction entre le domaine PH de Ekt et le domaine FERM de FAK (Chen and Guan 1994). Par ailleurs, des données supplémentaires établissent le rôle du domaine FERM de FAK dans la régulation de son activité catalytique et de sa localisation cellulaire (Dunty and Schaller 2002; Stewart, Ham et al. 2002). Le domaine FERM en N-terminal peut diriger FAK vers les intégrines et/ou les récepteurs des facteurs de croissance et ainsi, réguler son interaction avec d'autres protéines à activité kinase. Enfin, ce domaine est particulièrement important dans la motilité cellulaire. En effet, une surexpression du domaine FERM conduit au blocage de l'activation de FAK et résulte en une inhibition de la migration cellulaire via le blocage de récepteurs couplés aux protéines G (Chen, Kim et al. 2001).

Le domaine C-terminal, appelé le *FAK-related-non-kinase* (FRNK), est exprimé de manière indépendante dans certaines cellules et peut fonctionner comme un régulateur négatif de l'activité kinase de FAK (Schaller, Borgman et al. 1993; Xiong and Parsons 1997; Taylor,

Mack et al. 2001). L'expression de FRNK est contrôlée par un élément transcriptionnel présent au niveau d'un intron entre l'exon codant pour le domaine kinase le plus en 3' et le premier exon codant pour le domaine C-terminal (Nolan, Lacoste et al. 1999). À la différence de FAK qui est exprimée de façon ubiquiste, la région régulatrice du promoteur de FRNK contient des éléments spécifiques aux tissus. Les cellules intestinales et pulmonaires possèdent les plus importants taux d'expression d'ARN de FRNK (Nolan, Lacoste et al. 1999). Le mode d'action de la molécule FRNK est une question de compétition. En effet, FRNK entre en compétition par sa partie C-terminale avec FAK au sein des complexes d'adhérence. Cette compétition, en limitant les différentes interactions protéiques, permet une régulation de l'adhérence, de la migration, du cycle cellulaire et éventuellement de la mort cellulaire (Sieg, Hauck et al. 1999; Mortier, Cornelissen et al. 2001). De plus, l'expression de FRNK est élevée dans les cellules vasculaires de muscles lisses et semble augmentée en réponse à une blessure vasculaire (Taylor, Mack et al. 2001). Dans beaucoup de types cellulaires, l'induction d'une surexpression de FRNK conduit à une inhibition de l'étalement cellulaire, de la migration cellulaire et de croissance cellulaire en réponse à des facteurs de croissance via les voies impliquant les MAP kinases (Richardson, Malik et al. 1997; Hauck, Sieg et al. 2001; Taylor, Mack et al. 2001). Le domaine carboxy-terminal de FAK comprend deux domaines riches en proline impliqués dans des interactions protéines-protéines (Sieg, Hauck et al. 1999; Liu, Kiosses et al. 2002). Plus précisément, à l'extrémité du domaine FRNK, FAK possède une séquence d'environ 100 AA correspondant à un domaine appelé *focal-adhesion targeting* (FAT) responsable du recrutement-interaction de protéines aux points focaux d'adhérence comme la vinculine, la paxilline, p130Cas ou la taline (Schaller, Borgman et al. 1993; Turner, Schaller et al. 1993; Bellis, Miller et al. 1995; Polte and Hanks 1995; Harte, Hildebrand et al. 1996; Polte and Hanks 1997). En effet, cette séquence est à la fois nécessaire et suffisante pour cibler FAK aux complexes d'adhérence (Hildebrand, Schaller et al. 1995) et l'intégrité de cette région est essentielle pour la signalisation de FAK (Sieg, Hauck et al. 1999; Thomas, Hagel et al. 1999). Des études en crystallographie par rayon-X et des analyses par RMN du domaine FAT ont révélé la présence d'un assemblage de quatre hélices qui se retrouve également dans d'autres protéines d'adhérence incluant la vinculine, Cas et l' α -caténine (Arold,

Hoellerer et al. 2002; Hayashi, Vuori et al. 2002; Liu, Kiosses et al. 2002). Le domaine FAT est le site de recrutement de la paxilline. En effet, la présence de deux poches hydrophobiques en situation opposées sont nécessaires à l'interaction du domaine FAT avec deux motifs 'LD' de la paxilline (Arold, Hoellerer et al. 2002; Hayashi, Vuori et al. 2002; Liu, Kiosses et al. 2002) ce qui établit l'intégrité de la structure en quatre hélices de ce domaine. Le domaine carboxy-terminal est donc primordial pour l'interaction de FAK avec différentes protéines aux points focaux d'adhérence.

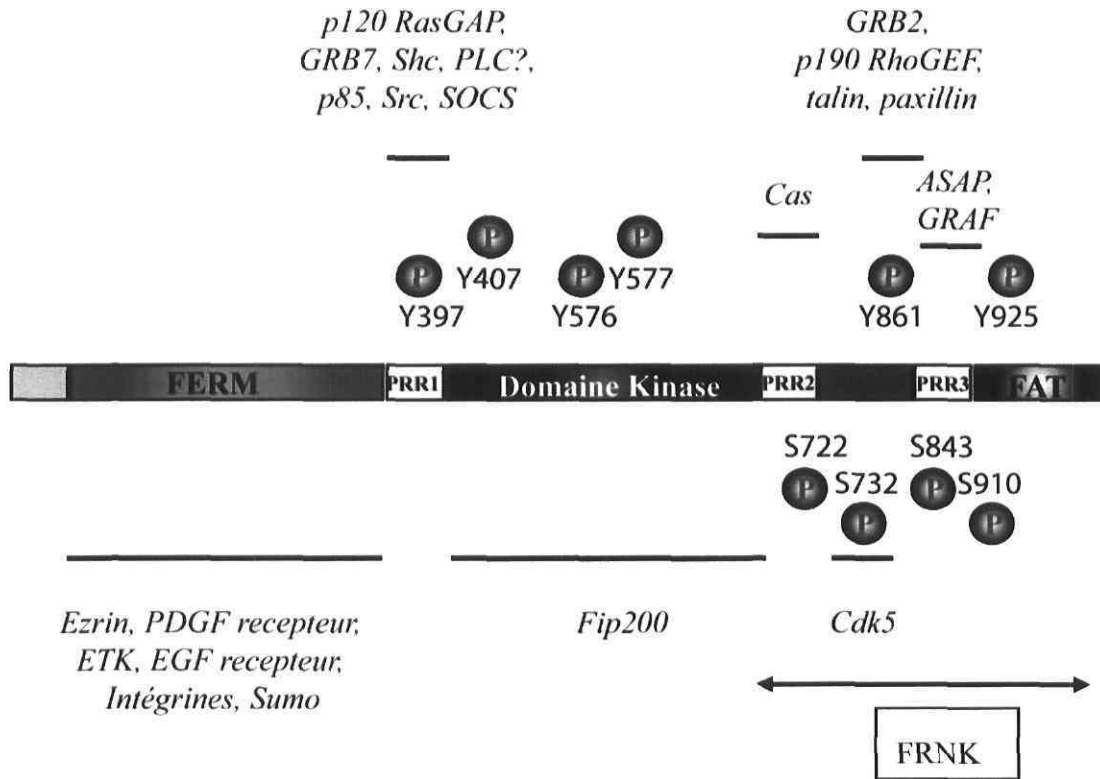


Figure 1-14 : Schéma représentant les principaux domaines de la kinase d'adhérence focale

La kinase d'adhérence focale est souvent schématisée selon ces trois domaines principaux : en N-terminale, le domaine FERM ; central, le domaine kinase et en C-terminal, le domaine FAT. D'autres domaines sont malgré tout primordiaux comme le domaine riche en proline (PRR1-3). De plus, il existe 6 résidus tyrosines répartis du central jusqu'au domaine c-terminal et 4 résidus sérine uniquement présent en c-terminal. Ces résidus phosphorylables selon les stimuli sont liés à l'activité et aux fonctions de la molécule. Les sites tyrosines et sérines phosphorylables de FAK, ainsi que les protéines interagissant avec FAK sont identifiées.

Adapté de (Mitra, Hanson et al. 2005)

1.8.2. Activation-phosphorylation de FAK

Des souris déficientes en protéine FAK ont été générées afin de déterminer le rôle de FAK notamment durant le développement (Ilic, Furuta et al. 1995). Ces études ont permis d'observer que les embryons mutants présentent des défauts au niveau du développement du mésoderme et que les cellules provenant de ces embryons ont un potentiel migratoire très réduit *in vitro*. De plus, ces études ont rapidement suggéré que FAK participe à l'assemblage/désassemblage des points focaux d'adhérence. En effet, il a été observé que les cellules déficientes en FAK possèdent un nombre supérieur de points focaux d'adhérence. D'autre part, l'expression stable du dominant négatif de FAK, FRNK dans des cellules NIH3T3 transformées par v-Src, conduit à une inhibition de l'invasion *in-vitro* d'une cellule de Matrigel (Hauck, Hsia et al. 2002). FAK est donc une protéine centrale dans le contrôle de la migration cellulaire et son activité, ainsi que ses fonctions, sont directement liées à la phosphorylation de ses sites tyrosines et sérines. De plus, les interactions entre la partie amino-terminale de FAK et les récepteurs de facteurs de croissance ou les intégrines, et celles entre la partie FAT de FAK et différentes protéines cytoplasmiques (comme la taline) suggèrent une régulation différente de FAK en fonction de l'origine du stimulus initial (facteurs de croissance ou intégrines). La partie amino-terminale de FAK semble avoir un rôle plus important pour l'activation de cette dernière par les facteurs de croissance et, à l'inverse, un rôle plus important de la partie carboxy-terminale pour l'activation par les intégrines (Shen and Schaller 1999).

FAK possède six différents sites tyrosines situés en N-terminal (Tyr 397, 407), dans le domaine catalytique (Tyr576, 577) et dans la partie carboxy-terminale de la protéine (Tyr 861, 925) (Mitra, Hanson et al. 2005). Le site tyrosine de FAK le mieux caractérisé est son site d'autophosphorylation, la tyrosine 397 (Eide, Turck et al. 1995). L'autophosphorylation de FAK peut survenir en *cis* ou *trans* et elle est reconnue comme le témoin de l'activation de FAK. La phosphorylation de FAK sur tyrosine 397 crée un motif qui peut être reconnu par différentes protéines possédant des domaines SH2 comme les protéines de la famille Src Kinases (SFKs), la phospholypase C γ (PLC γ), des protéines

suppresseurs du signal des cytokines (SOCS), la protéine liant les récepteurs de facteurs de croissance -7 (GRB7), la protéine adaptatrice Shc, la p120 RasGAP et la sous-unité 85 de la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) (McLean, Fincham et al. 2000; Hanks, Ryzhova et al. 2003; Parsons 2003; Zhai, Lin et al. 2003). Actuellement, il n'est toujours pas connu si ces différentes protéines interagissent de manière différente avec le site tyrosine 397 phosphorylé de FAK en réponse à des stimuli particuliers ou s'il existe différents complexes avec un grand groupe de protéines FAK activées. Une mutation au niveau de ce résidu tyrosine 397 entraîne l'incapacité pour FAK d'avoir une activité biologique. En effet, FAK Y397F conduit à un blocage de la migration cellulaire pour les cellules fibroblastiques (Sieg, Hauck et al. 1999). Néanmoins, lors de la migration des cellules épithéliales, on ne retrouve pas d'augmentation majeure de la phosphorylation de Tyr397 mais plutôt une redistribution de toutes les autres formes phosphorylées sur tyrosine de FAK au niveau des complexes d'adhérence (Nakamura, Yano et al. 2001). Enfin, il est à noter que de récentes observations suggèrent que le site tyrosine 397 peut être phosphorylé par une autre molécule FAK grâce à une dimérisation (Toutant, Costa et al. 2002). Ainsi, il reste beaucoup à apprendre des subtilités de FAK par rapport à sa phosphorylation/activation notamment sur ce site tyrosine 397.

La phosphorylation du site tyrosine 397 semble donc correspondre à une augmentation de l'activité catalytique de FAK (Lipfert, Haimovich et al. 1992; Calalb, Polte et al. 1995) et semble importante pour la phosphorylation sur tyrosine de protéines associées (Cobb, Schaller et al. 1994; Schaller, Hildebrand et al. 1994; Schaller, Hildebrand et al. 1999). Cependant, les sites tyrosine 576 et 577 sont également deux éléments clés. En effet, ces sites tyrosines, comme la tyrosine 397, sont des sites très conservés entre espèces et sont situés dans la boucle catalytique du domaine kinase de FAK (Owen, Ruest et al. 1999). La phosphorylation de ces sites tyrosines est importante pour obtenir un état maximal de l'activité de FAK et donc pour un effet maximal de la protéine sur des événements sous-jacents (Calalb, Polte et al. 1995; Owen, Ruest et al. 1999). Il semble actuellement admis que les sites tyrosines 576 et 577 sont phosphorylés par un membre de la famille kinase Src. De manière intéressante, il a récemment été montré que la protéine Shb possède le potentiel pour se fixer au site tyrosine 1175 du récepteur VEGFR2. L'inhibition

d'expression de cette protéine par une approche avec les ARN d'interférence conduit à une inhibition de la phosphorylation de la phosphatidylinositol 3-kinase, de la phosphorylation de FAK sur tyrosine 576 dépendant de Src, de la génération de points focaux d'adhérence et, de la formation de fibres de stress en réponse au VEGF (Holmqvist, Cross et al. 2004).

Le site tyrosine 407 est beaucoup moins décrit dans la littérature. Néanmoins, ce site a été proposé comme site potentiel de phosphorylation par les activités Src kinase (Calalb, Polte et al. 1995; Eide, Turck et al. 1995) et par la proline rich kinase-2 (Pyk2).

Le site tyrosine 861 est fortement phosphorylé dans différents types cellulaires suite à une activation par divers stimuli (Slack, Adams et al. 2001). Sa phosphorylation semble dépendante de Src et liée aux intégrines (Eliceiri, Puente et al. 2002). De manière intrigante, le site tyrosine 861 a été récemment décrit comme pouvant induire la phosphorylation du site tyrosine 397 (Leu and Maa 2002).

Enfin, le site tyrosine 925 a très bien été décrit comme pouvant devenir un site d'ancrage pour la protéine Grb2 (Chen and Guan 1994; Schlaepfer, Hanks et al. 1994; Schlaepfer and Hunter 1996).

Par ailleurs, en plus de la présence de ces sites tyrosines, FAK possède quatre sites sérines dans le domaine C-terminal : les sites sérines 722, 732, 843 et 910. Le rôle de la phosphorylation de ces sites sérine reste encore à être déterminer et fera également l'objet d'une partie de cette thèse. Il a été émis l'hypothèse que leur situation, en C-terminal de la protéine, pouvait être une indication de leur rôle. En effet, leur proximité de sites servant à FAK pour interagir avec différentes protéines semble explicite (Ma, Richardson et al. 2001) et suggère un rôle de ces sites dans la modulation de l'interaction/stabilité de protéine de signalisation sous-jacente à FAK. De plus, une étude a été menée sur le site sérine 732 de FAK dans des cellules neuronales. Ces résultats ont montré de manière claire que le site sérine 732 est phosphorylé directement par Cdk5 et est impliqué dans la migration cellulaire des neurones (Xie, Sanada et al. 2003; Xie and Tsai 2004).

1.8.3. Pyk2

Les protéines FAK et *proline rich tyrosine kinase-2* (Pyk2) sont les deux seuls membres de la famille FAK à activité kinase, non récepteur. Pyk2 est aussi appelée *cell adhesion kinase* (CAKb), *related adhesion focal tyrosine kinase* (RAFTK) ou *calcium-dependent protein tyrosine kinase* (CADTK) (Avraham, London et al. 1995; Lev, Moreno et al. 1995; Sasaki, Nagura et al. 1995; Yu, Li et al. 1996). De plus, la protéine Pyk2 est surtout exprimée dans les cellules endothéliales ainsi qu'au niveau du système nerveux et des cellules hématopoïétiques.

Pyk2 est très similaire à la protéine FAK et présente les mêmes domaines que précédemment décrits pour FAK (FERM, kinase, proline-rich et FAT) ainsi qu'un certain nombre de sites en commun (**Figure 1-15**). En effet, Pyk2 possède une très grande homologie de séquence avec FAK : 60% au niveau du domaine kinase et, une position quasi-identique de quatre sites tyrosine phosphorylables. Ces derniers étant les sites tyrosine 402, 579, 580 et 880 correspondent respectivement aux sites 397, 576, 577 et 925 de FAK. Il est à noter que le site tyrosine 397 de FAK, correspondant à l'activation de la protéine, trouve son équivalent dans le site tyrosine 402 de Pyk2.

Tout comme FAK, Pyk2 possède en C-terminal le domaine FAT qui permet notamment le recrutement de la paxilline (Hayashi, Vuori et al. 2002). Cependant, Pyk2 montre une localisation, non pas au niveau des points focaux d'adhérence comme FAK, mais péri-nucléaire (Avraham, Park et al. 2000). Il est intéressant de noter que si la séquence en C-terminal de Pyk2 est remplacée par celle correspondant à FAK, la protéine chimérique résultante Pyk-FAK facilite la localisation de cette dernière au niveau des intégrines $\beta 1$ contenant les points focaux d'adhérence (Klingbeil, Hauck et al. 2001) ce qui indique que malgré le "peu" de différence au niveau des séquences, Pyk2 et FAK peuvent avoir des différences biologiques importantes.

Enfin, Le domaine N-terminal FERM de Pyk2 possède 40% d'homologie de séquence avec celui de FAK permettant ainsi qu'il y ait différents partenaires d'interaction. Ainsi, bien que Pyk2 et FAK peuvent interagir avec les SFKs et activer des voies signalétiques communes, les différences de séquences même si elles demeurent faibles contribuent à un recrutement différentiel des protéines et donc à limiter la redondance fonctionnelle de ces protéines à activité tyrosine kinase dans les cellules.

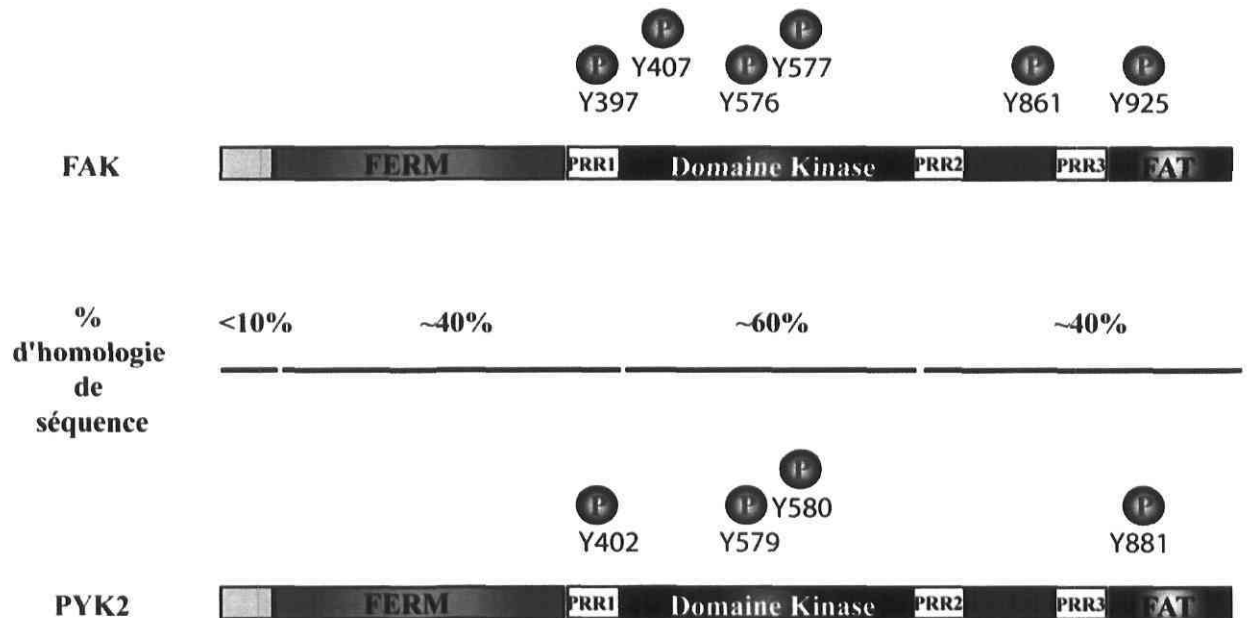


Figure 1-15 : Comparaison de structure entre FAK et PYK2

Les kinases FAK et Pyk2 sont les deux seuls membres de la famille FAK à activité kinase, non récepteur. Ce sont deux protéines avec un haut pourcentage d'homologie notamment au niveau du domaine kinase qui atteint 60%. Tout comme FAK, Pyk2 possède trois domaines principaux, les domaines FERM, domaine kinase, FAT et domaines riches en proline (PRR1-3). À la différence de FAK, Pyk2 ne possède que quatre sites tyrosines (402, 579, 580 et 881) phosphorylables alors que FAK en possède six (397, 407, 576, 577, 861 et 925). L'équivalent des résidus tyrosines 407 et 861 n'existe donc pas dans la kinase Pyk2). Les pourcentages d'homologie de séquence sont représentés entre les deux kinases.

Adapté de (Mitra, Hanson et al. 2005)

1.8.4. Fonctions de FAK

Les phosphorylations de FAK sur ses sites tyrosines et sérines ainsi que ses interactions avec d'autres protéines se retrouvent toutes impliquées à un moment ou à un autre dans un système régulateur complexe impliquant les intégrines et les facteurs de croissance.

FAK est impliquée dans différentes fonctions physiologiques clés de la cellule comme le contrôle de la migration cellulaire, la survie et la prolifération cellulaire.

1.8.4.1. Migration cellulaire

De nombreuses recherches ont mis en évidence le rôle de FAK dans la migration cellulaire. Particulièrement, des cellules FAK^{-/-} s'étalent beaucoup plus lentement sur une matrice extracellulaire, démontrent un nombre de points focaux d'adhérence important et migrent peu en réponse à un stimulus (Ilic, Furuta et al. 1995; Owen, Ruest et al. 1999; Sieg, Hauck et al. 1999; Sieg, Hauck et al. 2000). De plus, l'augmentation de l'expression de FRNK bloque la migration (Richardson, Malik et al. 1997; Sieg, Hauck et al. 1999; Taylor, Mack et al. 2001) probablement en séquestrant des protéines clés nécessaires pour une signalisation optimale de FAK. Par ailleurs, une surexpression de FAK dans des cellules de hamster CHO (Chinese Hamster Ovary) induit la migration cellulaire (Cary, Chang et al. 1996). La reconstitution de FAK sauvage dans des cellules FAK^{-/-} permet d'ailleurs de restaurer le potentiel migratoire de ces cellules tandis que la restitution de mutants FAK tel le mutant sur site 397 ne permet pas de restaurer ce même potentiel migratoire (Han and Guan 1999; Reiske, Kao et al. 1999). De manière intéressante, les cellules FAK^{-/-} démontrent une perte de l'orientation alors qu'une re-expression de la forme sauvage de FAK permet de restaurer les forces nécessaires à l'orientation des mouvements cellulaires en formant des points focaux d'adhérence (Wang, Castresana et al. 2001). De plus, des résultats récents indiquent la possibilité que FAK soit impliqué dans la régulation des points focaux d'adhérence via la régulation de protéines Rho (Chen, Tzen et al. 2002). Enfin, d'autres observations montrent FAK comme un élément central contrôlant positivement ou négativement la modulation de l'assemblage et désassemblage des points focaux d'adhérence essentiel pour la migration cellulaire (Webb, Parsons et al. 2002).

Par ailleurs, il a été démontré qu'une coopération entre adhérence et facteurs de croissance semble intervenir dans les processus d'angiogenèse au niveau des cellules endothéliales comme au niveau des cellules musculaires lisses. Par exemple, dans les cellules endothéliales, il existe une coopération étroite entre les intégrines et le récepteur VEGFR2 qui passe par l'intermédiaire de FAK (Soldi, Mitola et al. 1999). Cette coopération est nécessaire pour une migration correcte de ces cellules (Qi and Claesson-Welsh 2001; Cornillon, Campos et al. 2003; Masson-Gadais, Houle et al. 2003).

1.8.4.2. Survie, prolifération cellulaire et apoptose

Les interactions entre les intégrines et la matrice extracellulaire participent à des processus cellulaires vitaux. Il est reconnu que le message issu des intégrines est généralement transmis par la sous-unité β bien que la sous-unité α semble être l'élément orientant dans le sens de la prolifération ou de la quiescence (Sastry, Lakonishok et al. 1999). FAK, par ses interactions avec les intégrines est nécessaire et central pour la prolifération cellulaire (Zhao, Reiske et al. 1998). De plus, dans différents modèles dont celui utilisant des cellules épithéliales, il a été démontré que l'interaction entre l'adhérence cellulaire via les intégrines et les facteurs de croissance via leurs récepteurs spécifiques, notamment le VEGFR2, est nécessaire pour assurer correctement la survie des cellules en limitant l'anoïkis (Danilkovitch, Donley et al. 2000). En potentialisant la prolifération cellulaire et la survie, FAK est donc indirectement une protéine anti-apoptotique. Ce rôle a été confirmé sur différentes lignées cellulaires. De plus, l'inhibition de l'expression de FAK entraîne l'apoptose par perte d'adhérence (Xu, Owens et al. 1996). Enfin, dans différents modèles, la surexpression de FAK protège les cellules de l'apoptose en réponse à d'autres stimulus. En revanche, lorsqu'un signal apoptotique est engagé, les caspases 3 et 7 puis la caspase 6 vont cliver FAK (Wen, Fahrni et al. 1997).

1.8.5. FAK et le cancer

L'organisation du cytosquelette, l'adhérence et la motilité cellulaire, la régulation en réponse aux facteurs de croissance ainsi que la survie cellulaire sont tous des éléments qui sont modifiés dans une cellule cancéreuse. Ce n'est donc pas une surprise lorsque des études ont montré que des cellules tumorales expriment une quantité élevée de FAK (Owens, Xu et al. 1995). Il est en effet à noter que la concentration de FAK est élevée dans des tumeurs du sein, du côlon, de la prostate, de la thyroïde, des ovaires ou du mésenchyme (Jones, Brunton et al. 2000). En fait, de nombreuses études ont clairement montré la participation de FAK dans les processus du développement tumoral. En effet, une surexpression de FAK dans les cellules tumorales a été corrélée à une augmentation de la migration, de l'invasion et de la prolifération des cellules cancéreuses (Owens, Xu et al. 1995; Wang, Grammer et al. 2000; Slack, Adams et al. 2001). De manière intéressante, dans beaucoup de cellules cancéreuses, l'inhibition de FAK par une surexpression de FRNK tout en combinant une inhibition des récepteurs de facteurs de croissance conduit à l'apoptose (Golubovskaya, Beviglia et al. 2002). Finalement, bien que la contribution de FAK dans la régulation des facteurs de croissance et des intégrines dans les cellules cancéreuses reste peu comprise, le rôle maintenant bien documenté de FAK dans la régulation de l'assemblage et désassemblage de points focaux d'adhérence ainsi que son rôle en réponse aux facteurs de croissance, nous permet de savoir que FAK contribue certainement à réguler la migration, l'invasion et la prolifération des cellules cancéreuses.

1.9. Objectifs du projet de recherche

Le remodelage de l'actine en réponse au VEGF est un processus primordial dans la migration cellulaire (Rousseau, Houle et al. 2000). Le VEGF initie la migration des cellules endothéliales après sa fixation au VEGFR2 dans un processus qui nécessite la participation de HSP90 (Bernatchez, Soker et al. 1999; Rousseau, Houle et al. 2000). L'activation du VEGFR2, qui conduit à la migration des cellules endothéliales, active plusieurs voies signalétiques dont celles dépendant de la MAP kinase SAPK2/p38 (p38), la phosphatidylinositol-3 kinase et, ce qui nous intéresse particulièrement ici, la kinase d'adhérence focale FAK (Abedi and Zachary 1997; Rousseau, Houle et al. 1997; Matsumoto and Claesson-Welsh 2001; Lamalice, Houle et al. 2004). Ces voies signalétiques agissent de manière complémentaire pour transmettre un signal qui va conduire à un remodelage des fibres d'actine, pré requis pour la migration cellulaire. Plus précisément, le VEGF conduit à l'activation de FAK qui régule la réorganisation des points focaux d'adhérence. Cette voie dépendante de FAK permet de contrôler l'adhérence et la cassure des points d'ancrage de la cellule de manière séquentielle (Le Boeuf, Houle et al. 2004).

Cependant, malgré le fait que la protéine FAK est centrale dans la migration cellulaire, beaucoup reste à comprendre sur la manière dont FAK est activée et, quelles protéines transmettent le message provenant du VEGFR2 et l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. L'objectif général de mon projet était de déterminer les mécanismes par lesquels HSP90 et l'association des récepteurs VEGFR2/intégrine $\alpha_v\beta_3$, régulent l'activation de FAK en réponse au VEGF.

Les objectifs spécifiques découlant de cet objectif général étaient :

De caractériser le rôle joué par HSP90 en réponse au signal VEGF et donc en réponse à l'activation du VEGFR2.

De clarifier l'implication de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ suite à l'activation de VEGFR2 et d'identifier les événements signalétiques entre l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ et FAK.

Notre modèle de travail au début de ma thèse est illustré à la figure 1-16.

1.10. Aperçu de la thèse

Le laboratoire avait déjà démontré le rôle essentiel joué par HSP90 dans la signalisation menant à la phosphorylation de FAK par le VEGF (Rousseau, Houle et al. 2000; Masson-Gadais, Houle et al. 2003). Cependant, rien n'était connu concernant les mécanismes par lesquels HSP90 modulait la signalisation induite par le VEGF. Le premier objectif de mon travail portait sur la caractérisation de ces mécanismes. À cette fin, j'ai développé différents outils moléculaires qui m'ont permis de démontrer que HSP90 s'associe avec la portion c-terminale VEGFR2 en réponse au VEGF. Cette association est nécessaire à l'activation de la petite GTPase RhoA ainsi qu'à celle de la kinase ROCK puis à la phosphorylation de la tyrosine 407 de FAK, un événement nécessaire à la migration cellulaire. Ces résultats sont décrits dans le chapitre 2 de la thèse et ont fait l'objet d'une publication parue en 2004 dans la revue *Journal of Biological Chemistry* (Le Boeuf, Houle et al. 2004). De façon intrigante, le groupe du Dr Gratton J.P. a démontré pour la première fois que HSP90 est phosphorylée sur tyrosine en réponse au VEGF. Cette observation originale offre des perspectives inattendues et nouvelles pouvant permettre de mieux connaître le rôle de HSP90 dans la signalisation issue de VEGFR2. Entre autres, en collaboration avec le Dr. Gratton, j'ai obtenu certaines évidences que la phosphorylation de HSP90 pouvait contribuer à l'internalisation de VEGFR2. Un article dont je suis co-auteur sera soumis sous peu par le groupe du Dr Gratton. Ce manuscrit est annexé à ma thèse.

Par ailleurs, le fait que ROCK n'est pas une tyrosine kinase et donc ne pouvait contribuer directement à la phosphorylation de la tyrosine 407, a été une constatation cruciale dans la continuation de mon projet et a convergé vers la réalisation de mon second objectif visant à préciser le rôle de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. J'ai démontré que l'activation de ROCK menait en fait à la phosphorylation de la sérine 732 de FAK ce qui conduit à une réorganisation probable de la molécule rendant le site tyrosine 407 accessible à la phosphorylation par Pyk2 en aval de l'intégrine β_3 . Ces résultats, correspondant à un article accepté avec modifications dans la revue *Molecular Biology of the Cell*, sont rapportés dans le troisième chapitre.

L'ensemble de ces résultats apportent des connaissances nouvelles et importantes concernant les mécanismes de régulation de l'activation et des fonctions de FAK. Je discute de ces retombées dans les quatrième et cinquième sections de ma thèse.

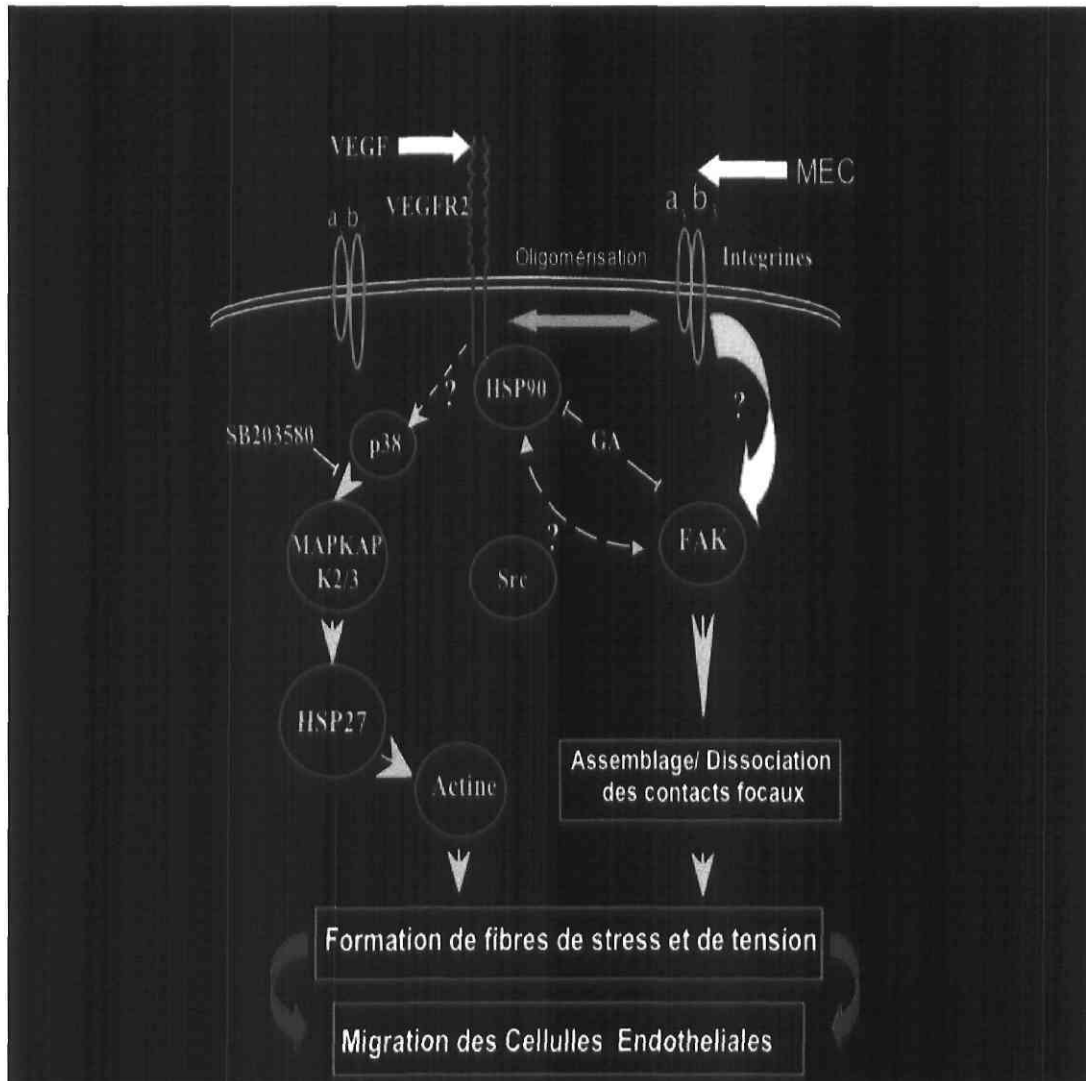


Figure 1-16 : : Modèle de travail

En réponse à l'association VEGF-VEGFR2, différents sentiers signalétiques vont être activés. Parmi ceux-ci, les sentiers p38 et FAK sont importants et complémentaires pour la migration des cellules endothéliales. En effet, le sentier p38 est impliqué dans la polymérisation des fibres d'actine et FAK dans la réorganisation des points focaux d'adhérence. Le voie dépendante de FAK est peu connue cependant, les intégrines $\alpha_v\beta_3$, HSP90 et les Src kinase sont potentiellement des joueurs clés dans la régulation de l'activation/phosphorylation de FAK.

Chapitre 2

Rôles de HSP90 et de Src dans la phosphorylation de FAK suite à l'activation du VEGFR2.

2. Régulation de la phosphorylation de la kinase d'adhérence focale (FAK) par la protéine de choc thermique 90 (HSP90) et les activités Src en réponse à l'activation du récepteur VEGFR2

Ce chapitre fait l'objet d'une publication dans la revue *The Journal of Biological Chemistry* (279 (37), pp.39175-39185, 2004) et constitue la version finale telle que publiée dans ce journal. Ce travail est reproduit ici avec la permission du journal. Cet article a été écrit avec mes travaux. J'ai effectué l'ensemble des manipulations qui sont ici représentées par les figures. J'ai également contribué à son écriture en réalisant la première version du manuscrit.

Received for publication, May 17, 2004, and in revised form, June 24, 2004
Published, JBC Papers in Press, July 6, 2004, DOI 10.1074/jbc.M405493200.

2.1. Résumé

L'exposition des cellules endothéliales au *vascular endothelial growth factor* (VEGF) induit la phosphorylation de la kinase d'adhérence focale (FAK) sur résidu tyrosine 407. Cette phosphorylation nécessite l'association du récepteur 2 du VEGF (VEGFR2) avec la protéine chaperonne HSP90. L'association VEGFR2/HSP90 implique les 130 derniers acides aminés du VEGFR2 et est bloquée par la geldanamycine, un inhibiteur spécifique de HSP90. De plus, la geldanamycine inhibe l'activation dépendante du VEGF, de la petite GTPase RhoA, ce qui conduit à une inhibition de la phosphorylation du résidu tyrosine 407 de FAK. Dans ce contexte, l'inhibition de la kinase dépendante de la petite GTPase RhoA (ROCK) avec le Y27632 ou par expression d'un dominant négatif de RhoA ou de ROCK conduit à la perte de phosphorylation du résidu tyrosine 407 de FAK. À la différence de la phosphorylation du résidu tyrosine 861, la phosphorylation du résidu 407 n'est pas influencée par la présence de l'inhibiteur des activités Src, le 4-amino-5-(4-chlorophenyl)-7-(t-butyl) pyrazolo[3,4-d] pyrimidine (PP2). Nous avons également trouvé que le recrutement de la paxilline par FAK était inhibé par la geldanamycine et non par PP2 alors que les deux inhibiteurs conduisent au blocage du recrutement de la vinculine par FAK. Comme attendu, le recrutement de la paxilline et de la vinculine par FAK était inhibé dans des cellules qui expriment le mutant FAK pour le résidu tyrosine 407 tandis que l'expression du mutant pour le résidu 861 conduisait à l'inhibition de la paxilline mais non de la vinculine. De manière importante, si le signal émanant de l'association VEGFR2/HSP90 a été bloqué par l'expression d'une forme délétée du VEGFR2, le $\Delta 130$ VEGFR2, forme ne permettant pas le recrutement de HSP90, alors la migration cellulaire est abolie. Nos résultats démontrent, pour la première fois, le rôle clé joué par le sentier signalétique VEGFR2-HSP90-RhoA-ROCK-FAK/Tyr(407) en réponse au VEGF, signal qui conduit à la formation des points focaux d'adhérence et à la migration des cellules endothéliales.

2.2. Article

Regulation of vascular endothelial growth factor receptor 2-mediated phosphorylation of focal adhesion kinase by heat shock protein 90 and Src kinase activities.

Fabrice Le Boeuf‡, François Houle and Jacques Huot*

From 1 Le Centre de recherche en oncologie de l'Université Laval, L'Hôtel-Dieu de Québec, Québec G1R-2J6, Canada

This work was supported by The Canadian Institutes for Health Research Grant MOP 15402. ‡Held a studentship from "La Fondation de Transplantation d'Organes de France".

*Corresponding Author: Dr. Jacques Huot, Centre de recherche en oncologie de l'Université Laval, L'Hôtel-Dieu de Québec, 9 rue McMahon, Québec, G1R 2J6, Canada. Tel.: (418) 525 4444 15553. Fax: (418) 691-5439. E-mail: Jacques.Huot@phc.ulaval.ca

RUNNING TITLE: HSP90 and Src in FAK phosphorylation by VEGFR2.

2.2.1. Summary

Exposure of endothelial cells to vascular endothelial growth factor (VEGF) induces tyrosine phosphorylation of FAK on site Y407, an effect that requires the association of VEGFR2 with HSP90. The association of VEGFR2 with HSP90 involves the last 130 amino acids of VEGFR2 and is blocked by geldanamycin, a specific inhibitor of HSP90. Moreover, geldanamycin inhibits the VEGF-induced activation of the small GTPase RhoA, which results in an inhibition of phosphorylation of FAK on site Y407. In this context, the inhibition of ROCK with Y27632 or by expression of dominant negative forms of RhoA or ROCK impairs the VEGF-induced phosphorylation of Y407 within FAK. In contrast to phosphorylation of Y861, the phosphorylation of site Y407 is insensitive to Src kinase inhibition by PP2. We also found that the recruitment of paxillin to FAK is inhibited by geldanamycin but not by PP2, whereas both geldanamycin and PP2 inhibit the recruitment of vinculin to FAK. In accordance, the recruitment of paxillin and vinculin to FAK is inhibited in cells that express the mutant FAK-Y407F, whereas the expression of the mutant Y861F inhibits the recruitment of paxillin but not of vinculin. Importantly, cell migration is abolished in cells in which the signal from the VEGFR2-HSP90 pathway is blocked by the expression of $\Delta 130$ VEGFR2, a deletant of VEGFR2 that does not associate with HSP90. Our findings underscore for the first time the key role played by the VEGFR2-HSP90-RhoA-ROCK-FAK/Y407 pathway in transducing the VEGF signal that leads to the assembly of focal adhesions and endothelial cell migration.

2.2.2. Footnotes

The abbreviations used are: VEGF, vascular endothelial growth factor; bFGF, basic fibroblast growth factor; FAK, focal adhesion kinase; HSP90, heat shock protein of 90 kDa; HUVEC, human umbilical vein endothelial cell; PAE, porcine aortic endothelial; PP2, 4-amino-5-(4-chlorophenyl)-7-(*t*-butyl) pyrazolo[3,4-*d*] pyrimidine; ROCK, RhoA kinase; SAPK, stress-activated protein kinase; VEGFR2, vascular endothelial growth factor receptor 2; HA, hemagglutinin; GFP, green fluorescent protein; GST, glutathione *S*-transferase; wt, wild type.

2.2.3. Introduction

Vascular endothelial growth factor (VEGF)¹ encompasses a family of structurally related proteins that includes placental derived growth factor, VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, and VEGF-D. Recently, endocrine gland-derived VEGF has been reported as a functionally, but structurally unrelated, member of the VEGF family (1). Human VEGF-A monomers exist as five different isoforms of which VEGF₁₆₅ is the most abundant and is referred to as VEGF. VEGF plays major roles in regulating the functions of endothelial cells. It is a potent angiogenic agent that regulates key steps of the angiogenic process, including endothelial cell proliferation and migration and production of plasminogen activators (2). VEGF exerts its effects after binding to two homologous membrane tyrosine kinase receptors present on vascular endothelial cells, VEGFR1 (Flt-1 (Fms-like tyrosine kinase-1)) and VEGFR2 (VEGFR2/Flk1 (kinase insert domain-containing receptor/fetal liver kinase-1)) (2–4). Both receptors are involved in modulating developmental angiogenesis since knock-out mice for VEGFR1 and VEGFR2 are both embryonically lethal due to vascular defects (5, 6). However, in adult endothelial cells, VEGFR1 acts as a decoy receptor, and only VEGFR2 seems to be actively involved in regulating the angiogenic processes, notably endothelial cell proliferation and migration (7). VEGFR2 is composed of seven extracellular Ig-like domains containing the ligand-binding site, a single short intramembrane-spanning sequence, and an intracellular region containing a split tyrosine

kinase domain with an intervening non-catalytic insert kinase module (3). Upon binding to VEGF, VEGFR2 undergoes ligand-induced dimerization and oligomerization, which activate its intrinsic tyrosine kinase activity resulting in auto- and trans-phosphorylation on specific tyrosine residues in the cytoplasmic domain (3). These tyrosine residues, when phosphorylated, are involved as docking sites to recruit molecules containing Src homology 2 or phosphotyrosine-binding domains and to convey signals to downstream effectors. Tyr¹¹⁷⁵ and Tyr¹²¹⁴ are major autophosphorylation sites within VEGFR2, and their phosphorylation initiates signals to extracellular signal-regulated kinase and SAPK2/p38, respectively (8, 9). The productive signaling from VEGFR2 requires a synergistic interaction with integrin $\alpha v \beta 3$ (10–12). Integrins are heterodimeric cell surface adhesion receptors composed of α and β subunits. These receptors participate in adhesive interactions between cells and the extracellular matrix, and they provide a structural link allowing the anchorage of stress fibers to the membrane. They are also the sites of an intense inside-out and outside-in signaling between adjacent cells and between cells and the extracellular matrix. Together with growth factor receptors, integrins initiate signals implicated in the regulation of cell migration, differentiation, proliferation, and survival (13).

Focal adhesion kinase (FAK) is a non-receptor tyrosine kinase that is phosphorylated and activated in response to integrin engagement, oncogenic transformation, and growth factor stimulation (14). Six tyrosine sites have been identified as phosphoacceptors on FAK, namely tyrosines 397, 407, 576, 577, 861, and 925 (15, 16). Upon activation of integrins, FAK is recruited to focal contacts and is autophosphorylated at Tyr³⁹⁷ (15). This provides a recognition site for the Src homology 2 domain of Src proteins allowing their recruitment and activation and then the phosphorylation of FAK at additional sites follows the association with several other intracellular signaling molecules that include Grb2 and the p85 subunit of phosphoinositide 3-kinase (17, 18). The Src protein family contains several members (c-Src, Yes, Fyn, Lck, and Hck) that can phosphorylate FAK on tyrosine residues (16, 19). Despite the typical Src-dependent model of FAK activation, the exact nature of the FAK phosphoacceptor sites targeted by individual stimuli as well as the temporal sequence of activation events is still unclear. Interestingly, FAK is tyrosine phosphorylated

and activated in response to VEGF (20–23). The mechanism of activation does not require a direct interaction of FAK with VEGFR2 but involves the chaperone HSP90 (24). The mechanism by which HSP90 regulates the phosphorylation of FAK is unknown, but it is independent of its long term effect in maintaining the stability of FAK (12, 22, 25). The phosphorylation of FAK in response to VEGF is importantly involved in modulating the functions of endothelial cells. Notably, it regulates endothelial cell migration during angiogenesis and is also involved in regulating the permeability of the blood-brain barrier (26, 27).

In this study, we investigated the mechanisms of FAK phosphorylation and activation in response to VEGF. Our major finding was that exposure of endothelial cells to VEGF triggered the association of HSP90 with the carboxyl-terminal end of VEGFR2, and we provide evidence that the VEGF-induced association of HSP90 with VEGFR2 was required to drive the phosphorylation of FAK on Tyr⁴⁰⁷ in a RhoA-ROCK-dependent manner. In turn, phosphorylation of Tyr⁴⁰⁷ within FAK was required to recruit paxillin and vinculin to FAK and to ensure formation of focal adhesions and cell migration. We also showed that Src activities, independently of HSP90, contributed to phosphorylate FAK on Tyr⁸⁶¹ and that this pathway was required to recruit vinculin but not paxillin to FAK.

2.2.4. Experimental procedures

Chemical Reagents--VEGF165, bFGF, endothelial cell growth supplement, and geldanamycin were purchased from Sigma. PP2 and Y27632 were obtained from Calbiochem. Chemicals for electrophoresis were purchased from Bio-Rad and Fisher. [$\bullet\gamma^{32}\text{P}$]ATP (3000 Ci/mmol) was obtained from Amersham Biosciences.

Cells--HUVECs were isolated by collagenase digestion of umbilical veins from undamaged sections of fresh cords (28). The umbilical vein was cannulated, washed with Earle's basic salt solution, and perfused for 10 min with collagenase (1 mg/ml) in Earle's basic salt solution at 37 °C. After perfusion, the detached cells were collected, the vein was washed with 199 medium, and the wash-off was pooled with the perfusate. After washing, cells

were plated on gelatin-coated 75cm² culture dishes in MXV medium (199 medium containing 20% heat-inactivated fetal bovine serum, endothelial cell growth supplement (60 µg/ml), glutamine, heparin, and antibiotics). Subcultures were obtained by trypsinization and were used at passages <4. The identity of HUVECs as endothelial cells was confirmed by their polygonal shape or by detecting their immunoreactivity for factor VIII-related antigens. For all experiments, treatments were done on HUVECs that were cultivated on gelatin and that were made quiescent following incubation for 16–20h in endothelial cell growth supplement-free medium containing 5% fetal bovine serum, glutamine, and antibiotics. Porcine aortic endothelial (PAE) cells were grown on gelatin-coated culture dishes in F-12 medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (9). Cultures were maintained at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂.

Antibodies--The anti-FAK antibody used for immunoprecipitation is a rabbit polyclonal antibody obtained from BD Biosciences. The anti-FAK antibody used for Western blotting as well as the anti-paxillin (clone 349), anti-phosphotyrosine (PY20), and anti-HSP90 (clone 68) are mouse monoclonal antibodies purchased from BD Biosciences. The mouse monoclonal anti-VEGFR2 antibody (Kdr, clone 2), anti-talin (clone 8D4), and anti-vinculin (clone hVIN-1) antibodies were from Sigma. The antibody against integrin β•3 subunit was obtained from Chemicon (San Diego, CA). The rabbit polyclonal anti-c-Src antibody (SRC 2) and the mouse monoclonal antibody against RhoA (26C4) were obtained from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). The phosphospecific rabbit polyclonal antibodies against Src (Tyr(P)⁴¹⁸) and FAK (Tyr(P)⁴⁰⁷, Tyr(P)⁸⁶¹) were from BioSource (Camarillo, CA), whereas the anti-FAK antibody specific against Tyr(P)³⁹⁷ was from Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY). The HA antibody (clone HA-7) and its agarose conjugate were obtained from Sigma. The antimouse IgG-horseradish peroxidase and anti-rabbit IgG-horseradish peroxidase antibodies were from Jackson ImmunoResearch Laboratories (Bar Harbor, ME). The anti-phospho-p38 antibody used to measure the activity of SAPK2/p38 was purchased from Cell Signaling Technology (Beverly, MA).

Plasmids--Human VEGFR2 cDNA was obtained from Dr. Johannes Waltenberger (Maastricht, The Netherlands) and was subcloned in pI-RES-hrGFP-2a (Stratagene, La Jolla, CA) to produce a chimeric VEGFR2 that was HA-tagged in its carboxyl terminus. Human FAK cDNA constructs were provided by Dr. Jun-Lin Guan (Cornell University) and were amplified by PCR by adding SacII (5') and XhoI (3') restriction sites and subcloned in pIRES-hrGFP-2a to produce FAK with an HA tag in its carboxyl terminus. pCDNA3-RhoA-N19 was obtained from Dr. Sylvain Bourgoin (Université Laval, Quebec, Canada). The cDNA encoding a dominant negative, kinase-defective ROCK mutant (KDA4) has been obtained from Dr. Yazuyuki Itoh (Osaka, Japan) (29). VEGFR2 carboxyl-terminal deletion mutant (residues 1224–1354, Δ 130VEGFR2) was obtained by PCR using the following oligonucleotides: 5'-TGGGTACTCGAGCAGATACTGACTGATTCCT-3' (reverse) and 5'-GCTTCAACCGCGGATGGAGAATTCAAGCAAGGTG-3' (sense). The PCR product was subcloned by ligation into pIRES-hrGFP-2a. Single mutations were introduced by PCR-mediated mutagenesis in the FAK sequence. The oligonucleotides designed to replace tyrosine residues by phenylalanine residues were: 5'-GCATGGAGTAAGTATCTTCTTCAT-CTATAATC-3' (reverse) and 5'-ATGAAGAAGATACTTTCACCATGCC-CTCAA-3' (sense) for Y407F and 5'-CCACAGGCTGAAATATATGTTG-GTTTCCA-3' (reverse) and 5'-CATATATTTTCAGCCTGTGGGTAAACC-AGA-3' (sense) for Y861F. The methylated parental cDNA was digested using DpnI and was discarded by separation on an agarose gel.

Gene Transfer--Gene transfer in HUVECs was done by electroporation according to a technique that we have adapted from a procedure used for transfection of vascular smooth muscle cells.² Suspended cells (2×10^6) were mixed with DNA (60 μ g of DNA construct). Then, cells were left at room temperature for 3 min in electroporation buffer at 200 mosmol/kg (42% Hypoosmolar, 58% Isoosmolar Eppendorf Electroporation buffer,

Brinkman, Westbury, NY) and were electroporated at 670 V for 100 μ s using an Eppendorf MultiporatorTM. Cells were left at room temperature for an additional 10 min and were plated in complete media in 100-mm Petri dishes. Five hours later, media were changed for fresh media. After 24 h, the cells were made quiescent for 16 h and then were treated and processed as described below. Co-transfection of a green fluorescent protein (GFP) construct makes it possible to evaluate transfection efficiency as 30% following determination of the percentage of cells that express GFP under the fluorescence microscope. For transient transfection, PAE cells were lipofected with plasmid DNAs (1.78 mg/5 \times 10⁵ cells) using a 5:1 Tfx-50 (Promega)/DNA ratio for 90 min in the absence of serum. Cells were then overlaid with complete medium, and assays were done 48 h post-transfection. Sixteen hours before experiments, cells were incubated in serum-free F-12 medium.

Immunoprecipitation--After treatments, the cells were washed with phosphate-buffered saline and were extracted in B buffer containing 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1% Triton X-100, 0.1% sodium deoxycholate, 2 mM EDTA, 2 mM EGTA, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM benzamide, 1 μ M leupeptin, 50 mM NaF, and 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride. The remaining steps were done at 4 °C. Cells were centrifuged at 16,000 \times g for 10 min. Proteins were quantified by the Bradford assay, and then equal quantity of proteins was diluted in B buffer before being precleared for 60 min with Protein A-or Protein G-Sepharose. Supernatants were incubated on ice for 90 min with appropriate antibodies. Then, 10 μ l of 50% (v/v) Protein G-Sepharose (Amersham Biosciences) were added, and the incubation was extended for 30 min on ice with shaking. Antibody-antigen complexes were washed four times with B buffer and then SDS-PAGE loading buffer was added. Proteins were separated by SDS-PAGE, and the gels were transferred onto nitrocellulose for Western blotting. The immunoprecipitations with the HA-agarose conjugate were done similarly except that proteins were directly incubated overnight with the conjugated antibody. After incubating nitrocellulose membranes with the appropriate primary antibody, antigen-antibody complexes were detected with an anti-IgG antibody coupled to horseradish peroxidase and then were revealed using an enhanced

chemiluminescence kit. For stripping, nitrocellulose membranes were first washed in Tris-buffered saline 1x• (4x5 min) containing 0.1% Tween. Then, nitrocellulose membranes were incubated for 30 min at 68 °C in stripping buffer (62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, and 30 mM fresh •-mercaptoethanol) and were washed again in Tris-buffered saline containing 0.1% Tween. Quantification of the immunoreactive bands was done by densitometric scanning using NIH Image software.

Kinase Assays--The assay of FAK autokinase activity was adapted from Sieg *et al.* (30). Briefly cellular extracts were prepared in modified RIPA (1% Triton X-100, 1% sodium deoxycholate, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 5 μ•g/ml aprotinin, 0.1% SDS) followed by dilution with HNTG (50 mM HEPES, pH 7.4, 150 mM NaCl, 10% glycerol, 0.1% Triton X-100). Extracts were precleared for 60 min at 4 °C with 30 μ•l of Protein A-Sepharose 50% (v/v) before being centrifuged. Two microliters of anti-FAK rabbit antibody were added to the supernatant and incubated for 120 min at 4 °C. Thereafter, 20 •μl of Protein A-Sepharose 50% (v/v) were added for 60 min at 4 °C. Proteins were then washed once with 1 ml of RIPA without SDS, once with 1 ml of HNTG, and once with 500 •μl of kinase buffer 1x•. The kinase assay was done in 10 μ•l of kinase buffer containing 40 mM HEPES, pH 7.4, 20% glycerol, 20 mM MgCl₂, 20 mM MnCl₂, 150 mM NaCl, 20 μ•Ci [•γ³²P]ATP (3000 Ci/mmol). The kinase activity was assayed for 15 min at 30 °C and was stopped by adding 10 μ•l of Laemmli loading buffer. Proteins were then separated by 7.5% SDS-PAGE, and the autokinase activity of FAK was quantified by measuring the incorporation of radioactivity in the FAK band with a PhosphorImager (Amersham Biosciences). Supernatants from immunoprecipitation were separated by SDS-PAGE and were transferred to a nitrocellulose membrane. The membrane was processed to immunodetect FAK and monitor that a limiting amount of antibody was used.

RhoA Activation Assay--Rhotekin binding assays for RhoA were adapted from the technique that we used for evaluating the activity of Cdc42 (9). Briefly, after treatments, HUVEC lysates were cleared by centrifugation and incubated with recombinant GST-rhotekin (provided by Dr. Jean-Claude Lissitzky, Marseille, France) immobilized on glutathione-coupled Sepharose beads for 30 min at 4 °C. Beads were washed and eluted in Laemmli sample buffer. Activated RhoA, bound to the beads, was then resolved by 12% SDS-PAGE, transferred onto nitrocellulose, and blotted with RhoA antibody.

Cell Migration Assays--Cell migration was assayed using a modified Boyden chamber assay as described previously (12, 22). PAE cells were transfected with a vector expressing GFP together with an empty vector or vectors expressing wild type VEGFR2 or Δ I30VEGFR2. After 24 h the cells were made quiescent by serum starvation before being used the day after. Then, cells were harvested with trypsin, counted, centrifuged, and resuspended at 0.5×10^6 cells/ml in migration buffer (199 medium, 10 mM HEPES, pH 7.4, 1 mM MgCl₂, 0.5% bovine serum albumin). Cells were added on the upper part of an 8.0- μ m pore size polycarbonate membrane that was coated with gelatin on both sides and that separated the upper and lower chambers of a 6.5-mm Transwell apparatus. Cells were left to adhere for 1 h. Then, VEGF (5 ng/ml) was added to the lower chamber. Two hours later, cells on the upper face of the membrane were scraped using a cotton swab, and the number of fluorescent cells that had crossed the membranes was determined using an inverted fluorescence microscope. Assays were done in triplicates.

Immunofluorescence--HUVECs were plated on gelatin-coated Labtek chambers. After treatments, cells were fixed with 3.7% formaldehyde and permeabilized with 0.1% saponin in phosphate-buffered saline, pH 7.5. F-actin was detected using fluorescein isothiocyanate conjugated phalloidin (33.3 μ g/ml) diluted 1:50 in phosphate-buffered saline. Vinculin was detected using hVIN-1 monoclonal antibody. Vinculin antigen-antibody complexes were detected with biotin-labeled anti-mouse IgG and were revealed with Texas Red-conjugated streptavidin. The cells were examined by confocal microscopy (28).

2.2.5. Results

HSP90 Associates with the Carboxyl-terminal End of VEGFR2, Which Contributes to Tyrosine Phosphorylation of FAK in Response to VEGF—We reported previously that the phosphorylation of FAK in response to VEGF is HSP90-de-pendent and that it is required for endothelial cell migration (22).

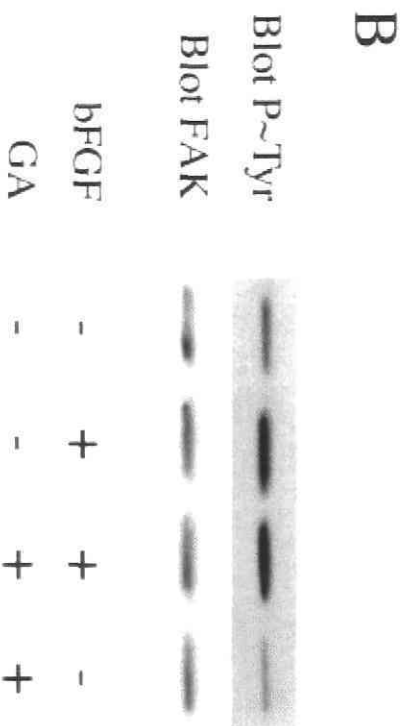
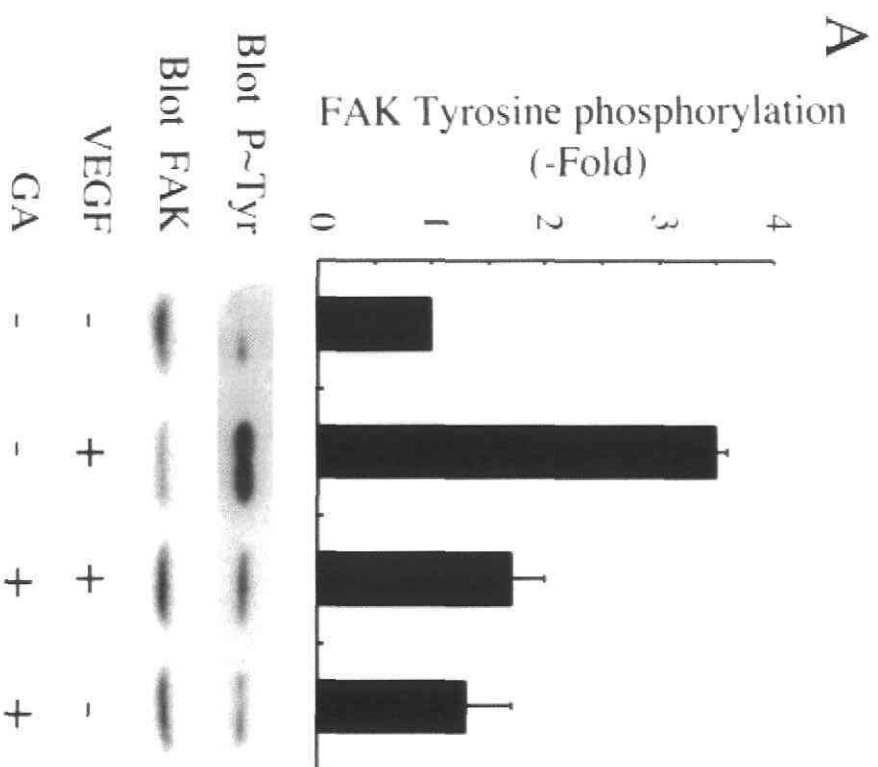


Figure 2-1 : VEGF-but not bFGF-induced tyrosine phosphorylation of FAK is inhibited by geldanamycin.

Quiescent HUVECs were pretreated for 60 min with geldanamycin (*GA*, 1 $\mu\text{g/ml}$) or vehicle (0.25% DMSO) and were treated or not with VEGF (5 ng/ml for 30 min) (*A*) or bFGF (20 ng/ml for 5 min) (*B*). Following treatments, cells were extracted, and FAK was immunoprecipitated using an anti-FAK rabbit polyclonal antibody. Proteins were then separated by SDS-PAGE and transferred to a nitrocellulose membrane. The membrane was processed for immunodetection of phosphotyrosine (*P-Tyr*) (*upper panels*) and total FAK (*lower panels*). Data points represent means S.D. of three samples from separate experiments. Representative blots are shown.

Here we investigated further the role of HSP90 in modulating tyrosine phosphorylation of FAK in response to VEGF. We first examined whether the role of HSP90 was unique for VEGF signaling to FAK or whether it was also involved in transducing signals from bFGF, another chemotactic growth factor. HUVECs were treated with VEGF or bFGF in the presence or absence of geldanamycin, an ansamycin derivative that specifically inhibits the HSP90-mediated event (31). After 30 min of exposure, extracts were prepared, and FAK phosphorylation was determined by Western blot using the anti-phospho-tyrosine antibody PY20. Results showed that geldanamycin inhibited the increased phosphorylation of FAK that was triggered by VEGF but not by bFGF (**Fig. 1, A and B**). This indicates that VEGF but not bFGF uses HSP90 in conveying signals to FAK. Interestingly, the inhibition by geldanamycin of the VEGF-induced phosphorylation of FAK was not followed by a later burst of activation (data not shown), which suggested that geldanamycin did not merely delay the phosphorylation of FAK. Moreover, results from **Fig. 1, A and B**, show that geldanamycin did not reduce the total amount of FAK. Hence, geldanamycin caused a real inhibition of the tyrosine phosphorylation of FAK.

As shown in **Fig. 2A**, we found that VEGF increased by 3.5-fold the amount of HSP90 that co-immunoprecipitated with VEGFR2, suggesting that HSP90 associates with VEGFR2. Geldanamycin inhibited this VEGF-induced association of HSP90 with VEGFR2. This finding, coupled with our observation that geldanamycin inhibited the tyrosine phosphorylation of FAK, strongly suggested that the association of HSP90 with VEGFR2 was involved in VEGF signaling.

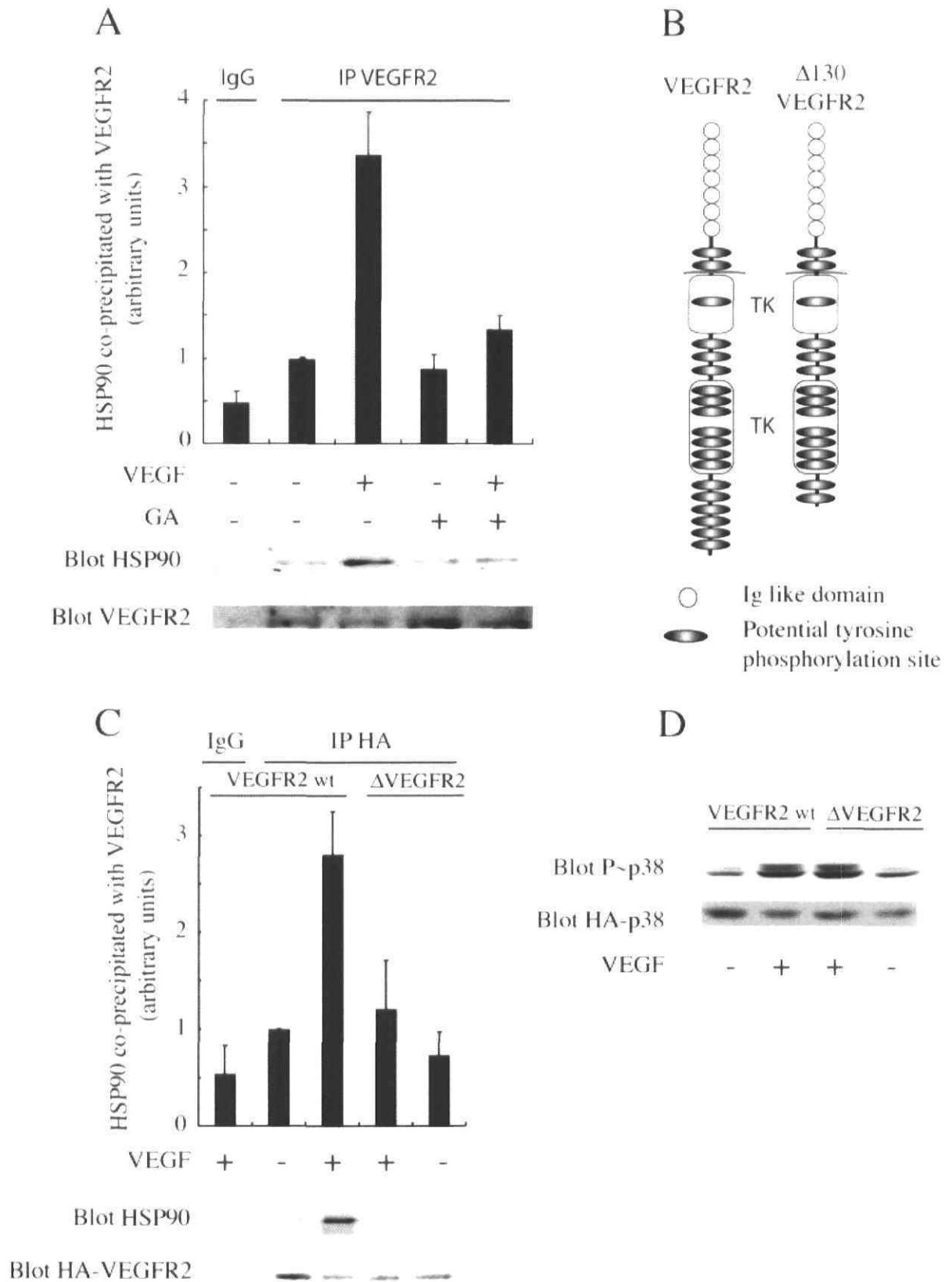


Figure 2-2 : HSP90 associates with the carboxyl-terminal tail of VEGFR2 in HUVECs exposed to VEGF.

A, quiescent HUVECs were pretreated for 60 min with geldanamycin (*GA*, 1 $\mu\text{g/ml}$) or with vehicle (0.25% DMSO) and were treated or not with VEGF (5 ng/ml) for 5 min. Cells were then extracted, and VEGFR2 was immunoprecipitated using anti-VEGFR2 rabbit polyclonal antibody. Control immunoprecipitation was done similarly using preimmune rabbit serum (IgG). Proteins were then separated by SDS-PAGE and transferred to a nitrocellulose membrane. The membrane was processed for immunodetection of HSP90 (*upper panel*) and total VEGFR2 (*lower panel*). Data points represent means \pm S.D. of three samples from separate experiments. Representative blots are shown. *B*, schematic representation of VEGFR2 and the VEGFR2 carboxyl-terminal deletion mutant (residues 1224–1354, Δ 130VEGFR2). *TK*, tyrosine kinase domain. *C*, quiescent HUVECs transiently expressing HA-tagged VEGFR2 or HA-tagged Δ 130VEGFR2 were treated or not with VEGF (5 ng/ml for 5 min). Then, the cells were extracted, and the constructs were immunoprecipitated using an anti-HA mouse antibody. Control immunoprecipitation was done similarly using preimmune mouse IgG. Proteins were separated by SDS-PAGE and transferred to a nitrocellulose membrane. The membrane was processed for immunodetection of HSP90 (*upper panel*) and of total HA-VEGFR2 (*lower panel*). Data points represent means \pm S.D. of three samples from separate experiments. Representative blots are shown. *D*, quiescent HUVECs transiently expressing HA-tagged VEGFR2 or HA-tagged Δ 130VEGFR2 and HA-tagged p38 were treated or not with VEGF (5 ng/ml for 5 min). The cells were extracted, and proteins were separated by SDS-PAGE and transferred to a nitrocellulose membrane. The membrane was processed for immunodetection of phospho-p38 (*P-p38*) (*upper panel*) and total HA-p38 (*lower panel*). *IP*, immunoprecipitation.

Recently, it has been reported that the phosphorylation of FAK is reduced in porcine endothelial cells that express a truncated form of VEGFR2 that is deleted in its carboxyl terminus (24). This suggested that HSP90 might be recruited to this region of VEGFR2 to drive the phosphorylation of FAK. To verify this possibility, we deleted the last 130 amino acids of the carboxyl terminal end of VEGFR2 (Fig. 2B), and by means of electroporation, we introduced the HA-tagged deletant (Δ •130VEGFR2-HA) or the HA-tagged wild type form of VEGFR2 (wt-VEGFR2-HA) in HUVECs. We found that HSP90 did associate with wt-VEGFR2-HA but did not associate with the deletant • Δ 130/ VEGFR2-HA following addition of VEGF (Fig. 2C). This indicated that the carboxyl-terminal end of VEGFR2 is required for the association of HSP90 with VEGFR2. Interestingly, the VEGF-induced activation of SAPK2/p38 was not hampered in cells that express Δ •130VEGFR2-HA, suggesting that the autokinase activity of the deletant was not affected since activation of SAPK2/p38 required autophosphorylation of Tyr¹²¹⁴ (Fig. 2D and Ref. 9).

Upon binding with VEGF, VEGFR2 interacts with integrin $\alpha_v\beta_3$ in endothelial cells adhering to matrices that bind to this integrin (10–12). This interaction is essential to trigger the phosphorylation of FAK (12). In accordance, we found that HSP90 also co-precipitated with integrin β_3 following cell exposure to VEGF. This association of HSP90 with β_3 was sensitive to geldanamycin (Fig. 3), indicating that HSP90 is an integral part of the VEGFR2 $\alpha_v\beta_3$ signaling complex and suggests that a single pool of HSP90 is associated with that complex. We examined the mechanisms by which HSP90 regulates the phosphorylation of FAK that is derived from the VEGFR2••– $\alpha_v\beta_3$ complex.

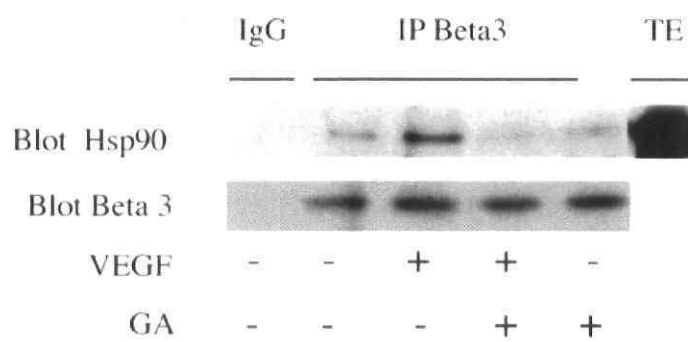


Figure 2.3 : HSP90 co-precipitates with integrin β 3 in response to VEGF.

Quiescent HUVECs were pretreated for 60 min with geldanamycin (GA, 1 μ g/ml) or vehicle (0.25% DMSO) and were then treated or not with VEGF (5 ng/ml) for 5 min. Cells were extracted, and integrin β 3 was immunoprecipitated using an anti- β 3 mouse antibody. Control immunoprecipitation was done similarly using preimmune mouse IgG. Proteins were then separated by SDS-PAGE and transferred to a nitrocellulose membrane. The membrane was processed for immunodetection of HSP90 (*upper panel*) and total integrin β 3 (*lower panel*). Total extract from untreated HUVECs and without immunoprecipitation was blotted as controls (*TE*). Representative blots from three separate experiments are shown. *IP*, immunoprecipitation.

Complementary Roles of HSP90 and Src Kinases in FAK Phosphorylation and Activation—The activation of FAK that follows the binding of integrins with the extracellular matrix is associated with autophosphorylation on tyrosine residue³⁹⁷. In turn, the phosphorylation of Tyr³⁹⁷ within FAK triggers its interaction with the Src homology 2 domain of Src proteins whose activity allows the phosphorylation of FAK on other tyrosine residues. As we found that Src, FAK, and HSP90 all became associated with integrin subunit $\alpha\beta3$ upon the addition of VEGF to HUVECs (data not shown), we investigated the relationship between HSP90 and Src kinases in regulating FAK activity and phosphorylation in response to VEGF. More specifically, we examined whether the activations of the two kinases were sensitive to geldanamycin or PP2, a known inhibitor of Src kinases. The results showed that geldanamycin had no effect on the VEGF-induced activation of Src activity assayed by determining the phosphorylation of its autophosphorylation site Tyr⁴¹⁸ (Fig. 4A). Moreover, geldanamycin did not affect the VEGF-induced kinase activity of FAK or autophosphorylation on site Tyr³⁹⁷ (Fig. 4, B and C). In contrast, PP2 reduced by 50% the VEGF-induced increase of the FAK kinase activity (Fig. 4B). This suggested that Src kinases, in contrast to HSP90, are regulators of FAK activity in response to VEGF. Accordingly, we conclude that phosphorylation and activation of FAK by VEGF/VEGFR2 results from at least two distinct but complementary pathways that involve HSP90 and Src activities.

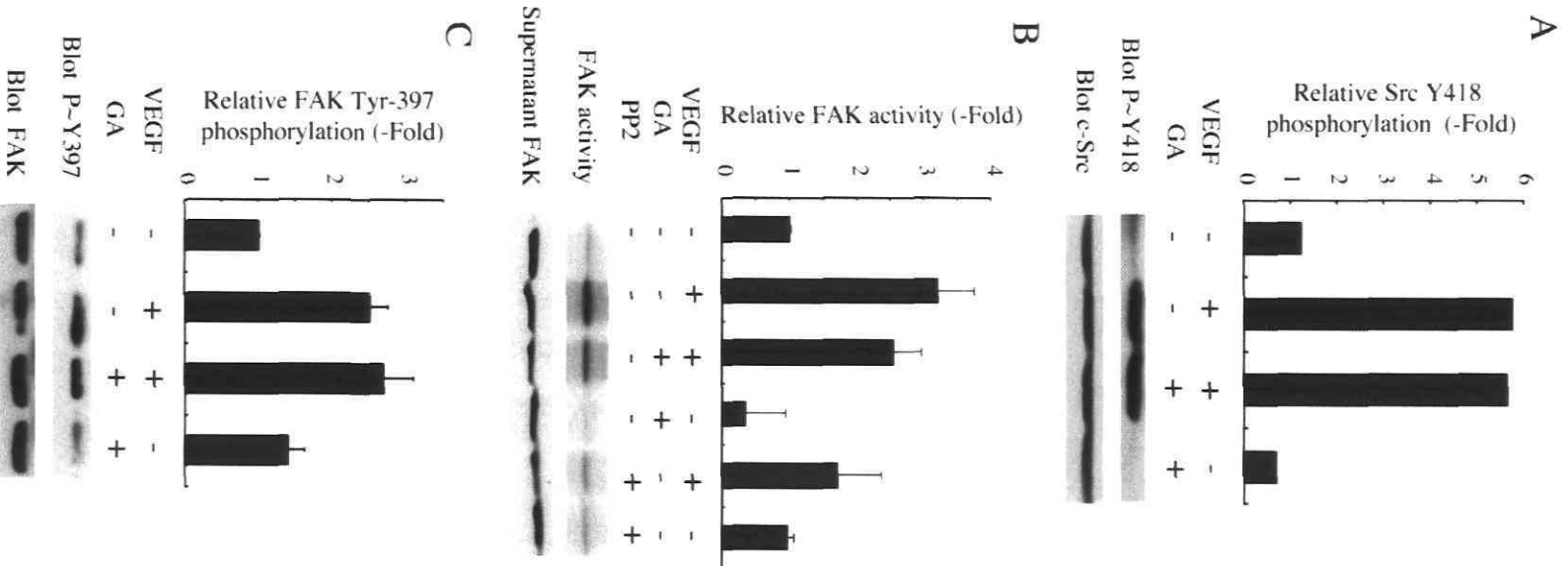


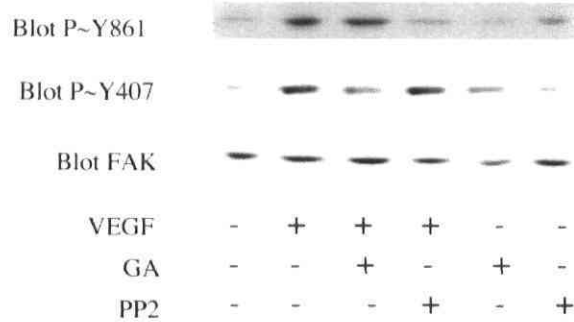
Figure 2-4 : The VEGF-induced activation of FAK is modulated by Src but is independent of HSP90.

A, quiescent HUVECs were pretreated for 60 min with geldanamycin (*GA*, 1 $\mu\text{g/ml}$) or vehicle (0.25% DMSO) and were treated or not with VEGF (5 ng/ml) for 5 min. Cells were then extracted, and proteins were separated by SDS-PAGE and transferred to a nitrocellulose membrane. The membrane was processed to immunodetect phospho-Src Tyr⁴¹⁸ (*upper panel*) and total c-Src (*lower panel*). *B*, quiescent HUVECs were pretreated for 60 min with geldanamycin (1 $\mu\text{g/ml}$), PP2 (10 μM), or vehicle (0.25% DMSO) and were treated or not with VEGF (5 ng/ml) for 30 min. Then, cells were extracted, and FAK was immunoprecipitated using an anti-FAK rabbit polyclonal antibody. Supernatants were separated by SDS-PAGE and were transferred to a nitrocellulose membrane. The membrane was processed to immunodetect FAK and monitor that a limiting amount of antibody was used (*lower panel*). FAK autokinase activity was evaluated as described under “Experimental Procedures.” Data points represent means \pm S.D. of duplicate samples from three separate experiments. Representative blots are shown. *C*, quiescent HUVECs were pretreated for 60 min with geldanamycin (1 $\mu\text{g/ml}$) or vehicle (0.25% DMSO) and were treated or not with VEGF (5 ng/ml) for 30 min. Cells were then extracted, and proteins were separated by SDS-PAGE and transferred to a nitrocellulose membrane. The membrane was processed for immunodetection of phospho-FAK Tyr³⁹⁷ (*upper panel*) and total FAK (*lower panel*). Data points represent means \pm S.D. of three samples from separate experiments. Representative blots are shown. *P-Y*, phosphotyrosine.

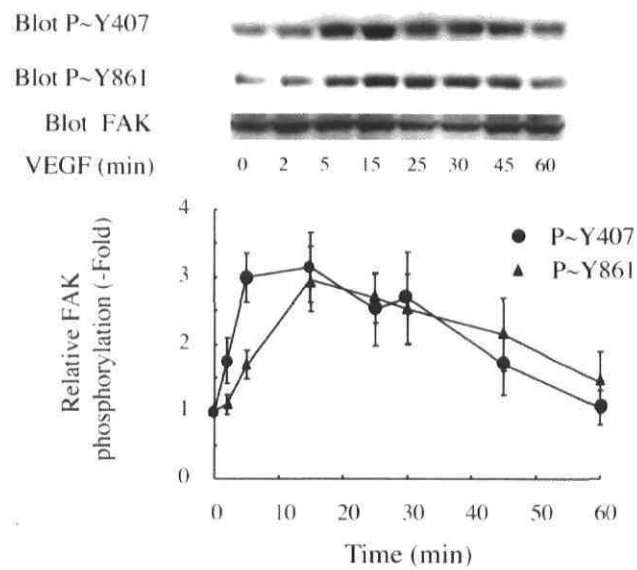
HSP90 and Src Kinases Modulate the Phosphorylation of Different Sites on FAK

following Activation by VEGF—FAK possesses several phosphoacceptor sites in addition to the autophosphorylation site Tyr³⁹⁷. The phosphorylation of these sites by VEGF depends upon the concentration of VEGF and upon the matrices on which endothelial cells are cultivated (32, 33). Here we found that VEGF induced the phosphorylation of FAK on sites Tyr⁴⁰⁷ and Tyr⁸⁶¹ in addition to Tyr³⁹⁷ in HUVECs adhering on gelatin, a matrix that binds to integrin $\alpha_v\beta_3$ (Figs. 4C and 5A and Ref. 34). More interestingly, the tyrosine phosphorylation of FAK on Tyr⁸⁶¹ and Tyr⁴⁰⁷ exhibits different kinetics and is differentially sensitive to the inhibition of the HSP90- and Src-dependent pathways, further supporting that the two pathways were not in the same linear cascade. The phosphorylation of Tyr⁸⁶¹ by 5 ng/ml VEGF reached its peak after 15 min and was inhibited by PP2 but not by geldanamycin (Fig. 5, A and B). In contrast, phosphorylation of Tyr⁴⁰⁷ reached a peak after 5 min and was sensitive to geldanamycin but not to PP2 (Fig. 5, A and B). As expected, the VEGF-induced phosphorylation of Tyr⁴⁰⁷ was also impaired in cells that express $\Delta 130$ VEGFR2, the VEGFR2 deletant that did not associate with HSP90 in response to VEGF (Fig. 5C). These results indicated that the pathways involving HSP90 and Src convey the VEGF signals that lead, respectively, to the phosphorylation of Tyr⁴⁰⁷ and Tyr⁸⁶¹ within FAK. The finding that phosphorylation of FAK on Tyr⁴⁰⁷ was insensitive to PP2 indicated that a kinase different from a member of the Src kinase family was upstream of Tyr⁴⁰⁷. To identify this kinase, we pretreated the cells with kinase inhibitors and found that phosphorylation of Tyr⁴⁰⁷ was impaired in cells treated with Y27632, an agent that specifically inhibits the activity of the Rho-associated protein serine/threonine kinase ROCK (Fig. 6A and data not shown). This suggested that a ROCK-dependent tyrosine kinase was involved in the phosphorylation of Tyr⁴⁰⁷ within FAK. To further confirm the role of the RhoA/ROCK axis, we used two genetic approaches. We

A



B



C

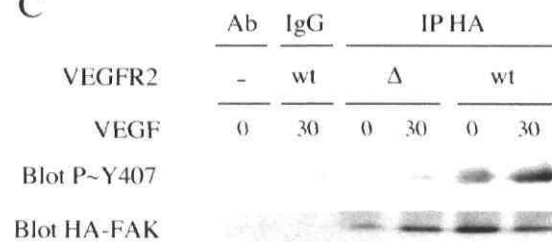


Figure 2-5 : HSP90 and Src regulate the phosphorylation of different tyrosine residues on FAK in response to VEGF.

A, quiescent HUVECs were pretreated for 60 min with geldanamycin (GA, 1 μ g/ml), PP2 (10 μ M), or vehicle (0.25% DMSO) and were treated or not with VEGF (5 ng/ml) for 30 min. Cells were then extracted, and proteins were separated by SDS-PAGE and transferred to a nitrocellulose membrane. The membrane was processed for immunodetection of phospho-FAK Tyr⁸⁶¹, Tyr⁴⁰⁷, and total FAK. *B*, quiescent HUVECs were treated or not with VEGF (5 ng/ml) for increasing periods of time. Cells were then extracted, and proteins were separated by SDS-PAGE and then transferred to a nitrocellulose membrane. The membrane was processed for immunodetection of phospho-FAK Tyr⁴⁰⁷ (*upper panel*), Tyr⁸⁶¹ (*middle panel*), and total FAK (*lower panel*). Data points represent means \pm S.D. of duplicate samples from two separate experiments. Representative blots are shown. *C*, quiescent HUVECs transiently expressing HA-FAK and HA-tagged VEGFR2 or HA-tagged Δ 130VEGFR2 were treated or not with VEGF (5 ng/ml for 30 min). Cell extracts were prepared, and transfected FAK was immunoprecipitated using an anti-HA mouse antibody. Control immunoprecipitation was done similarly using mouse IgG. Proteins were separated by SDS PAGE and transferred to a nitrocellulose membrane. The membrane was processed to immunodetect phospho-FAK Tyr⁴⁰⁷ (*upper panel*) and immunoprecipitated HA-FAK (*lower panel*). *P-Y*, phosphotyrosine; *IP*, immunoprecipitation; *Ab*, antibody.

co-transfected HUVECs with an empty vector or with vectors expressing HA-FAK along with vectors expressing a dominant negative form of ROCK (KD•4) or of RhoA (RhoA-N19). Then, we treated the cells with VEGF and determined the phosphorylation of Tyr⁴⁰⁷ in immunoprecipitated HA-FAK from transfected cells. Results indicated that the transfection of both ROCK-KD•4 and RhoAN19, as had treatment with Y27632, inhibited the phosphorylation of FAK on site Tyr⁴⁰⁷ (Fig. 6B). The findings are consistent with the determinant role of a ROCK-dependent kinase in phosphorylation of Tyr⁴⁰⁷ within FAK in response to VEGF. We next examined whether geldanamycin impaired the activation of ROCK by inhibiting the stimulation of RhoA by VEGF. HUVECs were pretreated or not with geldanamycin and were treated or not for 5 min with VEGF. Extracts were prepared, and the activation of RhoA was determined by measuring the amount of activated RhoA-GTP that bound to GST-rhotekin fusion protein in pull-down assays. The results show that geldanamycin did inhibit the VEGF-induced activation of RhoA suggesting a link between VEGFR2/HSP90-RhoA-ROCK and phosphorylation of Tyr⁴⁰⁷ within FAK (Fig. 6C). Interestingly, the inhibition of ROCK with Y27632 impaired the VEGF-induced formation of actin stress fibers and recruitment of vinculin to ventral focal contacts (Fig. 6, D–K), consistent with our findings that geldanamycin inhibits these processes in response to VEGF (22).

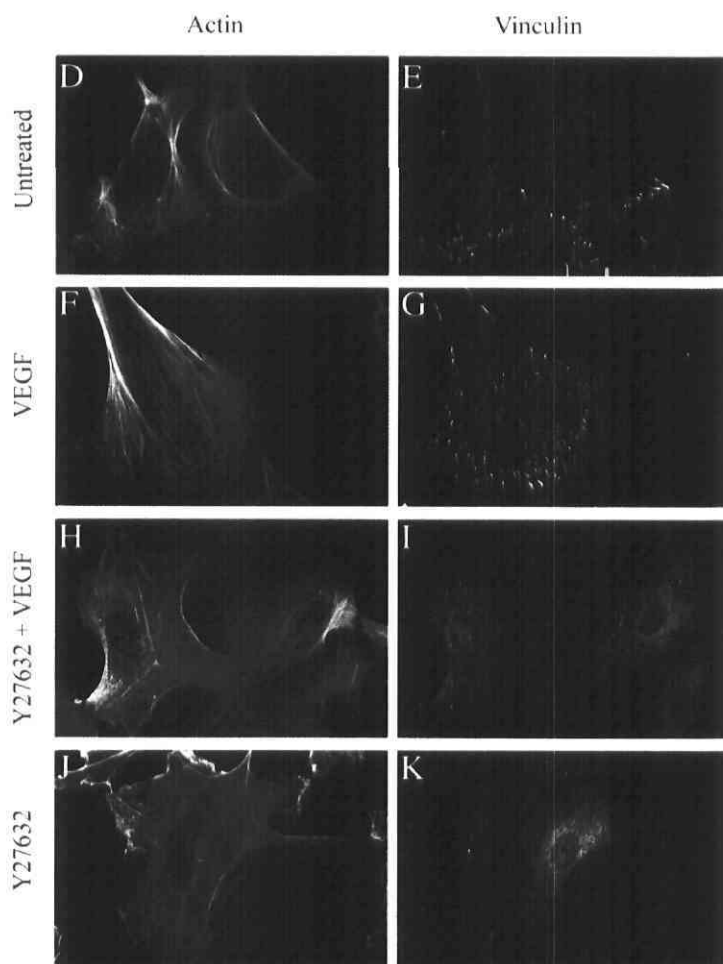
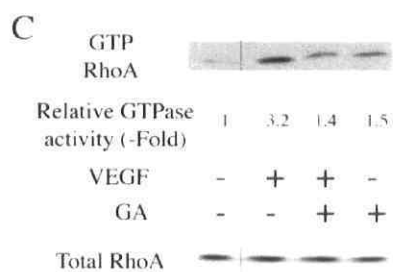
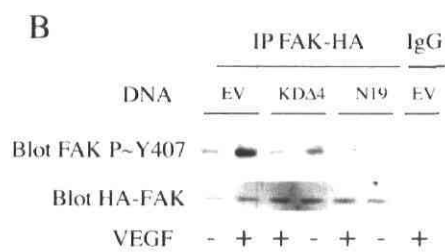
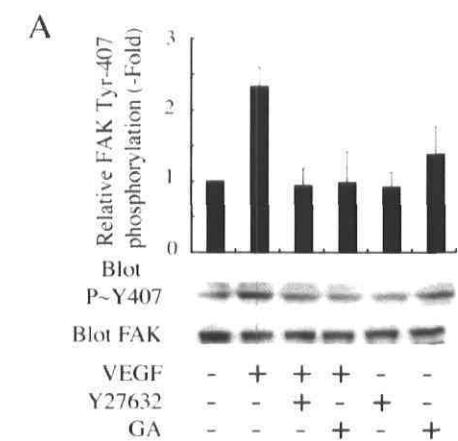


Figure 2-6 : HSP90 regulates the VEGF-induced activation of RhoA and ROCK downstream of VEGFR2.

A, quiescent HUVECs were pretreated for 60 min with geldanamycin (GA, 1 $\mu\text{g/ml}$) or vehicle (0.25% DMSO) or for 120 min with Y27632 (25 μM). Cells were treated or not with VEGF (5 ng/ml for 15 min). Cells were extracted, and proteins were separated by SDS-PAGE and transferred to a nitrocellulose membrane. The membrane was processed for immunodetection of phospho-FAK Tyr⁴⁰⁷ (upper panel) and total FAK (lower panel). Data points represent means \pm S.D. of two experiments. Representative blots are shown. B, quiescent HUVECs transiently transfected with an empty vector (EV) or with vectors expressing HA-FAK and dominant negative, kinase-defective mutant ROCK (KD Δ 4) or dominant negative mutant RhoA-N19 (N19) were treated or not with VEGF (5 ng/ml for 30 min). Cell extracts were prepared, and transfected HA-FAK was immunoprecipitated using an anti-HA mouse antibody. Control immunoprecipitation was done similarly using mouse IgG. Proteins were separated by SDS-PAGE and transferred to a nitrocellulose membrane. The membrane was processed to immunodetect phospho-FAK Tyr⁴⁰⁷ (upper panel) and immunoprecipitated HA-FAK to ensure equal loading and transfection efficacy (lower panel). C, quiescent HUVECs were pretreated for 60 min with geldanamycin (1 $\mu\text{g/ml}$) or vehicle (0.25% DMSO) and were treated or not with VEGF (5 ng/ml for 5 min). Proteins were extracted and incubated with GST-rhotekin to absorb activated RhoA. The samples were then separated by 12% SDS-PAGE, transferred onto a nitrocellulose membrane, and blotted for RhoA (upper panel). The amount of total RhoA was monitored on the total extract (lower panel). Representative blots are shown. D–K, HUVECs plated on gelatin-coated chambers were left untreated (D and E) or were exposed to 5 ng/ml VEGF for 15 min (F and G) or were pretreated with Y27632 (25 μM) for 2 h and then treated (H and I) or not (J and K) with 5 ng/ml VEGF for 15 min. F-actin (D, F, H, and J) was detected using fluorescein isothiocyanate-conjugated phalloidin. Vinculin (E, G, I, and K) was detected with specific antibody coupled with a biotin-labeled anti-mouse IgG and revealed with Texas Red-conjugated streptavidin. Cells were examined by confocal microscopy. Representative fields are shown. Similar results were obtained in three separate experiments. P-Y, phosphotyrosine; IP, immunoprecipitation.

HSP90-and Src Kinase-dependent Activation of FAK Are Associated with a Differential Recruitment of Focal Adhesion Proteins to FAK and Focal Contacts—A major role of FAK is to regulate the turnover of focal adhesions (35). In particular, FAK is implicated in the recruitment of focal adhesion-associated proteins such as paxillin and vinculin. In accordance, we found that VEGF induced a quick and marked increase in the recruitment of both vinculin and paxillin to FAK. Interestingly, geldanamycin and PP2 both inhibited the recruitment of vinculin, whereas recruitment of paxillin was inhibited only by geldanamycin (Fig. 7A). In contrast, the association of talin with FAK was not impaired by the inhibitors (data not shown). These findings raised the possibility that the HSP90-and Src-associated pathways that converge on FAK phosphorylation ultimately contribute to the association of different focal adhesion proteins on FAK. To verify this point, we transfected cells with the FAK mutants Y407F or Y861F and looked at the recruitment of paxillin or vinculin to these mutants in comparison with the wild type form of FAK. We found that transfection of the Y407F mutant mimicked the effect of geldanamycin and inhibited the recruitment of both paxillin and vinculin to FAK (Fig. 7B, lanes 1, 2, and 4). This strongly suggested that HSP90 dependent phosphorylation of FAK on Tyr⁴⁰⁷ was responsible for the recruitment of paxillin and vinculin to FAK.

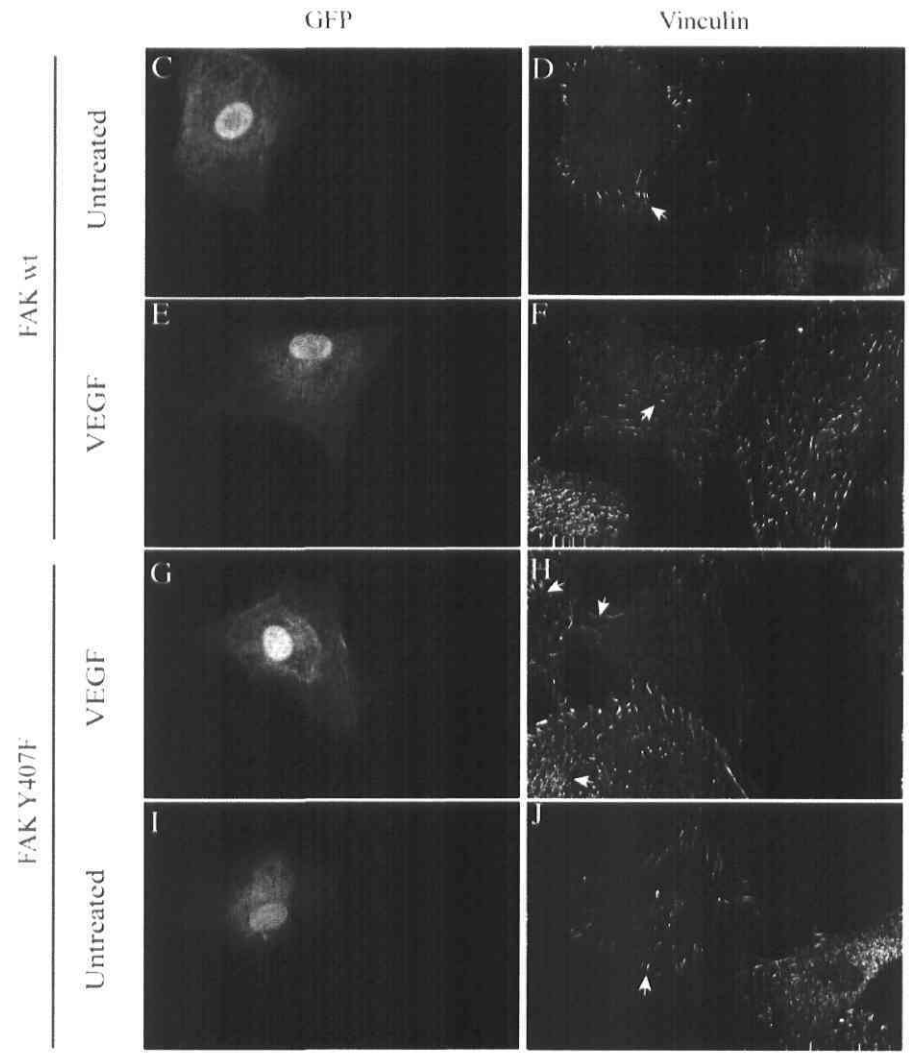
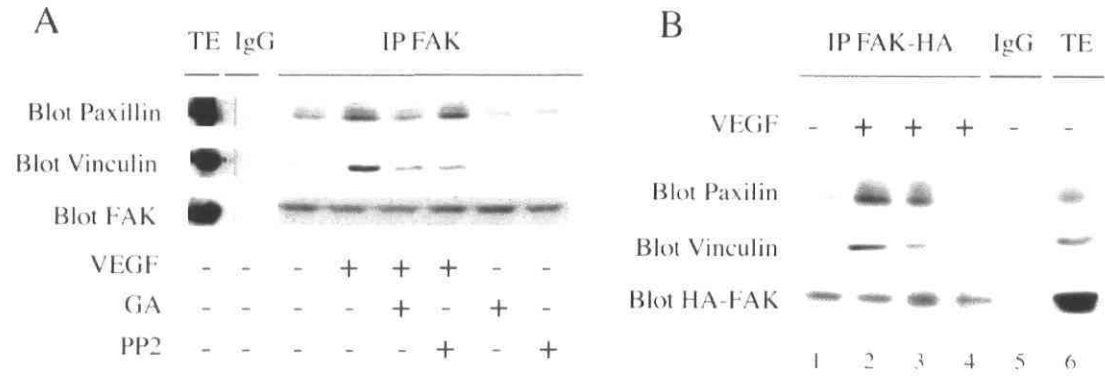


Figure 2-7 : The HSP90-and Src-dependent pathways trigger a differential recruitment of focal adhesion proteins to FAK and focal adhesions.

A, quiescent HUVECs were pretreated for 60 min with geldanamycin ($GA, 1 \mu\text{g/ml}$), PP2 ($10 \mu\text{M}$), or vehicle (0.25% DMSO) and were treated or not with VEGF (5 ng/ml) for 30 min. Cells were extracted, and FAK was immunoprecipitated using an anti-FAK rabbit polyclonal antibody. Control immunoprecipitation was done similarly using preimmune rabbit serum (IgG). Proteins were separated by SDS-PAGE and transferred to a nitrocellulose membrane. The membrane was successively processed for immunodetection of paxillin, vinculin, and total FAK. Total extract from untreated HUVECs was blotted as controls (*TE*). *B*, quiescent HUVECs transiently expressing HA-tagged FAK (*lanes 1, 2, and 5*), HA-tagged FAK-Y861F (*lane 3*), or HA-tagged FAK-Y407F (*lane 4*) were treated or not with VEGF (5 ng/ml for 30 min) and extracted, and the HA-tagged proteins were immunoprecipitated using anti-HA mouse antibody conjugated to agarose. Control immunoprecipitation was done similarly using purified mouse IgG. Proteins were separated by SDS-PAGE and transferred to a nitrocellulose membrane. The membrane was processed to immunodetect paxillin, vinculin, and total FAK-HA. Total extract from untreated HUVECs was also blotted as control (total extract (*TE*), *lane 6*). *C–J*, quiescent HUVECs transiently expressing GFP and FAK wild type (*C–F*) or FAK-Y407F (*G–J*) plated on gelatin-coated Labtek chambers were left untreated (*C, D, I, and J*) or were exposed to 5 ng/ml VEGF for 15 min (*E, F, G, and H*). Vinculin (*D, F, H, and J*) was detected with specific antibody coupled with a biotin-labeled anti-mouse IgG and revealed with Texas Red-conjugated streptavidin. Cells expressing GFP (*C, E, G, and I*) were processed as for vinculin except that an anti-rabbit IgG-fluorescein isothiocyanate antibody was used. Cells were examined by confocal microscopy. *Arrows* indicate the localization of vinculin. Representative fields are shown. Similar results were obtained in two different experiments. *IP*, immunoprecipitation.

Cell migration is one of the major physiological endpoints that requires the phosphorylation of FAK and proper turnover of focal adhesion assembly. Since the activation of the VEGFR2-HSP90-ROCK-FAK/Tyr⁴⁰⁷ pathway is needed for the VEGF-induced assembly of focal contacts, we decided to ascertain its requirement for cell migration. Porcine

endothelial cells, null for VEGFR2, were transfected with GFP together with wild type VEGFR2 or with the deletant version ($\bullet\Delta 130$ VEGFR2) that does not associate with HSP90. Then, cell migration in response to VEGF was evaluated in Boyden chambers. Results presented in Fig. 8 show that VEGF increased by 3-fold the migration of PAE cells expressing VEGFR2. In contrast, cell migration remained close to basal level in cells that express the $\bullet\Delta 130$ VEGFR2 even in the presence of VEGF. These results indicate that the VEGFR2-HSP90-ROCK-FAK/Tyr⁴⁰⁷ pathway is required to drive endothelial cell migration in response to VEGF.

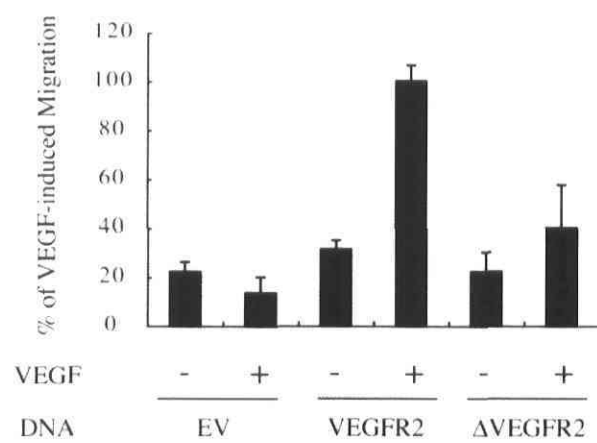


Figure 2-8 : The association of VEGFR2 with HSP90 is required for endothelial cell migration.

PAE cells, null for VEGFR2, were transiently transfected with a vector expressing GFP together with an empty vector (pIRES, *EV*) or with vectors expressing VEGFR2 or $\Delta 130$ VEGFR2. Forty-eight hours after transfection, cells were plated on the upper part of polycarbonate membrane in a modified Boyden chamber and left to adhere for 1 h. Then, VEGF (5 ng/ml) was added in the lower chamber. Subsequently, the cells were allowed to migrate for 2 h. After treatments, the cells on the upper part of the membrane were scraped, and the green fluorescent cells on the lower part were counted using a fluorescence microscope. Data points represent the mean \pm S.D. of triplicate samples for each condition. In the *lower panel*, the expression of VEGFR2 in the transfected cells was evaluated by Western blot using an anti HA-antibody.

2.2.6. Discussion

VEGF is a vascular permeability factor as well as a proangiogenic agent that triggers major steps of the angiogenic process. In particular, VEGF increases both the proliferation and migration of endothelial cells. In each case, this requires the binding of VEGF to the tyrosine kinase receptor VEGFR2 and the association of ligand-bound VEGFR2 with integrin $\alpha_v\beta_3$ (10, 22, 36, 37). The VEGF-VEGFR2- $\alpha_v\beta_3$ complex is then involved in initiating signals that trigger the activation of various pathways that converge on cell migration (11, 12). FAK is a typical non-receptor kinase whose activation, by regulating the turnover of focal adhesions, is required to drive the cytoskeleton reorganization that is essential for cell migration (15, 22, 35). However, the mechanisms by which FAK is activated by VEGF are still poorly understood. In the present study, we found that the phosphorylation of FAK by VEGF requires signals that transit through two complementary pathways downstream from the VEGFR2-integrin $\alpha_v\beta_3$ complex. The first pathway requires the activation of Src kinase activities and is responsible for the phosphorylation of site Tyr⁸⁶¹ and the recruitment of vinculin to FAK. The other pathway requires the association of HSP90 with the carboxyl terminal end of VEGFR2 and the activation of RhoA and ROCK. The activation of this pathway culminates in the phosphorylation of Tyr⁴⁰⁷ within FAK, an event that triggers the recruitment of paxillin and vinculin to FAK and is required for cell migration. HSP90 is a molecular chaperone that forms heterocomplexes with different signaling molecules such as Raf, Src, Shc, and Akt (38–42). The principal role of this chaperone is to maintain the client protein in an activated form. Accordingly, several reports showed that the inhibition of the chaperoning activity of HSP90 with geldanamycin, an agent that specifically occupies the ATP-binding sites of HSP90, disrupts the HSP90-client protein heterocomplexes and inhibits the HSP90-mediated signaling events (31). In the present study, we obtained several pieces of evidence that HSP90 is required for VEGFR2 signaling to FAK. First, VEGFR2 associated with HSP90 in response to VEGF. Second, the inhibition of HSP90-mediated events with geldanamycin impaired both the association of HSP90 with VEGFR2 and the

phosphorylation of FAK. Third, a mutated form of VEGFR2 that is deleted of its last 130 carboxylterminal amino acids did not associate with HSP90, and it failed to elicit phosphorylation of FAK on Tyr⁴⁰⁷. The precise mechanisms and sequence that characterize the HSP90/ VEGFR2 association is still unclear, and it remains to be determined whether it is direct or not. HSP90 is known to associate with the Erb2 tyrosine kinase domain modulating its activity. In that case, geldanamycin disrupts the HSP90/Erb2 association, and Erb2 is directed to rapid degradation by the proteasome (42–45). In insulin signaling, both protein kinase B and its activating kinase 3-phosphoinositide dependent kinase-1 (PDK-1) are HSP90-dependent (46). Similarly Raf must be associated with HSP90 to convey mitogenic signals to mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase kinase (47). The association requires the formation of a complex that contains Raf-HSP90•p50^{cdc37} (48). A general model has been proposed in which the complex HSP90•cdc37p•^{cdc37} acts as a scaffolding protein complex that co-localizes sequential kinases and thereby improves the efficiency of the phosphorylation reaction between an upstream kinase and its downstream substrate kinase (48). Whether this model fits with our results is still hypothetical at the present time. One possibility is that the structural changes and oligomerization of VEGFR2 that follow its binding with VEGF favor its interaction with HSP90 allowing recruitment and activation of downstream signaling molecules. Interestingly, we found that the activation of SAPK2/p38 by VEGF, an event that requires phosphorylation of the autophosphorylation site Tyr¹²¹⁴ (9), was not impaired in the VEGFR2 deletant that does not associate with HSP90. This finding indicates that HSP90 is not involved in modulating the kinase activity of VEGFR2, consistent with our previous observation that geldanamycin does not affect the phosphorylation of VEGFR2 following its binding with VEGF (12). Intriguingly, geldanamycin did not affect the tyrosine phosphorylation of FAK in response to bFGF, suggesting that the role of HSP90 in modulating angiogenic signals might be specific to VEGFR2.

A major contribution of our study is to have shown that the association of HSP90 with VEGFR2 is required to trigger the tyrosine phosphorylation of FAK on site Tyr⁴⁰⁷ in HUVECs cultivated on gelatin, a matrix that binds to integrin $\alpha_v\beta_3$ (34). This is supported by the findings that phosphorylation of this site is impaired by geldanamycin as

well as in cells that express the $\bullet\Delta 130$ VEGFR2 deletant that does not associate with HSP90. Yet geldanamycin did not affect the kinase activity of FAK or its autophosphorylation on site Tyr³⁹⁷. This suggests that HSP90 associated with VEGFR2 is involved in regulating the activity of a kinase that is required to phosphorylate FAK on site Tyr⁴⁰⁷. It has been proposed that members of the Src kinase family may contribute to phosphorylate Tyr⁴⁰⁷ within FAK *in vitro* (16). However, PP2, a potent inhibitor of Src activities, did not impair the phosphorylation of Tyr⁴⁰⁷ in response to VEGF. This indicates that a kinase different from members of the Src family is involved in phosphorylating Tyr⁴⁰⁷ in cells exposed to VEGF. In this context, we found that the inhibition of RhoA-associated serine/threonine kinase ROCK with Y27632 or by expression of a dominant negative form of RhoA or ROCK impairs the phosphorylation of Tyr⁴⁰⁷ in response to VEGF. This strongly suggests that ROCK activation relies on HSP90 and is involved in the activation of a tyrosine kinase that is responsible for phosphorylating Tyr⁴⁰⁷ within FAK. This is consistent 1) with our finding that geldanamycin inhibited the activation of RhoA by VEGF, 2) with previous studies that have shown that HSP90 is also required for the activation of RhoA in response to thrombin (49, 50), and 3) with the finding that inhibition of ROCK activity with Y27632 impairs the tyrosine phosphorylation of FAK in response to bombesin as well as FAK-mediated tumor invasiveness (51, 52). The mechanisms by which ROCK regulates the phosphorylation of FAK on Tyr⁴⁰⁷ as well as how HSP90 regulates the activity of RhoA remain to be clarified. Since geldanamycin inhibited the activation of RhoA by VEGF, it is possible that a critical role of HSP90 in VEGFR2 signaling is to maintain the receptor in a structural configuration that allows its signaling to RhoA and then to ROCK-dependent phosphorylation of Tyr⁴⁰⁷ on FAK. In this context, the last 130 amino acids that are required for binding of HSP90 contains three tyrosine residues whose accessibility may depend on HSP90 to initiate signaling to Tyr⁴⁰⁷. Most interestingly, this domain of VEGFR2 has been shown previously to be required for the activation of phosphoinositide 3-kinase downstream of FAK (24). It is also possible that HSP90 associated with VEGFR2 is involved in chaperoning the activity of the exchange factor required for the exchange of GDP to GTP on RhoA.

We previously reported that VEGFR2 must interact with integrin $\alpha_v\beta_3$ to promote phosphorylation of FAK (12). In this context, we found that HSP90 is also found in a complex that contains integrin β_3 following activation with VEGF. The association is lost in the presence of geldanamycin, suggesting that a single pool of HSP90 is associated with the VEGFR2 $\alpha_v\beta_3$ integrin signaling complex. These observations raised the question of whether the HSP90-mediated ROCK-dependent phosphorylation of Tyr⁴⁰⁷ is derived directly from VEGFR2 or from integrin $\alpha_v\beta_3$. The finding that phosphorylation of Tyr⁴⁰⁷ is abolished in cells expressing the deletant that does not associate with HSP90 is consistent with the possibility that HSP90-dependent phosphorylation of Tyr⁴⁰⁷ does not originate from the integrin-Src pathway but rather directly from VEGFR2. Incidentally, this is in accordance with recent findings showing that clustering of integrins $\alpha_5\beta_1$ or $\alpha_v\beta_3$ with specific antibodies is not sufficient to induce the phosphorylation of Tyr⁴⁰⁷ (53). In contrast, the clustering of integrin $\alpha_v\beta_3$ is sufficient to drive the phosphorylation of Tyr⁸⁶¹ within FAK. Moreover, Src kinases are activated by direct interaction with the cytoplasmic tail of integrin β_3 in osteoclasts (54). In both cases, these findings are in line with the possibility that the Src-mediated phosphorylation of Tyr⁸⁶¹ that follows exposure to VEGF is derived from integrin β_3 rather than from VEGFR2 itself.

Another important novelty of our study is that we found the first direct evidence that the VEGF-induced recruitment of focal adhesion proteins to FAK implicates differential phosphorylation of tyrosine residues downstream from the HSP90 ROCK and Src pathways. This is supported by the observation that the two pathways contribute to phosphorylation of FAK on different sites and by the reciprocal observation that the phosphorylation of these sites is differentially involved in recruiting paxillin to FAK. In particular, we found that paxillin is not recruited to FAK in cells that express the phosphorylation mutant Y407F, whereas it is still recruited to FAK in cells expressing Y861F. Intriguingly, phosphorylation of both sites is involved in recruiting vinculin since this protein is not recruited to FAK mutated on Tyr⁴⁰⁷ or Tyr⁸⁶¹. This supports the notion that HSP90-mediated phosphorylation Tyr⁴⁰⁷ is required to recruit paxillin and vinculin to FAK, whereas Src-mediated phosphorylation of Tyr⁸⁶¹ is required to recruit vinculin but not

paxillin. Paxillin is known to be recruited to the focal adhesion targeting domain that is located in the carboxyl terminal end of FAK (15, 16). In this context, our results may suggest that phosphorylation of site Tyr⁴⁰⁷ is critically involved in modulating the structural configuration of the focal adhesion targeting domain that is required for the binding of paxillin. The mechanisms by which phosphorylation of sites Tyr⁴⁰⁷ and Tyr⁸⁶¹ both contribute to the recruitment of vinculin to FAK remain to be ascertained. In the case of site Tyr⁴⁰⁷, it is plausible that the recruitment of vinculin results from its binding to paxillin as previously reported (55).

The recruitment of focal adhesion proteins to phosphorylated FAK is importantly involved in regulating the assembly of focal adhesions (15). Accordingly, we found that the inhibition of the phosphorylation of Tyr⁴⁰⁷ by Y27632 or expression of a Y407F mutant were all associated with an inhibition of the formation of ventral focal adhesions. Several studies have indicated that one of the ultimate functions of FAK phosphorylation-dependent turnover of the focal adhesion assembly was to regulate cell migration (15). Our finding that the expression of the Δ 130VEGFR2 mutant was associated with impaired cell migration brings further support to this concept. In corollary, this finding indicates that the VEGFR2-HSP90-ROCK-mediated phosphorylation of Tyr⁴⁰⁷ within FAK is a key pathway that underlies regulation of endothelial cell migration.

Overall, our results indicate that exposure of endothelial cells to VEGF triggers the formation of a signaling complex that contains VEGFR2 • HSP90 • integrin β •3 • Src. This event results in the tyrosine phosphorylation of FAK in a process that implies two distinct pathways. The first pathway requires the association of HSP90 with VEGFR2, leads to the activation RhoA-ROCK, and is responsible for phosphorylation of Tyr⁴⁰⁷ on FAK. The second pathway involves the activation of Src activities, presumably downstream from integrin β •3. This pathway is required for full activation of FAK kinase activity and for its phosphorylation on Tyr⁸⁶¹. Together, the HSP90-and Src-mediated respective phosphorylation of Tyr⁴⁰⁷ and Tyr⁸⁶¹ are involved in the recruitment of both paxillin (Tyr⁴⁰⁷) and vinculin (Tyr⁴⁰⁷ and Tyr⁸⁶¹), which contributes to the formation of the nascent focal contacts and then to the actin remodeling that underlies cell migration.

2.2.7. Acknowledgments

We thank Drs. Josée Lavoie and François Marceau for critically reading the manuscript. We also thank Dr. Julie Laferrière (Nice, France) for help in setting up the FAK autokinase activity assay, Dr Jun-Lin Guan (Cornell University, Ithaca, NY) for providing the human FAK cDNA, and Drs. Johannes Waltenberger (Maastricht, The Netherlands) and Bruce Terman (Albert Einstein College, Bronx, NY) for the PAE cells and human VEGFR2 cDNAs. We are grateful to Drs. Sylvain Bourgoin (Québec, Canada), Stephan Reshkin (Bari, Italy), and Kazuyuki Itoh (Osaka, Japan) for giving the RhoA and ROCK constructs. We are also indebted to André Lévesques for help in microscopic analysis and to the staff of the Department of Pathology of l'Hôpital St-François d'Assise for providing umbilical cords.

2.2.8. References

1. LeCouter, J., Lin, R., and Ferrara, N. (2002) *Nat. Med.* **8**, 913–917
2. Zachary, I., and Glikli, G. (2001) *Cardiovasc. Res.* **49**, 568–581
3. Matsumoto, T., and Claesson-Welsh, L. (2001) *Science's STKE* http://stke.sciencemag.org/cgi/content/full/OC_sigtrans;2001/112/re21
4. Kliche, S., and Waltenberger, J. (2001) *IUBMB Life* **52**, 61–66
5. Shalaby, F., Rossant, J., Yamaguchi, T. P., Gertsenstein, M., Wu, X. F., Breitman, M. L., and Schuh, A. C. (1995) *Nature* **376**, 62–66
6. Fong, G. H., Rossant, J., Gertsenstein, M., and Breitman, M. L. (1995) *Nature* **376**, 66–70
7. Petrova, T. V., Makinen, T., and Alitalo, K. (1999) *Exp. Cell Res.* **253**, 117–130
8. Takahashi, T., Yamaguchi, S., Chida, K., and Shibuya, M. (2001) *EMBO J.* **20**, 2768–2778
9. Lamalice, L., Houle, F., Jourdan, G., and Huot, J. (2004) *Oncogene* **23**, 434–445
10. Soldi, R., Mitola, S., Strasly, M., Defilippi, P., Tarone, G., and Bussolino, F. (1999) *EMBO J.* **18**, 882–892
11. Byzova, T. V., Goldman, C. K., Pampori, N., Thomas, K. A., Bett, A., Shattil, S. J., and Plow, E. F. (2000) *Mol. Cell* **6**, 851–860
12. Masson-Gadais, B., Houle, F., Laferriere, J., and Huot, J. (2003) *Cell Stress Chaperones* **8**, 37–52
13. Geiger, B., Bershadsky, A., Pankov, R., and Yamada, K. M. (2001) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 793–805
14. McLean, G. W., Fincham, V. J., and Frame, M. C. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 23333–

23339

15. Parsons, J. T. (2003) *J. Cell Sci.* **116**, 1409–1416
16. Cornillon, J., Campos, L., and Guyotat, D. (2003) *Med. Sci. (Paris)* **19**, 743–752
17. Chaudhary, A., Brugge, J. S., and Cooper, J. A. (2002) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **294**, 293–300
18. Juliano, R. L. (2002) *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **42**, 283–323
19. Calalb, M. B., Polte, T. R., and Hanks, S. K. (1995) *Mol. Cell. Biol.* **15**, 954–963
20. Abedi, H., and Zachary, I. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 15442–15451
21. Takahashi, N., Seko, Y., Noiri, E., Tobe, K., Kadowaki, T., Sabe, H., and Yazaki, Y. (1999) *Circ. Res.* **84**, 1194–1202
22. Rousseau, S., Houle, F., Kotanides, H., Witte, L., Waltenberger, J., Landry, J., and Huot, J. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 10661–10672
23. Abu-Ghazaleh, R., Kabir, J., Jia, H., Lobo, M., and Zachary, I. (2001) *Biochem. J.* **360**, 255–264
24. Qi, J. H., and Claesson-Welsh, L. (2001) *Exp. Cell Res.* **263**, 173–182
25. Ochel, H. J., Schulte, T. W., Nguyen, P., Trepel, J., and Neckers, L. (1999) *Mol. Genet. Metab.* **66**, 24–30
26. Avraham, H. K., Lee, T. H., Koh, Y., Kim, T. A., Jiang, S., Sussman, M., Samarel, A. M., and Avraham, S. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 36661–36668
27. Haskell, H., Natarajan, M., Hecker, T. P., Ding, Q., Stewart, J., Jr., Grammer, J. R., and Gladson, C. L. (2003) *Clin. Cancer Res.* **9**, 2157–2165
28. Huot, J., Houle, F., Marceau, F., and Landry, J. (1997) *Circ. Res.* **80**, 383–392
29. Itoh, K., Yoshioka, K., Akedo, H., Uehata, M., Ishizaki, T., and Narumiya, S. (1999)

Nat. Med. **5**, 221–225

30. Sieg, D. J., Ilic, D., Jones, K. C., Damsky, C. H., Hunter, T., and Schlaepfer,

D. D. (1998) *EMBO J.* **17**, 5933–5947

31. Picard, D. (2002) *Cell. Mol. Life Sci.* **59**, 1640–1648

32. Eliceiri, B. P., Puente, X. S., Hood, J. D., Stupack, D. G., Schlaepfer, D. D., Huang, X. Z., Sheppard, D., and Cheresch, D. A. (2002) *J. Cell Biol.* **157**, 149–160

33. Holmqvist, K., Cross, M. J., Rolny, C., Hagerkvist, R., Rahimi, N., Matsumoto, T., Claesson-Welsh, L., and Welsh, M. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 22267–22275

34. Petitclerc, E., Stromblad, S., von Schalscha, T. L., Mitjans, F., Piulats, J., Montgomery, A. M., Cheresch, D. A., and Brooks, P. C. (1999) *Cancer Res.* **59**, 2724–2730

35. Bohnsack, B. L., and Hirschi, K. K. (2003) *Circ. Res.* **92**, 255–257

36. Bernatchez, P. N., Soker, S., and Sirois, M. G. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 31047–31054

37. Borges, E., Jan, Y., and Ruoslahti, E. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 39867–39873

38. Pratt, W. B. (1998) *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **217**, 420–434

39. Morano, K. A., and Thiele, D. J. (1999) *EMBO J.* **18**, 5953–5962

40. Nollen, E. A., and Morimoto, R. I. (2002) *J. Cell Sci.* **115**, 2809–2816

41. Solit, D. B., Basso, A. D., Olshen, A. B., Scher, H. I., and Rosen, N. (2003) *Cancer Res.* **63**, 2139–2144

42. Citri, A., Alroy, I., Lavi, S., Rubin, C., Xu, W., Grammatikakis, N., Patterson, C., Neckers, L., Fry, D. W., and Yarden, Y. (2002) *EMBO J.* **21**, 2407–2417

43. Mimnaugh, E. G., Chavany, C., and Neckers, L. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 22796–22801

44. Chavany, C., Mimnaugh, E., Miller, P., Bitton, R., Nguyen, P., Trepel, J., Whitesell, L., Schnur, R., Moyer, J., and Neckers, L. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 4974–4977
45. Xu, W., Mimnaugh, E. G., Kim, J. S., Trepel, J. B., and Neckers, L. M. (2002) *Cell Stress Chaperones* **7**, 91–96
46. Sato, S., Fujita, N., and Tsuruo, T. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 10832–10837
47. Grammatikakis, N., Lin, J. H., Grammatikakis, A., Tsiachlis, P. N., and Cochran, B. H. (1999) *Mol. Cell. Biol.* **19**, 1661–1672
48. Siligardi, G., Panaretou, B., Meyer, P., Singh, S., Woolfson, D. N., Piper, P. W., Pearl, L. H., and Prodromou, C. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 20151–20159
49. Pai, K. S., and Cunningham, D. D. (2002) *J. Neurochem.* **80**, 715–718
50. Pai, K. S., Mahajan, V. B., Lau, A., and Cunningham, D. D. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 32642–32647
51. Imamura, F., Mukai, M., Ayaki, M., and Akedo, H. (2000) *Jpn. J. Cancer Res.* **91**, 811–816
52. Sinnott-Smith, J., Lunn, J. A., Leopoldt, D., and Rozengurt, E. (2001) *Exp. Cell Res.* **266**, 292–302
53. Shi, Q., and Boettiger, D. (2003) *Mol. Biol. Cell* **14**, 4306–4315
54. Arias-Salgado, E. G., Lizano, S., Sarkar, S., Brugge, J. S., Ginsberg, M. H., and Shattil, S. J. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 13298–13302
55. Turner, C. E. (2000) *J. Cell Sci.* **113**, 4139–4140

Chapitre 3

Rôles de ROCK et Pyk2 dans la
phosphorylation de FAK

3. La phosphorylation de FAK sur résidu sérine 732 par la kinase ROCK est essentielle pour la phosphorylation de FAK sur tyrosine 407 en réponse au VEGF

Ce chapitre fait l'objet d'un article accepté avec modifications dans la revue *The Molecular Biology of Cell* et constitue la version finale telle que soumise dans ce journal le 22 Décembre 2005. J'ai effectué l'ensemble des manipulations qui sont ici représentées par les figures avec le support de François Houle. J'ai également contribué à son écriture en réalisant la première version du manuscrit. Le troisième auteur de cet article a fourni les constructions adénovirales Pyk2 wild type et Y402F.

Resubmitted for publication, MBC, May 4, 2006

3.1. Résumé

La kinase d'adhérence focale (FAK) est phosphorylée sur résidus tyrosine et sérine suite à l'activation des cellules endothéliales. Dans ce travail, nous avons cherché une relation entre la phosphorylation sur résidus tyrosine et sérine et, l'activation de la migration des cellules endothéliales en réponse au *vascular endothelial growth factor* (VEGF). Nous avons trouvé que le VEGF induit l'activation de la kinase dépendant de la petite GTPase RhoA, ROCK, kinase sous jacente au VEGFR2. Ainsi, la kinase ROCK activée conduit à la phosphorylation du résidu sérine 732 de FAK. Par ailleurs, la Proline-rich tyrosine kinase-2 (Pyk2) est également phosphorylée en réponse au VEGF. Cette activation nécessite l'engagement des intégrines $\alpha_v\beta_3$ et déclenche la phosphorylation du résidu tyrosine 407, événement nécessaire pour la migration cellulaire. De manière intéressante, la phosphorylation du résidu sérine 732, dépendante de la kinase ROCK, est essentielle pour la phosphorylation du résidu tyrosine 407 qui, elle, est dépendante de la kinase Pyk2. En effet, des cellules exprimant une forme mutée de FAK pour le résidu sérine 732 inhibe la phosphorylation du résidu tyrosine 407. Ainsi, nous proposons un modèle séquentiel dans lequel le VEGF initie l'activation du sentier signalétique VEGFR2-ROCK conduisant à la phosphorylation du résidu sérine 732 de FAK. Cette phosphorylation change la conformation tridimensionnelle de FAK ce qui rend la protéine plus accessible à la kinase Pyk2 dont l'activation dépend de l'engagement des intégrines $\alpha_v\beta_3$. Ainsi, Pyk2 activée, déclenche la phosphorylation de FAK sur son résidu tyrosine 407, événement nécessaire à la migration cellulaire.

3.2. Article

Phosphorylation of FAK on Ser732 is induced by ROCK and is essential for Pyk2-mediated phosphorylation of FAK on Tyr407 in response to VEGF

Fabrice Le Bœuf*, François Houle*, Mark Sussman† and Jacques Huot*‡

*Le Centre de recherche en cancérologie de l'Université Laval, 9 rue McMahan, Québec G1R-2J6, Canada and † SDSU Heart Institute San Diego State University, Department of Biology, LS 4265500 Campanile Drive, San Diego, CA 92182

Running Head: Roles of ROCK and Pyk2 in phosphorylation of FAK

Key Words: VEGF, FAK, ROCK, Pyk-2

‡**Corresponding Author:** Dr. Jacques Huot, Centre de recherche en cancérologie de l'Université Laval, L'Hôtel-Dieu de Québec, 9 rue McMahan, Québec, G1R 2J6, Canada. Tel.: (418) 525 4444 15553. Fax: (418) 691-5439. E-mail: Jacques.Huot@phc.ulaval.ca

3.2.1. Abbreviations used

BAEC, bovine aortic endothelial cells; GADPH, glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase; FAT, focal adhesion targeting; FERM, protein four.1, ezrin, radixin, moesin; FRNK, FAK related non-kinase domain; HSP90, heat shock protein of 90 kDa; HUVEC, human umbilical vein endothelial cells; MLC, myosin light chain; Pyk2, proline-rich tyrosine kinase-2; ROCK, Rho-dependent kinase; VEGF, vascular endothelial growth factor.

3.2.2. Abstract

Focal adhesion kinase (FAK) is phosphorylated on tyrosine and serine residues following cell activation. In the present work, we investigated the relationship between tyrosine and serine phosphorylation of FAK in promoting endothelial cell migration in response to VEGF. We found that VEGF induces the activation of the RhoA-dependant kinase ROCK downstream from VEGFR2. In turn, activated ROCK phosphorylates FAK on Ser732. Proline-rich tyrosine kinase-2 (Pyk2) is also activated in response to VEGF. Its activation requires the clustering of integrin $\alpha_v\beta_3$ and triggers the phosphorylation of Tyr407 within FAK, an event necessary for cell migration. Interestingly, ROCK-mediated phosphorylation of Ser732 is essential for Pyk2-dependent phosphorylation of Tyr407 since the latter is abrogated in cells expressing a FAK mutant that is non-phosphorylatable on Ser732. We propose a sequential model in which VEGF elicits the activation of the VEGFR2-ROCK pathway leading to phosphorylation of Ser732 within FAK. In turn, phosphorylation of Ser732 changes the conformation of FAK making it accessible to Pyk2 activated in response to its association with integrin β_3 . Then activated Pyk2 triggers the phosphorylation of FAK on Tyr407 promoting cell migration.

3.2.3. Introduction

Cell migration requires hierarchical and coordinate signaling events that converge on appropriate actin remodeling. It regulates several physiological and pathological processes. In particular, actin-driven cell motility is centrally involved in ensuring endothelial cell migration in response to angiogenic agents such as vascular endothelial cell growth factor (VEGF) (Rousseau et al., 2000a). VEGF is a potent angiogenic agent that initiates endothelial cell migration following its binding to the tyrosine kinase receptor VEGFR2 (Bernatchez et al., 1999; Rousseau et al., 2000b). VEGFR2-mediated endothelial cell migration is associated with activation of several kinase pathways including SAPK2/p38 (p38) MAP kinase, phosphatidylinositol-3 kinase and FAK (Abedi and Zachary, 1997; Rousseau et al., 1997; Matsumoto and Claesson-Welsh, 2001; Lamalice et al., 2004). These pathways act complementarily to transmit signals that trigger the actin remodeling that underlies cell migration. Notably, VEGF-induced activation of FAK regulates the proper turnover of focal adhesions that is required to allow the dynamic adhesion and de-adhesion processes inherent to cell migration (Le Boeuf et al., 2004). Intriguingly, despite the role of FAK as a biosensor and integrator of cell migration, much remains to be known concerning the mechanisms by which it is activated by growth factors.

FAK is a nonreceptor protein kinase that is found in integrin-enriched focal contacts (Guan et al., 1991; Kornberg et al., 1992; Mitra et al., 2005). The protein is very well conserved between species in which it plays similar functions (Parsons, 2003; Mitra et al., 2005). It comprises a central catalytic domain located between a N-terminal region containing a FERM domain (protein four.1, ezrin, radixin, moesin) that interacts with integrin and growth factor receptors, and a C-terminal region that contains the focal adhesion-targeting (FAT) domain. This latter is implicated in interactions with structural and signaling proteins (Parsons, 2003; Mitra et al., 2005). FAK possesses six tyrosyl residues that are differentially phosphorylated by diverse agonists and that are implicated in transmitting different signals and effects. Two of these tyrosyl residues (Tyr397, and Tyr407) are located at the boundary between the N-terminal and kinase domains, two are located in the

catalytic domain (Tyr576, Tyr577), and two in the C-terminal region (Tyr861, Tyr925) (Cornillon et al., 2003; Parsons, 2003; Mitra et al., 2005). Tyr397, a highly conserved site between species, is an autophosphorylation site that recruits Src homology-2 domain containing proteins including members of Src family kinases, phospholipase C- γ , GRB7 and the p85 subunit of phosphatidylinositol-3 kinase (Mitra et al., 2005). It seems that Src kinases are first recruited to Tyr397 and that they are involved in transphosphorylating other tyrosyl residues within FAK. For example, Src kinases-induced transphosphorylation of Tyr576 and Tyr577 confers maximal activation of FAK and signaling in response to adhesion (Calalb et al., 1995; Owen et al., 1999). Moreover, Tyr576 and Tyr861 are both phosphorylated in a Src-dependent manner in response to VEGF (Holmqvist et al., 2004; Le Boeuf et al., 2004). In contrast, Tyr407 is phosphorylated in a Src-independent manner following exposure to VEGF (Le Boeuf et al., 2004). The phosphorylation of this site by VEGF is associated with the recruitment of HSP90 to the C-terminal portion of VEGFR2 and with the activation of the RhoA-ROCK cascade. Then follows the recruitment of vinculin and paxillin to focal adhesions (Le Boeuf et al., 2004). Interestingly, FAK possess four serine sites located in the C-terminal tail: Ser722, Ser732, Ser843 and Ser910 (Parsons, 2003). The role of these sites is still ill defined. Nevertheless, it has been shown that Ser732 is implicated in cell migration and can be phosphorylated by Cdk5, a serine/threonine kinase implicated in neuron migration (Xie and Tsai, 2004). Nothing is known concerning the functional interplay between phosphotyrosine and phosphoserine sites within FAK.

Proline-rich tyrosine kinase-2 (Pyk2), also called cell adhesion kinase- β (CAK β) or related adhesion focal tyrosine kinase (RAFTK), is another nonreceptor protein kinase closely related to FAK. It is found in high amount in endothelial cells in which it modulates cell adhesion and migration (Dikic et al., 1998; Wang et al., 2003; Mitra et al., 2005). The homology between Pyk2 and FAK is strong, being characterized by 60% sequence identity in the central kinase domain, conservation of the proline rich regions, and identical positions of four tyrosine phosphorylation sites (Mitra et al., 2005). Tyr402, 579, 580 and 881 within Pyk2 correspond to Tyr397, 576, 577 and 925 within FAK, respectively (Mitra et al., 2005). The phosphorylation of these sites within Pyk2 triggers the activation of

signaling pathways that are common to those activated by corresponding tyrosyl residues within FAK (Schlaepfer et al., 1999). Nevertheless, the differential binding activities of the FERM and FAT domains within FAK and Pyk-2 contribute to limit the functional redundancy between the two kinases (Mitra et al., 2005). Interestingly, in leukocytes adhering to vitronectin, ligation of integrin $\alpha\beta3$ induces phosphorylation of Pyk2 on its autophosphorylation site Tyr402 and its association with phosphorylated Tyr747 within integrin $\beta3$ (Butler and Blystone, 2005). This finding is of particular interest in the context of VEGF since VEGFR2 should interact with integrin $\alpha\beta3$ to induce a productive signaling to both p38 and FAK (Soldi et al., 1999; Byzova et al., 2000; Masson-Gadais et al., 2003). Overall, these findings suggest that FAK and Pyk2 may jointly participate to transmit the VEGF signal downstream from the VEGFR2- $\alpha\beta3$ integrin complex.

In the present study, we investigated the mechanisms that regulate FAK phosphorylation and migratory functions in response of VEGF in endothelial cells. We investigated both the interplay between serine and tyrosine phosphorylation and the interaction between FAK and Pyk2. We report that exposure of endothelial cells to VEGF drives the activation of the RhoA-dependant kinase ROCK downstream from VEGFR2. Then, activated ROCK phosphorylates FAK on Ser732, which is essential for phosphorylation of Tyr407 and for cell migration. We further show that Pyk2 is activated by VEGF-induced clustering of integrin $\alpha\beta3$, and is responsible for the phosphorylation of Tyr407.

3.2.4. MATERIALS and METHODS

Reagents

VEGF-A165, endothelial cell growth supplement (ECGS) and geldanamycin were purchased from Sigma (St Louis, Missouri). Y27632 and SU6656 were obtained from Calbiochem (San Diego, CA). Peptides DEL-1 (CEISEAYRGDTFIGYVCK) and FAK-Tyr407 (EIIDEEDTY407TMPSTRD) were synthesized by Le Centre de Synthèse de Peptides de l'Est du Québec (Québec, Canada). Constitutively active form of ROCK1 and Pyk2, as well as the synthetic peptide [GG(EEEEY)10EE] biotin conjugate at the N-terminus were obtained from Upstate (Charlottesville VA). Porcine Myosin Light Chain (MLC) was from Sigma.

Cells

HUVEC were isolated by collagenase digestion of umbilical veins from undamaged sections of fresh cords (Huot et al., 1997). After isolation, cells were plated on gelatine-coated 75 cm² culture dishes in MXV medium (199 medium containing 20% heat-inactivated FBS, ECGS (60 µg/ml), glutamine, heparin and antibiotics). Sub-cultures were obtained by trypsination and were used at passages <4. Treatments were done on HUVEC cultivated on gelatine and made quiescent by incubation for 16-20 h in ECGS-free medium containing 5% FBS. BAEC were isolated from a bovine aortic segment (Neagoe et al., 2005). The cells were obtained by gentle scraping of the superficial internal layer of the aortic segment. BAEC were collected in DMEM medium supplemented with 10% characterized FBS (HyClone, South Logan UT) and were grown on gelatine (Neagoe et al., 2005). Mouse embryo fibroblasts (MEF) FAK^{-/-} cells (Ilic et al., 1995) were cultivated in DMEM medium supplemented with 10% FBS and β-mercaptoethanol (3,5µl/500ml medium). All cultures were maintained at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂.

Antibodies

The anti-FAK antibody used for Western blotting was purchased from BD Biosciences

(Mississauga, Ont. Canada). The anti-Src (Src2) antibody is a rabbit polyclonal antibody obtained from Santa-Cruz (CA). The mouse monoclonal anti-vinculin (clone hVIN-1) and anti-tubulin (clone B5-1-2) antibodies were from Sigma (St Louis, MO). The anti-integrin $\beta 3$ antibody used in immunoprecipitation experiments is a mouse polyclonal antibody (GPIIIa) whereas the anti- $\beta 3$ antibody used for Western blotting is a rabbit antibody (CD61). They were obtained from Chemicon (San Diego, CA). The phospho-specific rabbit polyclonal antibodies against phosphorylated human, chicken and mouse FAK were from BioSource (Camarillo, CA) except against pTyr397 that was obtained from Upstate (Charlottesville VI). The specificity of these antibodies for their phosphorylated residues is supported by competition studies showing that only the phosphopeptide corresponding to the given specific site blocks the antibody signal (BioSource: product analysis sheet). Nevertheless, we found that the anti-Ser732 and anti-Tyr407 detect two bands in total extracts (Figure 1A and B and data not shown). However, both antibodies respectively detect only one band for Ser732 or for Tyr407 in immunoprecipitated extracts (Figure 3 and data not shown). These specific Ser732 or Tyr407 bands correspond to the strongest band in Figures 1 and 2 and were used for quantification. The phospho-specific rabbit polyclonal antibody against Pyk2 (pY402) was from BD Biosciences (Mississauga, Ont. Canada). The HA antibody (clone 12Ca5) was from Roche (Indianapolis, IN) and the antibody against Myc (Clone 9E10) was from Covance (Berkeley, CA). The anti-mouse-IgG-horseradish peroxidase HRP and anti-rabbit-IgG-HRP antibodies were from Jackson Laboratories (Bar Harbor Ma). The phosphospecific rabbit polyclonal antibody against phosphorylated MLC was from Cell Signaling Technology (Beverly, CA). Porcine anti GADPH was purchased from Novus Biologicals (Littleton CO).

Plasmids, siRNA and adenovirus

HA-FAK cDNA constructs were given by Dr. Jun-Lin Guan (Cornell University NY), GFP-FAK, GFP-FAK Ser732Ala and HA-FAK Ser732Ala were from Dr. Li-Huei Tsai (Harvard Medical School: (Xie et al., 2003)). FRNK-GST construct was designed by inserting the corresponding fragments derived from BamHI-EcoRI digested into the vector pGEX-6P-3 (Amersham/Pharmacia). Mutant FAK Tyr407Phe in pKH3 was obtained by site directed mutagenesis (Le Boeuf et al., 2004). Wild type ROCK and constitutively

active ROCK $\Delta 3$ were from Dr. Shuh Narumiya (Kyoto University: (Ishizaki et al., 1997)). Adenoviruses containing wild type Pyk2 and Tyr402Phe mutant were previously described (Melendez et al., 2004). FAK siRNA was purchased from Dharmacon (Lafayette CO) and was designed to target the mRNA of human FAK (GeneBank accession number NM_005607). The target sequence is as follows : sense : GAAGUUGGGUUGUCUAGAAUU, anti sense : 5'-PUUCUAGACAACCCAACUUCUU. The SMART pool siRNA duplexes designed to target Pyk2 (NM_004103) and ROCK1 (NM_005406) mRNAs were also purchased from Dharmacon (Lafayette, CO). Control siRNA to target GADPH mRNA was a gift from Dr. Darren E. Richard (Laval University Québec, Canada).

Gene and siRNA transfer

Gene

Gene transfer in HUVEC was done by electroporation (Houle et al., 2003, Le Boeuf et al., 2004) and adenoviral-mediated infection. Briefly, electroporation with an Eppendorf Multiporator was done on 1×10^6 cells in 200 mOsm electroporation buffer (Eppendorf) using 3 μ g DNA and 4mm cuvettes. For electroporation, co-transfection of an EGFP construct allows evaluating transfection efficiency as 30% following determination of the percentage of cells expressing EGFP. For gene transfer by infection, subconfluent HUVEC cultures were infected for 24 h with adenoviral vectors expressing wild type Pyk2, Pyk2-Tyr402Phe or EGFP. After 24 h infection, the medium was aspirated and replaced with serum free-medium for 16 h. Then, cells were treated with VEGF and lysates were prepared for biochemical studies. Immunofluorescence detection of cells infected with Pyk2 revealed that more than 90% of the cells expressed the proteins. BAEC were transfected using polyethylenimine (PEI) high molecular weight from Sigma. Plasmids (20 μ g DNA/ 2×10^6 cells) were mixed with 500 μ l NaCl 150mM and 10 μ l PEI (0.43%) for 15 min at room temperature. Cells were incubated with DNAs during 4 h and medium was replaced by fresh medium. Cells were overlaid with complete medium and assays were done 48 h post-transfection. Co-transfection of a GFP construct allows evaluating transfection efficiency as 40%. For transient transfection, MEF FAK^{-/-} cells (5×10^5 cells/60mm Petri dishes) were

lipofected using 11 µg of DNA with a ratio of 3:1 with Tfx-50 (Promega) for 90 min in the absence of serum. Cells were then overlaid with complete medium, and assays were done 48 h post-transfection. Sixteen hours before the experiments, cells were incubated in serum-free medium. Co-transfection of a green fluorescent protein (GFP) construct allows evaluating transfection efficiency between 35% and 45% following determination of the percentage of cells that express GFP under the fluorescence microscope. siRNAs have been introduced in the cells by electroporation, as for plasmids, except that 40 to 360 pmoles siRNA were used. The cells have been used 48 h later.

Immunoprecipitation and western blotting

HA-FAK and integrin b3 were immunoprecipitated as described (Le Boeuf, Houle et al. 2004). After treatments, the cells were washed with PBS. Then, they were extracted in B buffer containing 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 1% Triton X-100, 0.1% sodium deoxycholate, 2 mM EDTA, 2 mM EGTA, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM benzamide, 1 mM leupeptin, 50 mM NaF and 1 mM PMSF. The further steps were done at 4°C. Cells were centrifuged at 16000 x g for 10 min. Proteins were quantified by the Bradford assay and equal quantity of proteins was diluted in B buffer before being pre-cleared for 60 min with Protein A or Protein G Sepharose. Supernatants were incubated on ice for 90 min with appropriate antibodies. Then, 10 µl of 50% v/v Protein-G Sepharose (Amersham Biotech Montreal, Canada) were added and the incubation was extended for 30 min on ice. Antigen-antibody complexes were washed 4 times with B Buffer before adding SDS-PAGE loading buffer. Proteins were separated through SDS-PAGE and the gels were transferred onto nitrocellulose membranes for Western blotting. The immunoprecipitations with the HA agarose conjugate were done similarly, except that proteins were directly incubated overnight with the conjugated antibody. After reacting nitrocellulose membranes with primary antibody, antigen-antibody complexes were detected with an anti-IgG coupled to HRP antibody and were revealed using an ECL kit. For stripping, nitrocellulose membranes were first washed in TBS 1x containing 0.1% Tween. Then, they were incubated for 30 min at 68°C in fresh stripping buffer and were washed again in TBS containing 0.1% Tween. Quantification of the immunoreactive bands was done by densitometric scanning using the NIH Image Software.

Immunocomplex kinase assay of ROCK

In these assays, we used BAEC since they allow expressing higher levels of exogenous proteins than HUVEC. Myc-tagged-ROCK constructs were transfected in BAEC with PEI and treated or not with VEGF (10ng/ml). Proteins were extracted with RIPA-Base buffer (50mM HEPES pH7.4, 150mM NaCl, 1,5mM MgCl₂, 1mM EGTA, Triton 1%, Glycerol 10%, 50mM NaF, 10mM NaPPi, 1mM Na₃VO₄, 1mM Benzamidine, 1mM PMSF, 1mM Leupeptine). Proteins were centrifuged and supernatants were added to HNTG buffer (50mM HEPES pH7.4, 150mM NaCl, 1mM EGTA, Triton 0.1%, 10mM NaPPi, 1mM Na₃VO₄). Myc-tagged proteins were immunoprecipitated using anti-Myc antibody during 2 h at 4°C and 20 µl of 50% v/v Protein-G Sepharose (Amersham Biotech Montreal, Canada) were added for 1 h to the incubation mixture (250 mM HEPES pH 7.4, 50 mM MgCl₂, 250 mM NaCl, 7.5 mM DTT, Brj35 0.15%, 0.5 mM ATP). ROCK kinase activity was assayed by the addition of 10mg or 4mg of GST-FRNK or 4mg of MLC as positive control to the kinase buffer at 30°C. The reaction was stopped after 20 min by the addition of SDS-loading buffer. Proteins were run through SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose membranes. Phosphorylation of Ser732 was evaluated in Western blotting using a specific antibody against FAK phosphoserine 732.

In vitro kinase assay of ROCK and Pyk2

Direct in-vitro kinase assay of ROCK1 was performed by adding constitutively active form of ROCK1 to FRNK (4µg) or MLC (4µg) for 20 min at 300C. In the case of Pyk2, the assay was done similarly by adding constitutively active form of Pyk2 to the FAK-Tyr407 peptide EIIDEEDTY407TMPSTRD (2µg) or the synthetic peptide [GG(EEEEY)10EE] biotin conjugate, used as a positive control (2µg) for 20 min at 300C. The reaction was stopped after 20 min by the addition of SDS-loading buffer. Thereafter, the proteins were run through SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose membranes. Phosphorylation of Ser732 or MLC was evaluated in Western blotting using specific antibodies against phosphoserine 732 within FRNK or phosphoserine 19 within MLC. Phosphorylation of Tyr 407 within the FAK peptide EIIDEEDTY407TMPSTRD or Tyr within the [GG(EEEEY)10EE] peptide was evaluated using specific antibodies against phospho-

Tyr407 and anti-phospho-Tyr 4G10 mouse antibody, respectively.

Immunofluorescence

HUVEC were plated on gelatin-coated Labtek chambers. After treatments, cells were fixed with 3.7% formaldehyde and permeabilized with 0.1% saponin in PBS, pH 7.5. F-actin was detected using fluorescein isothiocyanate conjugated phalloidin (33.3 $\mu\text{g/ml}$) diluted 1:50 in phosphate-buffered saline. Vinculin was detected using hVIN-1 monoclonal antibody. Vinculin antigen-antibody complexes were detected with biotin-labeled anti-mouse IgG and were revealed with Texas Red-conjugated streptavidin. GFP-FAK constructs were electroporated and immunofluorescence was realized to detect GFP. The cells were examined by confocal microscopy (Huot, Houle et al. 1998). The percentage of cells showing recruitment of vinculin to the ventral focal adhesions been established following counting of 400-500 cells.

Cell migration assays

Cell migration was evaluated by means of Boyden chamber migration assays as previously described (Rousseau et al., 2000b). MEF FAK^{-/-} cells were transfected or not with increasing concentrations of FAK wild type cDNA along with a constant concentration of VEGFR2 (4 μg). EGFP was used as a control of transfection and an empty vector was used to keep the cDNA concentration constant. Forty hours later, cells were incubated in serum free medium. Sixteen hours later, cells were harvested with trypsin, counted, centrifuged and resuspended at 0.5×10^6 cells/ml in migration buffer (199 medium, 10 mM HEPES pH 7.4, 1mM MgCl₂, 0.5% BSA). Cells were added on the upper part of an 8.0 μm pore size gelatine-coated polycarbonate membrane separating the upper and lower chambers of a 6.5 mm transwell. Cells were left to adhere for 1 h. Then, VEGF (10 ng/ml) was added in the lower chamber. Two hours later, the cells on the upper part of the membrane were scraped and those that have migrated to the lower part were stained with Meyer's Hematoxylin and were counted under an inverted microscope. Assays were done in duplicates or triplicates. HUVEC were electroporated with an siRNA that specifically targets GAPDH mRNA or with increasing concentrations of siRNA that specifically target human FAK mRNA (from Dharmacon). Thereafter, cells were transfected for 48 hours with 1 μg of non-human forms

(chicken/mouse) of FAK that share more than 90% identity between each other but that are insensitive to human FAK sRNA. Then, HUVEC were treated with VEGF (5ng/ml) and processed for a migration assay in modified Boyden chambers. Co-electroporation of a EGFP-expressing plasmids allows evaluating migration of electroporated cells only.

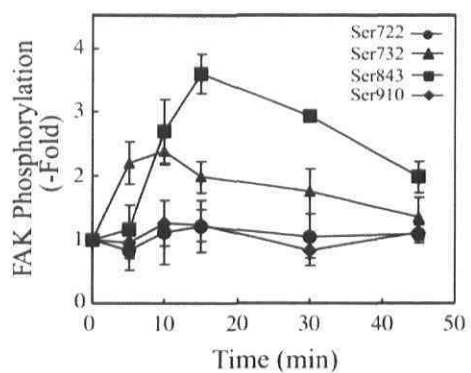
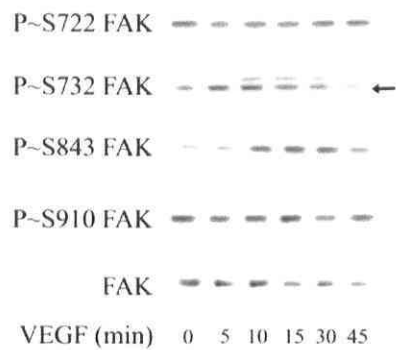
3.2.5. RESULTS

FAK is phosphorylated on Ser732 in response to VEGF, and the phosphorylation is impaired by inhibiting HSP90 or ROCK

FAK is phosphorylated on several tyrosyl residues in response to VEGF (Abu-Ghazaleh, Kabir et al. 2001; Eliceiri, Puente et al. 2002; Le Boeuf, Houle et al. 2004). This kinase also possesses four potentially phosphorylatable serine residues located in its C-terminus: Ser722, Ser732, Ser843 and Ser910. We previously reported that FAK is phosphorylated on Tyr407 downstream from VEGFR2-mediated RhoA-ROCK activation (Le Boeuf, Houle et al. 2004). In the present study, we investigated whether the FAK serine residues are phosphorylated by VEGF treatment, in an attempt to characterize their function and whether they influence phosphorylation of FAK on Tyr407.

Primary cultures of Human Umbilical Vein Endothelial cells (HUVEC) were treated with 5ng/ml VEGF for increasing periods of time. Thereafter, cell extracts were prepared, and FAK phosphorylation on Ser residues was determined by western blot using phosphospecific antibodies. Results show that VEGF did not induce the phosphorylation of Ser722 and 910 (**Figure 1A**). In contrast, the phosphorylation of Ser732 (arrow) and Ser843 was increased in response to VEGF, although the kinetics of phosphorylation was different (**Figure 1A**). Phosphorylation of Ser843 started only after 5 min to reach a peak at 15 min, whereas Ser732 was phosphorylated more rapidly reaching a peak between 5 and 10 min (**Figure 1A**). Interestingly, the kinetics of phosphorylation of Ser732 and Tyr407 (arrows) were comparable particularly for the first 10 min of treatment (**Figure 1B**). Moreover, the phosphorylation of Ser732 but not of Ser843 was inhibited following the inhibition of HSP90 and ROCK with geldanamycin and Y27632, respectively (**Figure 2**). Given that phosphorylation of Tyr407 necessitates the association of HSP90 with the C-terminal end of VEGFR2 and then the sequential activation of RhoA and ROCK, our findings highlight the possibility that the phosphorylation of Ser732 and Tyr407 shares a common cascade of activation and that they are mutually interdependent.

A



B

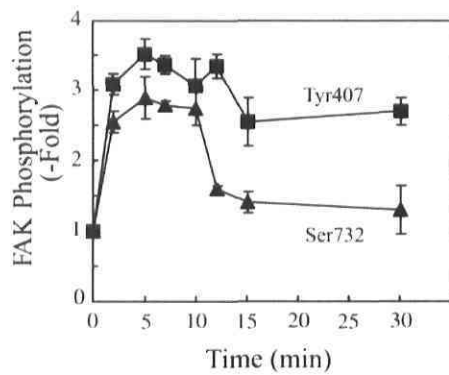
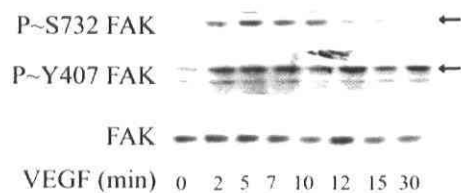


Figure 3-1 : VEGF induces phosphorylation of FAK on serine residues.

(A) Quiescent HUVEC were treated or not with VEGF (5 ng/ml) for increasing periods of time. Proteins were extracted and were separated by SDS-PAGE and transferred to a nitrocellulose membrane. The membrane was processed for immunodetection of phospho-FAK Ser722, Ser732, Ser843, Ser910, and total FAK. (B) Quiescent HUVEC were treated or not with VEGF (5 ng/ml) for increasing periods of time. Proteins were extracted as in A and were processed for immunodetection of phospho-FAK Ser732, Tyr407, and total FAK. Representative blots are shown on left and quantification of the blots (means \pm • S.D.) of three separate experiments are shown on right. Arrows denote the bands that specifically correspond to phospho-Ser732 and phospho-Tyr407 (see Materials and Methods), and that were used for quantification.

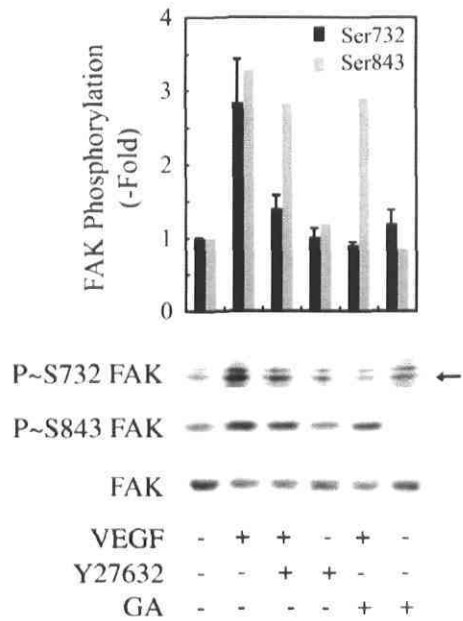


Figure 3-2 : VEGF-induced phosphorylation of FAK on Ser732 but not on Ser843 is inhibited in by geldanamycin or Y27632.

Quiescent HUVEC were pre-treated for 60 min with geldanamycin (GA, 1 $\mu\text{g/ml}$) or vehicle (0.25% DMSO) or for 120 min with Y27632 (25 μM), followed by VEGF treatment (5 ng/ml for 10 min). Cells extracts were prepared, and proteins were separated by SDS-PAGE and transferred to a nitrocellulose membrane. The membrane was processed for immunodetection of phospho-FAK Ser732 (upper panel), phospho-FAK, Ser843 (middle panel) and total FAK (lower panel). Data points represent means \pm S.D. of three experiments. Representative blots are shown. The arrow denotes the band that specifically corresponded to Ser732 (see Materials and Methods), and that was used for quantification.

A FAK nonphosphorylatable mutant of Ser732 abrogates the phosphorylation of Tyr407 and the recruitment of vinculin at the ventral focal adhesions

We next investigated the causal relationship between phosphorylation of Ser732 and Tyr407. HUVEC were electroporated with plasmids expressing wild type HA-FAK, HA-FAK Tyr407Phe or HA-FAK Ser732Ala and were treated or not with VEGF. Then, the HA-tag constructs were immunoprecipitated and phosphorylated Ser732 was immunodetected in cell extracts expressing FAK Tyr407Phe (**Figure 3A**). Reciprocally, phosphorylated Tyr407 was immunodetected in cell extracts expressing FAK Ser732Ala (**Figure 3B**). We found that the expression of the mutant FAK Tyr407Phe had no effect on the phosphorylation of Ser732 induced by VEGF (**Figure 3A**). In contrast, the expression of the mutant Ser732Ala impaired the phosphorylation of FAK Tyr407 in response to VEGF (**Figure 3B**). These results suggest that phosphorylation of Ser732 within FAK is a prerequisite for the phosphorylation of Tyr407. Given that Tyr397 is the autophosphorylation site of FAK and thereby is importantly involved in FAK-mediated events, we next verified whether the mutants Ser732 or Tyr407 compromised the phosphorylation of Tyr397. HUVEC were electroporated, as above, with plasmids expressing wild type HA-FAK, HA-FAK Tyr407Phe or HA-FAK Ser732Ala and were treated or not with VEGF. Then, the HA-TAG constructs were immunoprecipitated and phosphorylated Tyr397 was immunodetected in cell extracts expressing the various forms of HA-FAK. The results show that the phosphorylation of Tyr397 was not affected either by the mutant Ser732Ala or Tyr407Phe (**Figure 3C**).

We previously reported that phosphorylation of Tyr407 is required for the recruitment of vinculin to the ventral focal adhesions (Le Boeuf et al., 2004). In this context, one may expect that phosphorylation of Ser732 is required for the recruitment of vinculin to focal contacts. We next verified this possibility. HUVEC were electroporated with plasmids expressing GFP-tagged versions of wild type FAK or Ser732Ala mutated form of FAK and were treated or not with VEGF. Then, cells were examined in fluorescence microscopy to detect vinculin in GFP-FAK expressing cells. The results showed that, in cells expressing both wild type and Ser732Ala forms of FAK, vinculin remained at the periphery of the

cells (**Figure 4 A-B, G-H**). In the presence of VEGF, vinculin was recruited to the ventral adhesion plaques in ~80% of the cells expressing wt FAK (**Figures 4 C-D arrow, and Figure 4I**). Conversely, even in the presence of VEGF, vinculin still remained at cell periphery in most of the cells expressing the Ser732Ala mutated form of FAK (**Figures 4 E-F, arrow, and Figure 4I**). Of note, following VEGF treatment, the GFP-FAK Ser732Ala mutant remained itself at the periphery of the cells whereas the wt GFP-FAK localized to ventral focal adhesions. Overall, these results suggest that phosphorylation of FAK on Ser732 is required to trigger the formation of the ventral focal adhesions.

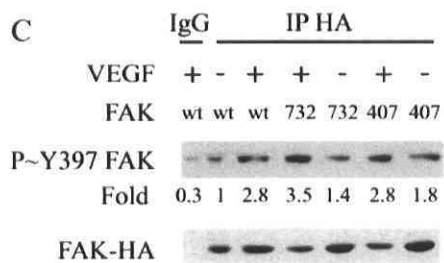
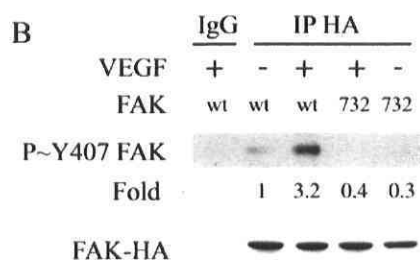
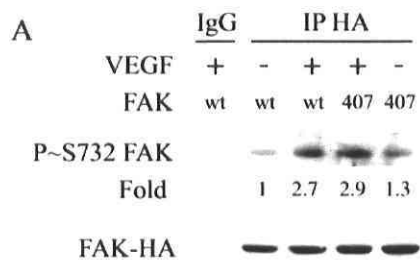


Figure 3-3 : VEGF-induced phosphorylation of FAK on Tyr407, but not on Tyr397 requires the phosphorylation of FAK on Ser732.

(A) Quiescent HUVEC transiently expressing wild type HA-tagged FAK (wt) or HA-tagged FAK mutant Tyr407Phe (407) were treated or not with VEGF (5 ng/ml for 10 min). After extraction, the HA-tagged proteins were immunoprecipitated using anti-HA mouse antibody. Control immunoprecipitation was done similarly using purified mouse IgG. Proteins were separated by SDS-PAGE and transferred to a nitrocellulose membrane. The membrane was processed for immunodetection of phospho-FAK Ser732 (upper panel), and total FAK-HA (lower panel). Representative blots of three separate experiments are shown.

(B) Quiescent HUVEC transiently expressing HA-tagged FAK (wt) or HA-tagged FAK-Ser732Ala (732) were treated or not with VEGF (5 ng/ml for 10 min). Cell extracts were prepared as in A, and the membrane was processed for immunodetection of phospho-FAK Tyr407 (upper panel), and total FAK-HA (lower panel). Representative blots of two separate experiments are shown.

(C) Quiescent HUVEC transiently expressing wild type HA-tagged FAK (wt), HA-tagged FAK mutants Ser732Ala (732) or Tyr407Phe (407) were treated or not with VEGF (5 ng/ml for 10 min). After extraction, the HA-tagged proteins were immunoprecipitated using anti-HA mouse antibody and processed as in A. The membrane was processed for immunodetection of phospho-FAK Tyr397 (upper panel), and total FAK-HA (lower panel).

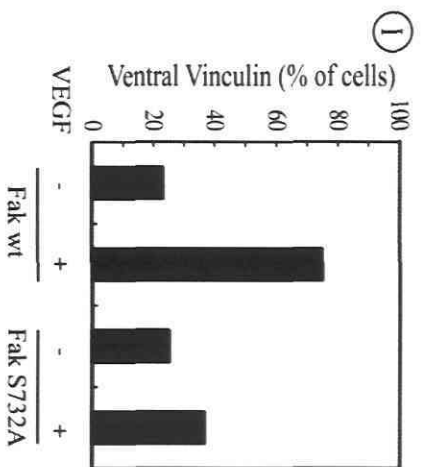
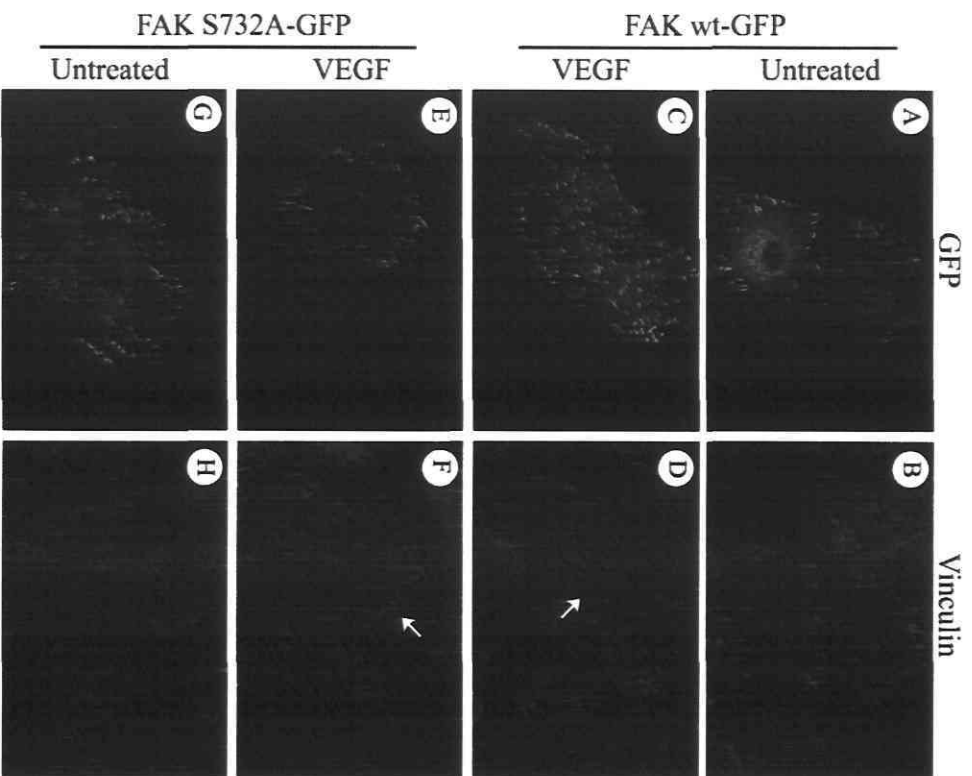


Figure 3-4 : Phosphorylation FAK on Ser732 is necessary for recruitment of vinculin in response to VEGF.

Quiescent HUVEC transiently expressing wild type FAK fused to GFP-tag or mutant FAK-Ser732Ala fused to GFP-tag were plated on gelatine-coated Labtek chambers and left untreated (**A-B, G-H**) or were exposed to 5 ng/ml VEGF for 5 min (**C-F**). After treatments, cells were fixed, permeabilized, and costained for GFP detection (**A, C, E, and G**) using an anti-GFP antibody and then an anti-rabbit IgG-fluorescein isothiocyanate-conjugated antibody for revelation in confocal fluorescence microscopy. Vinculin (**B, D, F, and H**) was detected using specific antibody coupled with a biotin-labeled anti-mouse IgG and revealed with Texas Red-conjugated streptavidin. Representative fields from two separate experiments are shown. The arrow in **D** denotes the recruitment of vinculin to the ventral focal adhesions in cells transfected with wild-type FAK and treated with 5 ng/ml VEGF. The arrow in **F** shows that, even in the presence of VEGF, vinculin remains at the periphery of the cells expressing the Ser732Ala mutant. **(I)** Quantification of cells showing recruitment of vinculin to the ventral focal adhesions. Quantification has been done on 400-500 cells for each condition.

ROCK directly phosphorylates Ser732 within FAK in response to VEGF

Since the phosphorylation of Ser732 was impaired by inhibiting ROCK with Y27632, we developed an immunocomplex kinase assays to assess whether ROCK may directly phosphorylate Ser732 within FAK. Bovine Aortic Endothelial Cells (BAEC) were transfected with plasmids expressing Myc-tagged versions of wild-type ROCK (wt-ROCK) or constitutive active ROCK (ROCK Δ 3) (Ishizaki et al., 1997). Thereafter, the cells were treated with VEGF and the different forms of transfected Myc-tagged ROCK were immunoprecipitated with an anti-Myc antibody. The immunoprecipitates were used to assay the kinase activity of ROCK using purified GST-FRNK or MLC as substrates. FRNK is a 45 kDa non-catalytic peptide of FAK that contains Ser732 (Parsons, 2003). We used FRNK as substrate instead of full length FAK to eliminate any catalytic activity of FAK. MLC was used as a positive control substrate to set up the assay since it is a well-known target of ROCK (Totsukawa et al., 2000; Matsumura, 2005). As expected, we found that VEGF increased the phosphorylation of MLC by immunoprecipitated wt ROCK and that activated ROCK (ROCK Δ 3) increased by itself the phosphorylation of MLC. VEGF did not affect the phosphorylation level of MLC by constitutively active ROCK (**Figure 5A**). These results indicated that the ROCK assay was functional and they confirmed that ROCK was activated by VEGF. Similar results were obtained when FRNK was used as a substrate to ascertain the ability of ROCK to phosphorylate Ser732. We found that VEGF increased by 2.7-fold the phosphorylation of Ser732 by immunoprecipitated wt ROCK. Moreover, constitutively activated ROCK (ROCK- Δ 3) increased by itself by 2.5-fold the phosphorylation of Ser732 and VEGF did not significantly modify the level of phosphorylation of Ser732 by ROCK- Δ 3 (**Figure 5B**). As expected, in cells transfected only with EGFP, no myc-ROCK and no phosphorylation of Ser732 was detected following immunoprecipitation with the anti-Myc-antibody. These results suggested that ROCK directly phosphorylated FAK on Ser732 in response to VEGF. In order to eliminate the possible influence of another kinase that might have co-immunoprecipitated with myc-ROCK in the immunocomplex assay, we proceed to a direct in vitro kinase assay. In this assay, purified activated ROCK I was incubated with purified FRNK or MLC and thereafter, the phosphorylation of Ser732 within FRNK and Ser19 within MLC were

evaluated in western blot. We found that activated ROCK induced the phosphorylation of MLC on Ser19 and FRNK on Ser732 (**Figure 5C and 5D**). Altogether, these results indicate that ROCK directly phosphorylates FAK on Ser732 in response to VEGF. The in vivo relevance of ROCK I in phosphorylating Ser732 in whole cells treated by VEGF was obtained by showing that the knockdown of ROCK I with siRNAs (smart pools from Dharmacon that target ROCK I mRNA) was associated with a proportional decrease in the phosphorylation of FAK on Ser732 and an inhibition (**Figure 5E**).

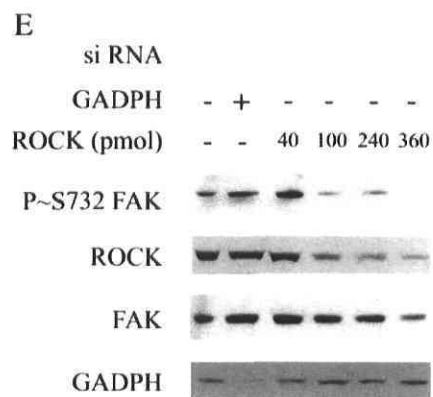
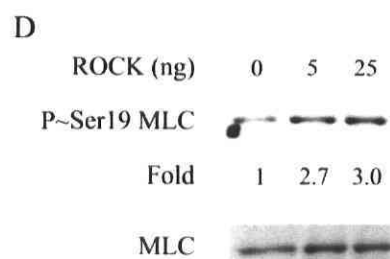
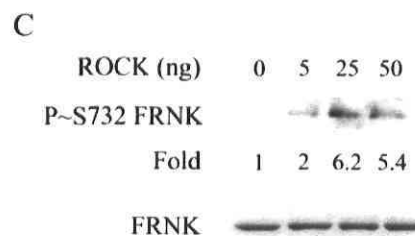
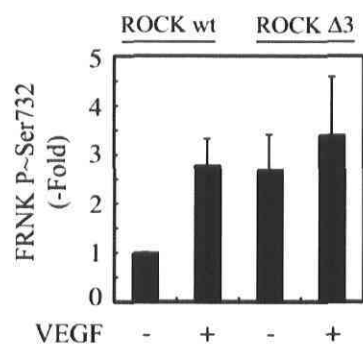
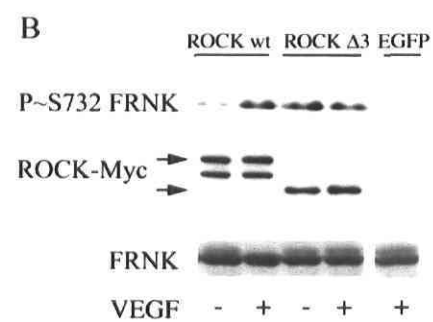
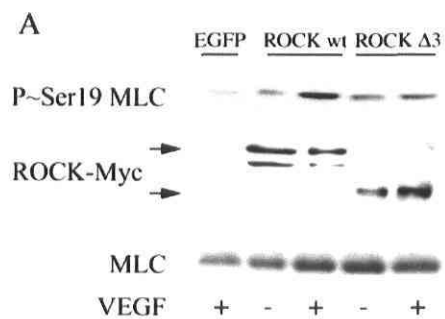


Figure 3-5 : ROCK directly phosphorylates FAK on Ser732 in response to VEGF.

(A) BAEC transiently expressing EGFP, wild type myc-tagged-ROCK I or constitutively active Myc-tagged ROCK I $\Delta 3$ were treated or not with VEGF (10 ng/ml for 5 min) and extracted. The Myc-tagged ROCK protein was immunoprecipitated using anti-Myc mouse antibody. Myc-tagged ROCK protein was processed for an immunocomplex *in-vitro* kinase assay using MLC as substrate in the presence of ATP (0.5mM) during 20 min. Proteins were separated by SDS-PAGE and transferred to a nitrocellulose membrane. The membrane was processed for immunodetection of phospho Ser19 within MLC (upper panel) and Myc-tagged ROCKs (middle panel). Ponceau Red staining of total MLC is shown as internal control for the amount of added substrate. (B) BAEC were processed as in A except that FRNK was used as substrate. The membrane was processed for immunodetection of phospho-Serine732 within FAK (upper panel). Myc-tagged ROCKs are shown in the middle panel and Ponceau Red staining to monitor FRNK in the lower panel. Representative blots are shown and quantification of the blots from duplicate samples from five separate experiments (means \pm S.D.) is shown. (C-D) Direct *in vitro* kinase assay was performed using increasing amounts of constitutively active form of ROCK I that was incubated with FRNK (C) or MLC (D) as substrates. Proteins were separated by SDS-PAGE and transferred to a nitrocellulose membrane. The membrane was processed for immunodetection of phospho-Ser732 within FRNK or phospho-Ser19 within MLC. Immunodetection of total FRNK and total MLC are shown (lower panels). (E) Quiescent HUVEC were electroporated with 40 pmoles siRNA that specifically targets GADPH mRNA or with increasing concentrations of siRNAs that specifically target ROCK I mRNA (smart pools from Dharmacon). Forty-eight hours later, cells were treated for 10 min with 5ng/ml VEGF, and proteins were extracted separated by SDS-PAGE and transferred to a nitrocellulose membrane. The membrane was processed for immunodetection of phospho Ser732 FAK, ROCK I, total FAK or GADPH.

VEGF induces the phosphorylation of Pyk-2, which leads to phosphorylation of Tyr407 within FAK

The FAK-related kinase Pyk2 is recruited to Tyr747 within integrin β_3 in adhering leukocytes (Butler and Blystone, 2005). Moreover, Pyk2 has been proposed to phosphorylate FAK on Tyr407 during epithelial mesenchymal transdifferentiation (Li *et al.*, 1999; Nakamura *et al.*, 2001). Considering that integrin $\alpha_v\beta_3$ is implicated in transmitting the VEGF signal to FAK in endothelial cells maintained on matrices, such as vitronectin and gelatine, that bind $\alpha_v\beta_3$ (Petitclerc *et al.*, 1999; Masson-Gadais *et al.*, 2003), we investigated whether Pyk2 was involved in VEGF signaling and especially in phosphorylating FAK on Tyr407.

We verified first whether VEGF triggers the activation of Pyk2. HUVEC cultivated on gelatine were treated for various periods of time in the absence or presence of VEGF. Then, cell extracts were prepared and the activation of Pyk2 was evaluated by quantifying the phosphorylation level of its autophosphorylation site Tyr402 in western blots. Results showed that the activation of Pyk2 was quickly increased by VEGF to reach a peak at 5 min, after what it progressively decreased to return to basal level after 20 min (**Figure 6A**). Interestingly, the VEGF-induced activation of Pyk2 was independent of both HSP90 and ROCK being not inhibited by geldanamycin or Y27632 (**Figure 6B**). These results suggest that Pyk2 is not in the same linear pathway as that linking ROCK to VEGFR2. Of note, the activation of Pyk2 was also independent of Src kinases being not inhibited by SU6656 (**Figure 6B**).

We investigated next whether the activation of Pyk2 by VEGF may derive from the activation of integrin sub-unit $\beta 3$, to which it is recruited along with Src and FAK in a VEGF-sensitive manner (**Figure 6C**). To demonstrate this point, we used HUVEC in suspension, since integrins are not engaged in cells maintained in suspension. We then treated the cells with VEGF and/or DEL-1, a peptide that specifically induces the clustering of integrin $\alpha v\beta 3$ even in cells in suspension (Penta et al., 1999). Results show that DEL-1 increased the association of activated Pyk2 (p~Y402 Pyk2) with integrin $\beta 3$. The effect was more pronounced in the presence of VEGF (**Figure 6D upper**). These findings suggest that the activation of Pyk2 derives from the activation of integrin $\beta 3$ associated with VEGFR2. Interestingly, the phosphorylation of Tyr407 within FAK was phosphorylated in suspended cells exposed to both VEGF and DEL-1 but not DEL-1 alone (**Figure 6D, third panel**). From this result, we hypothesise that Pyk2 may contribute to phosphorylate Tyr407, and that this might be associated with a VEGF-induced conformational change that renders FAK Tyr407 accessible to Pyk2 activated in response to activation of $\alpha v\beta 3$. However, further studies, including crystallographic studies, should be done to ascertain this possibility.

Figure 3-6 : Pyk2 is phosphorylated in an HSP90- and ROCK-independent manner in response to VEGF and it associates with integrin β 3 sub-unit.

(A) Quiescent HUVEC were treated or not with VEGF (5 ng/ml) for increasing periods of time. Cells were then extracted, and proteins were separated by SDS-PAGE and transferred to a nitrocellulose membrane. The membrane was processed for immunodetection of phospho-Pyk2 Tyr402 (upper panel), and total α -tubulin (lower panel) to monitor loading. Representative autoradiograms are shown and data points represent means of two separate experiments. (B) Quiescent HUVEC were pre-treated for 60 min with geldanamycin (GA, 1 μ g/ml) or vehicle (0.25% DMSO), or for 120 min with Y27632 (25 μ M), or SU6656 (5 μ M). Cells were treated or not with VEGF (5 ng/ml for 5 min) and were extracted and processed as in A. Representative blots are shown and data points represent means \pm S.D. of three experiments. (C) Quiescent HUVEC were treated or not with VEGF (5 ng/ml) for 5 and 30 min. Cells were extracted and integrin β 3 was immunoprecipitated using anti- β 3 mouse antibody. Control immunoprecipitation was done similarly using pre-immune mouse IgG. Proteins were separated by SDS-PAGE and transferred to a nitrocellulose membrane. The membrane was processed for Western blot using anti-FAK mouse antibody, anti-Src mouse antibody and anti-Pyk2 mouse antibody. The membrane was reprobed for total integrin β 3 using anti- β 3 mouse antibody to ensure equal protein loading (fourth panel). (D) HUVEC were trypsinized and left in suspension for 20 min in serum free medium. Then, peptide DEL-1 (75nM) was added or not for 30 min. Suspended cells were treated or not with VEGF (5ng/ml) for the last 5 min. Cells were then extracted, proteins separated on SDS-PAGE and transferred on nitrocellulose membrane. The membrane was processed for immunodetection of phospho-Pyk2 Tyr402, total Pyk2, phospho-FAK Tyr407. The membrane was reprobed for total integrin β 3 using anti- β 3 rabbit antibody to ensure equal protein loading (fourth panel). Representative blots are shown, and data points represent means \pm S.D. of duplicate sample of two experiments.

To more firmly ascertain that Pyk2 was involved in phosphorylating Tyr407, we realised experiments in which we measured the VEGF-mediated phosphorylation of Tyr407 in HUVEC expressing a wild-type form (wt) or a Tyr402 phosphorylation-deficient mutant form of Pyk2 (Tyr402Phe) following adenoviral gene transfer (Melendez et al., 2004). We first determined the amount of adenovirus required for optimal expression of both forms of Pyk2 by infecting the cells with increasing quantities of viruses. We found that 15 μ l (6×10^5 PFU) was the volume of virus that yields the best expression and the best VEGF-induced activation of Pyk2 without conferring any observable toxic effect (**Figure 7A**). In fact, this volume of virus corresponds to a MOI of 1.2 PFU/ cells, which is compatible to the infection rate of >90% that we found in fluorescence microscopy (**supplemental data 1**). As expected, VEGF did not induce the phosphorylation of Pyk2 at any concentration of viruses expressing the mutant Tyr402Phe. We next investigated the involvement of Pyk2 in contributing to phosphorylate FAK on Tyr407. HUVEC were infected with viruses carrying the wt form of Pyk2 or the mutant Pyk2 (Tyr402Phe). Then, the phosphorylation of Tyr407 was evaluated. Results showed that the VEGF-induced phosphorylation of Tyr407 was increased in cells expressing wt-Pyk2 and inhibited in cells expressing the non-phosphorylatable Tyr402Phe mutant (**Figure 7B**). Similarly, we found that the knockdown of Pyk2 with siRNAs (smart pools from Dharmacon that target human Pyk2 mRNA) was associated with a marked decrease in the phosphorylation of FAK on Tyr407 (**Figure 7C**). To determine whether the Pyk2-mediated phosphorylation of Tyr407 within FAK was direct, we proceed to a direct in vitro kinase assay. In this assay, purified activated Pyk2 was incubated with a synthetic Tyr407 peptide EIIDEEDTY407TMPSTRD or using the [GG(EEEEY)10EE] biotin conjugate peptide as a positive control. Thereafter, the phosphorylation of Tyr407 within the Tyr407FAK peptide and the poly Glu-Tyr peptide were evaluated in western blot. We found that activated Pyk2 induced the tyrosine phosphorylation of both peptides (**Figure 7D and 7E**). Overall, these findings are strong indications that Pyk2 contributes to directly phosphorylate FAK on Tyr407 in response to VEGF.

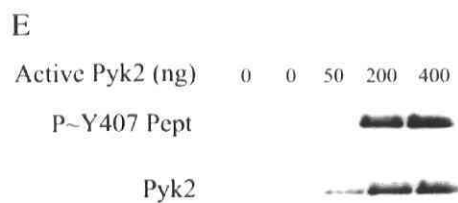
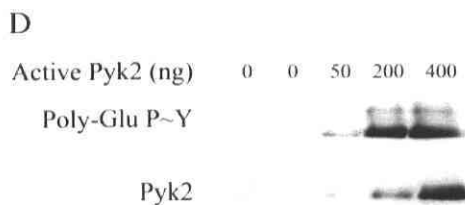
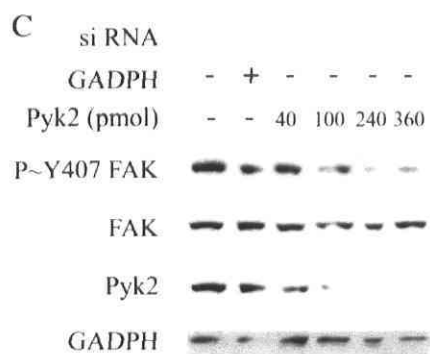
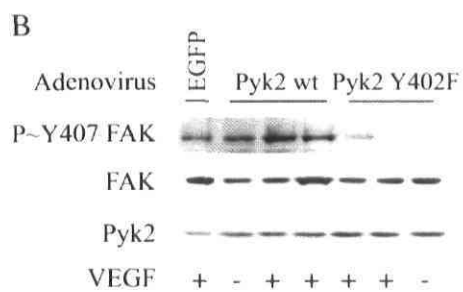
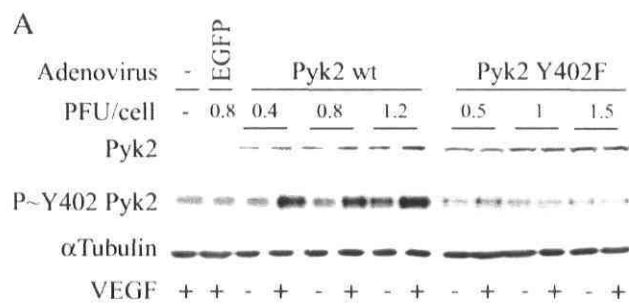


Figure 3-7 : Pyk2 mediates the phosphorylation of FAK on Tyr407 in response to VEGF.

(A) Exponentially growing HUVEC were infected or not with increasing quantity of adenoviral vectors carrying EGFP, wild type Pyk2 or mutant Pyk2 Tyr402Phe. Twenty-four hour later, the medium was changed for serum-free medium and grown for 16 h. Quiescent cells were then treated or not with VEGF (5ng/ml) for 10 min. Proteins were extracted, run into SDS-PAGE, and transferred on nitrocellulose membrane. Immunodetections with mouse anti-Pyk2, rabbit anti-P~Y402-Pyk2 and mouse anti- α -tubulin are shown. (B) Exponentially growing HUVEC were infected with adenoviral vector carrying EGFP (0.8 PFU/cell), wild type Pyk2 (1.2 PFU/cell) or mutant Pyk2 Tyr402Phe (1.2 PFU/cell) and were treated or not for 10 min with VEGF (5ng/ml). Then, proteins were processed as in A. Immunodetections with rabbit anti-P~Y407-FAK (upper panel), mouse anti-FAK (middle panel) and mouse anti-Pyk2 (lower panel) are shown. Representative autoradiograms from two separated experiments are shown. (C) Quiescent HUVEC were electroporated with siRNA that specifically targets GADPH mRNA or with increasing concentrations of siRNAs that specifically target Pyk2 mRNA (smart pools from Dharmacon). Forty-eight hours later, cells were treated for 10 min with 5ng/ml VEGF, and proteins were extracted. Proteins were separated by SDS-PAGE and transferred to a nitrocellulose membrane. The membrane was processed for immunodetection of phospho-Tyr FAK407, total FAK, Pyk2 or GADPH. (D-E) Direct *in vitro* kinase assay was performed using increasing amounts of constitutively active form of Pyk2 that was incubated with a poly Glu-Tyr peptide (D) or synthetic FAK-Tyr407 peptide (E) as substrates. Proteins were separated by Tris-tricine SDS-PAGE and transferred to a nitrocellulose membrane. The membrane was processed for immunodetection of phospho-Tyr407 within the FAK-Tyr407 peptide or phospho-Tyr (E) within the poly Glu-Tyr peptide (D).

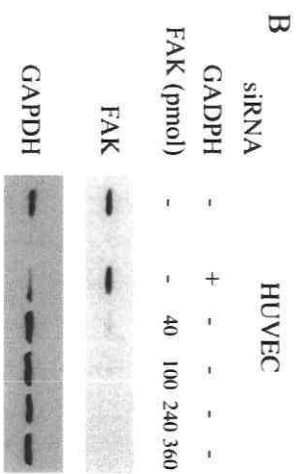
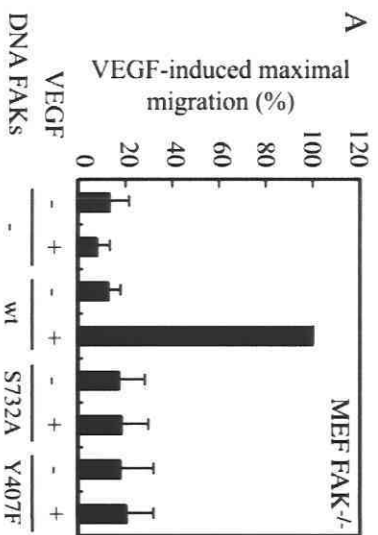
Phosphorylation of Ser732 and Tyr407 are required for cell migration in response to VEGF

We previously reported that the VEGFR2-HSP90 ROCK-axis is essential to trigger endothelial cell migration (Le Boeuf et al., 2004). This raised the possibility that the phosphorylation of Ser732 and Tyr407 was required to promote cell migration in response to VEGF. To proof this point, we first used a fibroblastic cell line that is null for FAK (FAK^{-/-}) (Ilic et al., 1995) and in which we transfected vectors expressing VEGFR2 along with vectors expressing FAK wt or the FAK mutants (FAK Ser732Ala and FAK Tyr407Phe). The cellular concentration of FAK is critical for cell migration since cells that adhere too strongly or too weakly do not migrate or migrate slowly (Palecek et al., 1997; Richardson et al., 1997). Hence, we first determined the concentration of FAK plasmids that induced maximal migration in response to VEGF using the Boyden Chamber assay. We found that cell migration in response to VEGF was maximally increased with FAK plasmids added in concentration between 1-2 μ g (**supplemental data 2**). Thereafter, we transfected FAK^{-/-} cells with 1 μ g of vectors expressing wt FAK or the same amount of the mutants FAK Ser732Ala or FAK Tyr407Phe together with 4 μ g of vector expressing VEGFR2. As expected, we found that cell migration was completely impaired in cells that expressed the mutants being in marked contrast with the 5-fold increase induced by VEGF in cells expressing wt form of FAK. Interestingly, at this concentration of plasmid, FAK does not promote cell migration by itself indicating that VEGF is required (**Figure 8A**). Given that MEF^{-/-} cells may differ from endothelial cells in their response to VEGF, we next electroporated HUVEC with siRNA to specifically target human FAK mRNA and knockdown endogenous FAK. In comparison, we used siRNA against GADPH as controls. Thereafter, we reintroduced siRNA-insensitive non-human wt form of FAK or the mutant forms Tyr407Phe or Ser 732Ala at the concentration of 1 μ g of vectors. After 48 hours, we proceeded to a cell migration assay in Boyden chamber using or not VEGF as chemoattractant in the lower chamber. Results showed that VEGF increased by 2.5 fold the migration of HUVEC in which we have re-introduced wt FAK. However, the migration remains to basal level in cells in which the mutant Ser732Ala or Tyr407Phe were added (**Figure 8B**). Interestingly, the siRNA against GADPH did not affect cell migration. It did

not affect either the expression of FAK, whereas the FAK siRNA almost completely impaired the expression of endogenous FAK (**Figure 8C**).

Given that ROCK I and Pyk2 were respectively required to directly phosphorylate Ser732 and Tyr407, we then decided to ascertain whether these kinases regulate endothelial cell migration. To proof this point, we still rely on the use of siRNA to knockdown ROCK1 or Pyk2 and then looked at the effect of VEGF on cell migration evaluated in Boyden chamber. As expected, we found that the knockdown of both kinases was associated with an inhibition of VEGF-induced cell migration (**Figure 8D**).

Overall, these findings highlight for the first time that the ROCK-mediated phosphorylation of Ser732 and Pyk2-mediated phosphorylation of Tyr407 are sequentially required to initiate cell migration in response to VEGF.



D

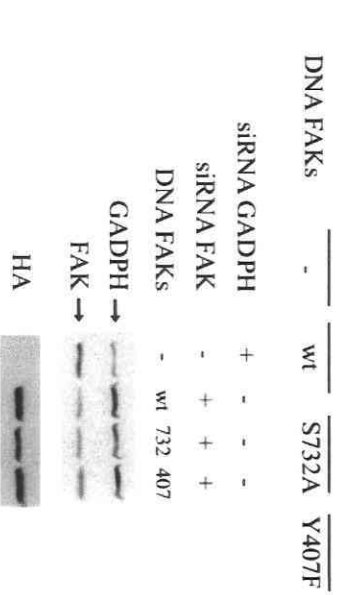
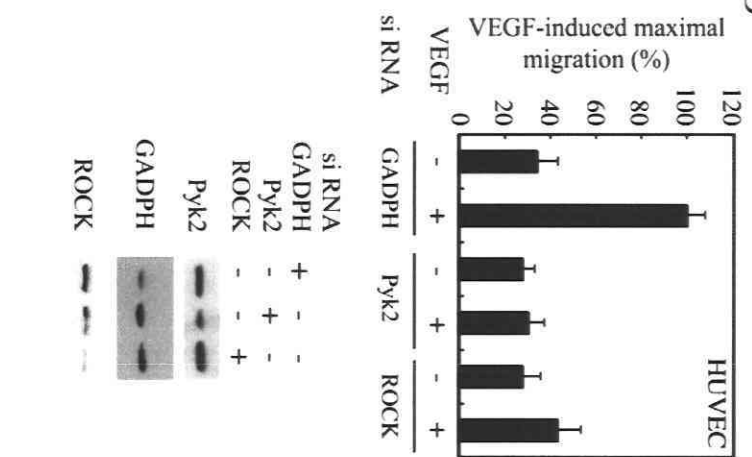


Figure 3-8 : Phosphorylation of Ser732 and Tyr407 are required for cell migration in response to VEGF.

(A) MEF FAK^{-/-} cells were transfected with 1 μ g of EGFP, wild type FAK (wt), FAK Ser732Ala (S732A) or FAK Tyr407Phe (Y407F) mutants, along with a constant concentration of VEGFR2 (4 μ g/ml). Then, the cells were processed as in A for a migration assay in a modified Boyden chamber. Data points represent the mean \pm SD of two separated experimentation in triplicate and duplicates. To monitor the expression of transfected FAK, MEF cells used for migration were processed for immunodetection of HA-FAK proteins (lower panel). (B) Quiescent HUVEC were electroporated with siRNA that specifically targets GADPH mRNA or with increasing concentrations of siRNA that specifically target human FAK mRNA (from Dharmacon). Forty-eight hours later, proteins were extracted, and were separated by SDS-PAGE and transferred to a nitrocellulose membrane. The membrane was processed for immunodetection of total FAK or GADPH. (C) Quiescent HUVEC were electroporated as above with siRNAs to knockdown human GADPH or FAK (40 pmoles siRNA). Thereafter, cells were transfected with 1 μ g of non-human forms of FAK, and were processed as in B for a migration assay in response to 5ng/ml VEGF using a modified Boyden chamber. Data points represent the mean \pm SD of triplicate samples. The efficacy of siRNA knockdowns was determined in Western blotting as in C (middle panel). To monitor the expression of transfected FAK, HUVEC used for migration were processed for immunodetection of HA-FAK proteins (lower panel). (D) Quiescent HUVEC were electroporated as above with GADPH (40 pmoles), Pyk2 or ROCK1 (360 pmoles each) siRNAs to knockdown the expression of human GADPH, Pyk2 or ROCK. Thereafter, the cells were processed as in A for a migration assay in a modified Boyden chamber. Data points represent the mean \pm SD of triplicate samples. The efficacy of siRNA knockdowns was determined in Western blotting as in C (lower panel). The results of cell migration are expressed as the % of maximal increase in cell migration induced by VEGF (mean number of transfected cells counted in controls = 10 cells). Similar results were obtained in two separate experiments.

3.2.6. DISCUSSION

Endothelial cell migration induced by VEGF requires its binding to VEGFR2 and the association of ligand-bound VEGFR2 with integrin $\alpha v\beta 3$ (Bernatchez et al., 1999; Soldi et al., 1999; Borges et al., 2000; Rousseau et al., 2000b; Masson-Gadais et al., 2003). The VEGF-VEGFR2/ $\alpha v\beta 3$ complex is then involved in initiating signals that activate various pathways including p38 and FAK. FAK is a non-receptor kinase whose activation is required to drive the cytoskeleton reorganization essential for cell migration (Rousseau et al., 2000b; Bohnsack and Hirschi, 2003; Parsons, 2003). The mechanisms by which FAK is activated to trigger cell migration by VEGF involve the phosphorylation of Tyr407 and Tyr576 (Holmqvist et al., 2004; Le Boeuf et al., 2004). However, the mechanisms that govern the phosphorylation of these residues are ill defined. In the present study, we show the first series of evidence indicating that the phosphorylation of FAK on Tyr407 relies on the activation of Pyk2 and is dependent on ROCK-mediated phosphorylation of FAK on Ser732.

We previously reported that phosphorylation of Tyr407 within FAK requires the activation of ROCK (Le Boeuf et al., 2004). However, the fact that ROCK (both ROCK I and ROCK II) has serine-threonine kinase activity indicates that it cannot directly phosphorylates Tyr407 within FAK. A major contribution of the present study is to show for the first time that ROCK directly phosphorylates FAK on Ser732 in response to VEGF. This is supported by the results of the immunocomplex kinase assays in which we found that VEGF induced the phosphorylation of Ser732 within FRNK by immunoprecipitated wt ROCK and that a constitutively active form of ROCK could phosphorylate Ser732. Moreover, similar results were obtained when using MLC as substrate. Given that MLC is a known target of ROCK, this finding confirms the suitability of the assay and the fact that VEGF activates ROCK. Overall, these results converge on the concept that ROCK can directly phosphorylate

Ser732 within FAK. This conclusion is further emphasized by our finding that ROCK can directly phosphorylate Ser732 within FRNK in a direct *in vitro* assay. Moreover, the *in vivo* relevance of ROCK in mediating phosphorylation of Ser732 is supported by the observations that the knockdown of ROCK I with siRNA is associated with an inhibition of the phosphorylation of FAK on Ser732 and of cell migration. Hence, based on our findings we believe that ROCK is the major kinase involved in phosphorylating directly Ser732 within FAK in response to VEGF. However, one cannot exclude the possibility that another kinase particularly cdk5 might also contribute to the direct phosphorylation of this site, as it does in neurons during corticogenesis (Xie et al., 2003). Of note, the various ROCK constructs that we used in our study express the ROCK I isoform, which supports the involvement of ROCK I in phosphorylating Ser732. However, the possible participation of ROCK II cannot be excluded.

Another important contribution of our study is to show that Ser732 within FAK should be phosphorylated to allow phosphorylation of FAK on Tyr407. In particular, the kinetics of activation of Ser732 and Tyr407 are comparable and are both inhibited by impairing HSP90-mediated events with geldanamycin and ROCK with Y27632. More directly, the fact that Ser732 should be phosphorylated prior to phosphorylation of Tyr407 is supported by the finding that expression of a non-phosphorylatable form of Ser732 (Ser732Ala) within FAK inhibits the phosphorylation of Tyr407 induced by VEGF, whereas expression of Tyr407Phe does not inhibit the phosphorylation of Ser732. We previously reported that phosphorylation of Tyr407 is required for the assembly of focal adhesions. In accordance with the fact that Ser732 should be phosphorylated to allow phosphorylation of Tyr407, we found that the Ser732Ala mutant impairs the recruitment of vinculin to the ventral focal adhesions and that FAK Ser732Ala does not relocate to the ventral plaques. Overall, these results indicate that ROCK-dependent phosphorylation of Ser732 is essential to elicit phosphorylation of Tyr407 and P~Tyr407-mediated events, possibly by changing the conformation of FAK in a way that renders Tyr407 accessible to a tyrosine kinase. Interestingly, VEGF should induce a conformation change in FAK configuration to allow

its association with integrin $\alpha\beta 5$ (Eliceiri et al., 2002; Schaller, 2004). This finding constitutes a major paradigm in favor that VEGF regulates FAK function in a spatial fashion.

Pyk2, a member of the FAK family of nonreceptor protein kinase, has been proposed as a potential candidate to directly phosphorylate FAK on Tyr407 (Li et al., 1999; Nakamura et al., 2001). In fact, using an *in vitro* kinase assay, we found that a constitutive active form of Pyk2 can directly phosphorylate Tyr407 within a synthetic FAK peptide. Moreover, the siRNA knockdown of Pyk2 is associated with an inhibition of FAK phosphorylation on Tyr407 *in vivo*. In line with these findings indicating that Pyk2 is a kinase directly upstream of Tyr407, we found that VEGF induces the phosphorylation of Pyk2 on its autophosphorylation site Tyr402, and that this occurs within the same time frame as phosphorylation of Tyr407 within FAK. However, the VEGF-induced phosphorylation of Tyr402 within Pyk2 is not sensitive to geldanamycin, Y27632 or SU6656 indicating that it is independent of HSP90, ROCK, or Src kinases. The discovery that activation of Pyk2 is independent of HSP90 and ROCK is a strong indication that the activation of Pyk2 does not directly emanate from the same VEGFR2 signaling pathway that phosphorylates Ser732. VEGFR2 signaling requires its association with integrin $\alpha\beta 3$ (Soldi et al., 1999; Borges et al., 2000; Byzova et al., 2000; Masson-Gadais et al., 2003). Moreover, $\alpha\beta 3$ ligation induces phosphorylation of Pyk2 on Tyr402 and favors its association with the cytoplasmic tail of $\beta 3$ in K562 leukocytes adhering to vitronectin (Butler and Blystone, 2005). Hence, activation of Pyk2 may derive from integrin $\alpha\beta 3$. Accordingly, Pyk2 is recruited to integrin $\beta 3$ and FAK following exposure of HUVEC to VEGF. Most importantly, we obtained direct evidence that activation of Pyk2 by VEGF derives from integrin $\alpha\beta 3$. Indeed, P-Tyr402 on Pyk2 is found at low levels in endothelial cells maintained in suspension, a condition that precludes clustering of integrins (Germer et al., 1998; Stupack et al., 1999). In contrast, the specific clustering and activation of integrin $\alpha\beta 3$ by treating HUVEC in suspension with the peptide DEL-1 (Penta et al., 1999) is followed by the recruitment of Pyk2 to integrin $\beta 3$ and is associated with an increase in the level of tyrosine

phosphorylation of its Tyr402. Moreover, both effects are further increased by co-exposure of cells to VEGF and DEL-1, whereas they remain at basal level in the presence of VEGF alone. Interestingly, the DEL-1 peptide-mediated clustering of integrin $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ and recruitment and activation of Pyk2 is not sufficient by itself to increase the phosphorylation of Tyr407 within FAK. However, phosphorylation of Tyr407 is increased when the cells are treated by both DEL-1 and VEGF, which is consistent with the aforementioned possibility that the VEGFR2-dependent activation of Ser732 is required to induce a conformational change that renders Tyr407 accessible to activated Pyk2.

Phosphorylation of Ser732 and Tyr407 within FAK has both been associated with increased cell migration in neuron and during epithelial mesenchymal transdifferentiation (Nakamura et al., 2001; Xie et al., 2003). However, our study is the first to bring direct evidence that the phosphorylation of both Ser732 and Tyr407 are essential for endothelial cell migration induced by VEGF. This is supported first by the observation that the expression of Ser732Ala and Tyr407Phe mutants of FAK in FAK MEF $-/-$ cells or in HUVEC depleted of FAK by means of siRNA does not promote cell migration in response to VEGF, in contrast to the expression of the wt form of FAK. Second, this is also supported by our findings that the knockdowns of ROCK I or Pyk2, the kinases respectively responsible for the phosphorylation of Ser732 and Tyr407 respectively, are also associated with an inhibition of VEGF-induced cell migration. Interestingly, neither the Ser732Ala nor the Tyr407Phe mutants had modified the autophosphorylation of FAK on Tyr397, which excludes the possibility that the effect of these mutants on cell migration results from an inhibition of the phosphorylation of FAK on Tyr397. In this context, it was previously reported that the kinase activity of FAK and its phosphorylation on Tyr397 are both independent of phosphorylation of Ser732 (Xie et al., 2003). Given that the phosphorylation of Ser732 depends on signaling events initiated by the activation of VEGFR2-HSP90-ROCK pathway, these results are important, since they explain why this pathway is essential for cell migration (Le Boeuf et al., 2004). In addition, the observation suggesting that the phosphorylation of Ser732 induces a conformational change that is

necessary to trigger the phosphorylation of Tyr407 through activated Pyk2 explains why phosphorylation of Tyr407 is also essential for cell migration. Incidentally, the fact that phosphorylation of Tyr407 requires the activation of Pyk2 might explain why the integrin and chemokine-stimulated motility is impaired in macrophages that are defective in Pyk2, and that the inhibition is not compensated by FAK expression (Okigaki et al., 2003; Mitra et al., 2005). The result is also consistent with previous results showing that Pyk2 is a regulator of VEGF-induced cell migration (Avraham et al., 2003). However, a recent report shows that Pyk2 is not involved in mediating LPA-induced increased cell migration of intestinal epithelial cells IEC-6 and IEC-18 grown on fibronectin (Jiang et al., 2006). A possible explanation is that the LPA receptor does not associate with $\alpha\beta3$ integrin to concur to activation of Pyk2 in response to VEGF.

Overall, the results of our study indicate that the VEGF-induced endothelial cell migration requires integrin $\alpha\beta3$ -dependent Pyk2-mediated phosphorylation of FAK on Tyr407, an event that requires appropriate conformational change induced in FAK by VEGFR2-mediated phosphorylation of Ser732 by ROCK.

3.2.7. Acknowledgements

We thank Dr. Josée N. Lavoie (Université Laval, Québec) for her help in setting up the ROCK in-vitro kinase assay, Dr. Naromiya for the ROCK constructs (Kyoto, Japan) and Dr. Dusko Ilic (UCSF) for the MEF FAK^{-/-} cells. We also thank Dr Jun-Lin Guan (Cornell University, NY) for providing the human wt-HA-FAK cDNA, Drs Zhigang Xie and Li-Huei Tsai (Harvard University, Boston) for FAK S732A and FAK-GST constructs and Dr Mark Sussman (San Diego State University Heart Institute, San Diego) for adenoviral Pyk2 constructs. We thank Drs Darren Richard (Université Laval, Québec) and Martin Sirois (Institut de Cardiologie de Montréal, Canada) for providing Bovine Aortic endothelial cells. Dr. Darren Richard also provided us with the siRNA to target GADPH mRNA and with the porcine anti GADPH antibody. Finally, we thank Dr. Jean-Philippe Gratton (IRCM, Montréal) for critically reading the manuscript.

This work was supported by The Canadian Institutes for Health Research: Grant MOP 15402. Fabrice Le Boeuf holds a studentship from FRSQ.

3.2.8. References

Abedi, H., and Zachary, I. (1997). Vascular endothelial growth factor stimulates tyrosine phosphorylation and recruitment to new focal adhesions of focal adhesion kinase and paxillin in endothelial cells. *J Biol Chem* 272, 15442-15451.

Abu-Ghazaleh, R., Kabir, J., Jia, H., Lobo, M., and Zachary, I. (2001). Src mediates stimulation by vascular endothelial growth factor of the phosphorylation of focal adhesion kinase at tyrosine 861, and migration and anti-apoptosis in endothelial cells. *Biochem J* 360, 255-264.

Avraham, H.K., Lee, T.H., Koh, Y., Kim, T.A., Jiang, S., Sussman, M., Samarel, A.M., and Avraham, S. (2003). Vascular endothelial growth factor regulates focal adhesion assembly in human brain microvascular endothelial cells through activation of the focal adhesion kinase and related adhesion focal tyrosine kinase. *J Biol Chem* 278, 36661-36668. Epub 32003 Jul 36663.

Bernatchez, P.N., Soker, S., and Sirois, M.G. (1999). Vascular endothelial growth factor effect on endothelial cell proliferation, migration, and platelet-activating factor synthesis is Flk-1-dependent. *J Biol Chem* 274, 31047-31054.

Bohnsack, B.L., and Hirschi, K.K. (2003). The FAKs about blood vessel assembly. *Circ Res* 92, 255-257.

Borges, E., Jan, Y., and Ruoslahti, E. (2000). PDGF-receptor-(beta) and EGF-receptor-2 bind to the (beta)3 integrin through its extracellular domain. *J Biol Chem*.

Butler, B., and Blystone, S.D. (2005). Tyrosine phosphorylation of beta3 integrin provides a binding site for Pyk2. *J Biol Chem* 280, 14556-14562.

Byzova, T.V., Kim, W., Midura, R.J., and Plow, E.F. (2000). Activation of integrin alpha(V)beta(3) regulates cell adhesion and migration to bone sialoprotein. *Exp Cell Res* 254, 299-308.

- Calalb, M.B., Polte, T.R., and Hanks, S.K. (1995). Tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase at sites in the catalytic domain regulates kinase activity: a role for Src family kinases. *Mol Cell Biol* 15, 954-963.
- Cornillon, J., Campos, L., and Guyotat, D. (2003). [Focal adhesion kinase (FAK), a multifunctional protein]. *Med Sci (Paris)* 19, 743-752.
- Dikic, I., Dikic, I., and Schlessinger, J. (1998). Identification of a new Pyk2 isoform implicated in chemokine and antigen receptor signaling. *J Biol Chem* 273, 14301-14308.
- Eliceiri, B.P., Puente, X.S., Hood, J.D., Stupack, D.G., Schlaepfer, D.D., Huang, X.Z., Sheppard, D., and Cheresch, D.A. (2002). Src-mediated coupling of focal adhesion kinase to integrin alpha(v)beta5 in vascular endothelial growth factor signaling. *J Cell Biol* 157, 149-160.
- Germer, M., Kanse, S.M., Kirkegaard, T., Kjoller, L., Felding-Habermann, B., Goodman, S., and Preissner, K.T. (1998). Kinetic analysis of integrin-dependent cell adhesion on vitronectin--the inhibitory potential of plasminogen activator inhibitor-1 and RGD peptides. *Eur J Biochem* 253, 669-674.
- Guan, J.L., Trevithick, J.E., and Hynes, R.O. (1991). Fibronectin/integrin interaction induces tyrosine phosphorylation of a 120-kDa protein. *Cell Regul* 2, 951-964.
- Holmqvist, K., Cross, M.J., Rolny, C., Hagerkvist, R., Rahimi, N., Matsumoto, T., Claesson-Welsh, L., and Welsh, M. (2004). The adaptor protein Shb binds to tyrosine 1175 in the VEGFR-2 and regulates VEGF-dependent cellular migration. *J Biol Chem* 16, 16.
- Huot, J., Houle, F., Marceau, F., and Landry, J. (1997). Oxidative stress-induced actin reorganization mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase/heat shock protein 27 pathway in vascular endothelial cells. *Circ Res* 80, 383-392.
- Huot, J., Houle, F., Rousseau, S., Deschesnes, R.G., Shah, G.M., and Landry, J. (1998). SAPK2/p38-dependent F-actin reorganization regulates early membrane blebbing during stress-induced apoptosis. *J Cell Biol* 143, 1361-1373.

Ilic, D., Furuta, Y., Kanazawa, S., Takeda, N., Sobue, K., Nakatsuji, N., Nomura, S., Fujimoto, J., Okada, M., and Yamamoto, T. (1995). Reduced cell motility and enhanced focal adhesion contact formation in cells from FAK-deficient mice. *Nature* 377, 539-544.

Ishizaki, T., Naito, M., Fujisawa, K., Maekawa, M., Watanabe, N., Saito, Y., and Narumiya, S. (1997). p160ROCK, a Rho-associated coiled-coil forming protein kinase, works downstream of Rho and induces focal adhesions. *FEBS Lett* 404, 118-124.

Jiang, X., Jacamo, R., Zhukova, E., Sinnett-Smith, J., and Rozengurt, E. (2006). RNA interference reveals a differential role of FAK and Pyk2 in cell migration, leading edge formation and increase in focal adhesions induced by LPA in intestinal epithelial cells. *J Cell Physiol*.

Kornberg, L., Earp, H.S., Parsons, J.T., Schaller, M., and Juliano, R.L. (1992). Cell adhesion or integrin clustering increases phosphorylation of a focal adhesion-associated tyrosine kinase. *J Biol Chem* 267, 23439-23442.

Lamallice, L., Houle, F., Jourdan, G., and Huot, J. (2004). Phosphorylation of tyrosine 1214 on VEGFR2 is required for VEGF-induced activation of Cdc42 upstream of SAPK2/p38. *Oncogene* 23, 434-445.

Le Boeuf, F., Houle, F., and Huot, J. (2004). 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* 279, 39175-39185. Epub 32004 Jul 39176.

Li, X., Dy, R.C., Cance, W.G., Graves, L.M., and Earp, H.S. (1999). Interactions between two cytoskeleton-associated tyrosine kinases: calcium-dependent tyrosine kinase and focal adhesion tyrosine kinase. *J Biol Chem* 274, 8917-8924.

Masson-Gadais, B., Houle, F., Laferriere, J., and Huot, J. (2003). Integrin alphavbeta3, requirement for VEGFR2-mediated activation of SAPK2/p38 and for Hsp90-dependent phosphorylation of focal adhesion kinase in endothelial cells activated by VEGF. *Cell Stress Chaperones* 8, 37-52.

Matsumoto, T., and Claesson-Welsh, L. (2001). VEGF receptor signal transduction. *Sci STKE* 2001, RE21.

Matsumura, F. (2005). Regulation of myosin II during cytokinesis in higher eukaryotes. *Trends Cell Biol* 15, 371-377.

Melendez, J., Turner, C., Avraham, H., Steinberg, S.F., Schaefer, E., and Sussman, M.A. (2004). Cardiomyocyte apoptosis triggered by RAFTK/pyk2 via Src kinase is antagonized by paxillin. *J Biol Chem* 279, 53516-53523.

Mitra, S.K., Hanson, D.A., and Schlaepfer, D.D. (2005). Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 56-68.

Nakamura, K., Yano, H., Schaefer, E., and Sabe, H. (2001). Different modes and qualities of tyrosine phosphorylation of Fak and Pyk2 during epithelial-mesenchymal transdifferentiation and cell migration: analysis of specific phosphorylation events using site-directed antibodies. *Oncogene* 20, 2626-2635.

Neagoe, P.E., Lemieux, C., and Sirois, M.G. (2005). Vascular endothelial growth factor (VEGF)-A165-induced prostacyclin synthesis requires the activation of VEGF receptor-1 and -2 heterodimer. *J Biol Chem* 280, 9904-9912.

Okigaki, M., Davis, C., Falasca, M., Harroch, S., Felsenfeld, D.P., Sheetz, M.P., and Schlessinger, J. (2003). Pyk2 regulates multiple signaling events crucial for macrophage morphology and migration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 10740-10745.

Owen, J.D., Ruest, P.J., Fry, D.W., and Hanks, S.K. (1999). Induced focal adhesion kinase (FAK) expression in FAK-null cells enhances cell spreading and migration requiring both auto- and activation loop phosphorylation sites and inhibits adhesion-dependent tyrosine phosphorylation of Pyk2. *Mol Cell Biol* 19, 4806-4818.

Palecek, S.P., Loftus, J.C., Ginsberg, M.H., Lauffenburger, D.A., and Horwitz, A.F. (1997). Integrin-ligand binding properties govern cell migration speed through cell-substratum adhesiveness. *Nature* 385, 537-540.

Parsons, J.T. (2003). Focal adhesion kinase: the first ten years. *J Cell Sci* 116, 1409-1416.

Penta, K., Varner, J.A., Liaw, L., Hidai, C., Schatzman, R., and Quertermous, T. (1999). Dell induces integrin signaling and angiogenesis by ligation of alphaVbeta3. *J Biol Chem* 274, 11101-11109.

Petitclerc, E., Stromblad, S., von Schalscha, T.L., Mitjans, F., Piulats, J., Montgomery, A.M., Cheresch, D.A., and Brooks, P.C. (1999). Integrin alpha(v)beta3 promotes M21 melanoma growth in human skin by regulating tumor cell survival. *Cancer Res* 59, 2724-2730.

Richardson, A., Malik, R.K., Hildebrand, J.D., and Parsons, J.T. (1997). Inhibition of cell spreading by expression of the C-terminal domain of focal adhesion kinase (FAK) is rescued by coexpression of Src or catalytically inactive FAK: a role for paxillin tyrosine phosphorylation. *Mol Cell Biol* 17, 6906-6914.

Rousseau, S., Houle, F., and Huot, J. (2000a). Integrating the VEGF Signals Leading to Actin-Based Motility in Vascular Endothelial Cells. *Trends Cardiovasc Med* 10, 321-327.

Rousseau, S., Houle, F., Kotanides, H., Witte, L., Waltenberger, J., Landry, J., and Huot, J. (2000b). 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* 275, 10661-10672.

Rousseau, S., Houle, F., Landry, J., and Huot, J. (1997). p38 MAP kinase activation by vascular endothelial growth factor mediates actin reorganization and cell migration in human endothelial cells. *Oncogene* *15*, 2169-2177.

Schaller, M.D. (2004). FAK and paxillin: regulators of N-cadherin adhesion and inhibitors of cell migration? *J Cell Biol* *166*, 157-159.

Schlaepfer, D.D., Hauck, C.R., and Sieg, D.J. (1999). Signaling through focal adhesion kinase. *Prog Biophys Mol Biol* *71*, 435-478.

Soldi, R., Mitola, S., Strasly, M., Defilippi, P., Tarone, G., and Bussolino, F. (1999). Role of alphavbeta3 integrin in the activation of vascular endothelial growth factor receptor-2. *Embo J* *18*, 882-892.

Stupack, D.G., Li, E., Silletti, S.A., Kehler, J.A., Geahlen, R.L., Hahn, K., Nemerow, G.R., and Cheresh, D.A. (1999). Matrix valency regulates integrin-mediated lymphoid adhesion via Syk kinase. *J Cell Biol* *144*, 777-788.

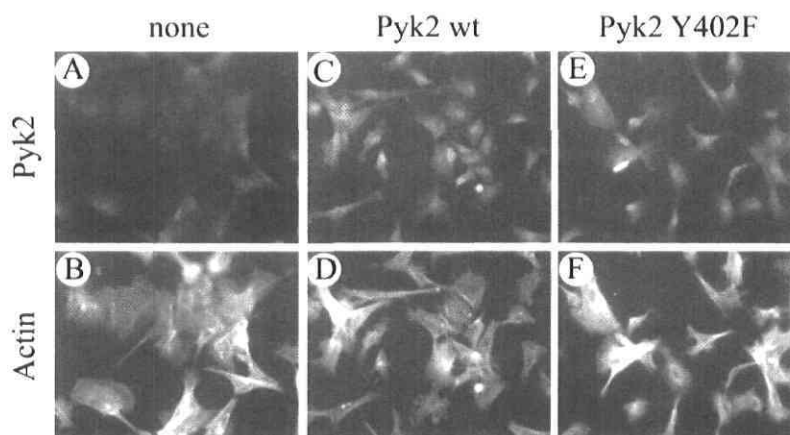
Totsukawa, G., Yamakita, Y., Yamashiro, S., Hartshorne, D.J., Sasaki, Y., and Matsumura, F. (2000). Distinct roles of ROCK (Rho-kinase) and MLCK in spatial regulation of MLC phosphorylation for assembly of stress fibers and focal adhesions in 3T3 fibroblasts. *J Cell Biol* *150*, 797-806.

Wang, Q., Xie, Y., Du, Q.S., Wu, X.J., Feng, X., Mei, L., McDonald, J.M., and Xiong, W.C. (2003). Regulation of the formation of osteoclastic actin rings by proline-rich tyrosine kinase 2 interacting with gelsolin. *J Cell Biol* *160*, 565-575.

Xie, Z., Sanada, K., Samuels, B.A., Shih, H., and Tsai, L.H. (2003). Serine 732 phosphorylation of FAK by Cdk5 is important for microtubule organization, nuclear movement, and neuronal migration. *Cell* *114*, 469-482.

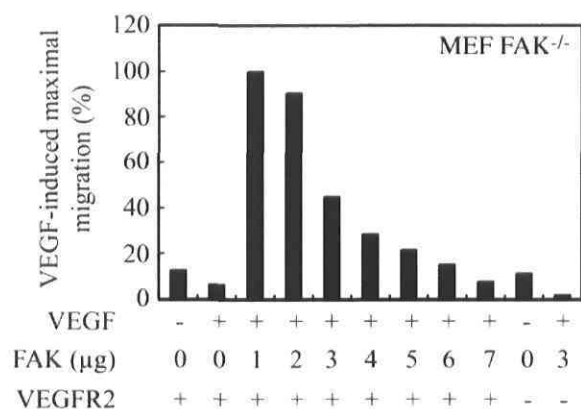
Xie, Z., and Tsai, L.H. (2004). Cdk5 phosphorylation of FAK regulates centrosome-associated microtubules and neuronal migration. *Cell Cycle* *3*, 108-110.

3.2.9. Supplemental data



Supplemental Data 1

Adenoviruses carrying Pyk2 and Pyk2 Tyr402Phe is expressed in more than 90% of the cells. Exponentially growing HUVEC were infected or not (A, B) with adenoviral vectors (1.2 PFU/cell) carrying wild type Pyk2 (C, D) or mutant Pyk2 Tyr402Phe (E, F). Twenty-four hours later, medium was changed for serum-free medium and the cells were grown for 16 h. Then, cells were fixed, permeabilized, and stained for Pyk2 detection (A, C, E) using an anti-Pyk2 antibody and an anti-mouse IgG-Alexa 568 for revelation. Actin (B, D, F) was detected using FITC-phalloidin.



Supplemental Data 2

Modulation of VEGF-induced cell migration by transfection of various concentration of FAK plasmid. MEF FAK^{-/-} cells were transfected with increased concentration of FAK wild type cDNA with or without a constant concentration of VEGFR2 (4μg/ml). Forty-eight hours after infection, cells were plated on the upper part of a gelatinized polycarbonate membrane in a modified Boyden chamber and left to adhere for 1 h. Then, VEGF (10 ng/ml) was added or not in the lower chamber. Subsequently, the cells were allowed to migrate for 2 hours. After treatments, the cells on the upper part of the membrane were scraped and cells on the lower part were stained with Meyer's Hematoxylin and were counted under an inverted microscope.

Chapitre 4

Discussion générale

4. Discussion générale

L'angiogenèse, la formation de nouveaux vaisseaux à partir de vaisseaux préexistants, est un processus nécessaire à la progression du cancer. En effet, les cellules cancéreuses, en réponse à un stress hypoxique secrètent différents facteurs de croissances dont le VEGF qui vont activer les cellules endothéliales. Ces dernières, sous l'effet de ces facteurs de croissance, vont proliférer puis migrer de manière directionnelle en fonction du gradient de concentration des facteurs angiogéniques. Il en résultera la formation d'un nouveau vaisseau sanguin, apte à alimenter les cellules cancéreuses. Une partie des recherches actuelles en cancérologie a comme objectif de mieux comprendre les événements impliqués dans la migration des cellules endothéliales afin de développer des thérapies antiangiogéniques. Les récepteurs de facteurs de croissance et les protéines impliquées dans la conduction des signaux qui émanent de leur activation dans les cellules endothéliales et qui conduisent à la migration sont des cibles potentielles pour les thérapies antiangiogéniques à venir.

Les recherches réalisées et présentées dans cette thèse, précisent certains des événements moléculaires mis en jeu lors de la migration des cellules endothéliales activées par le VEGF. Plus précisément, nous avons identifié certaines des protéines régulatrices de la voie de la Kinase d'Adhérence Focale (FAK) et démontré comment elles régulent la migration cellulaire. Nous avons, entre autres, démontré que le signal du VEGF qui conduit à l'activation/phosphorylation de FAK emprunte deux voies complémentaires menant à la migration cellulaire des cellules endothéliales. Une figure récapitulative des résultats permettant au lecteur de faciliter la compréhension est présentée en **figure 4-1**.

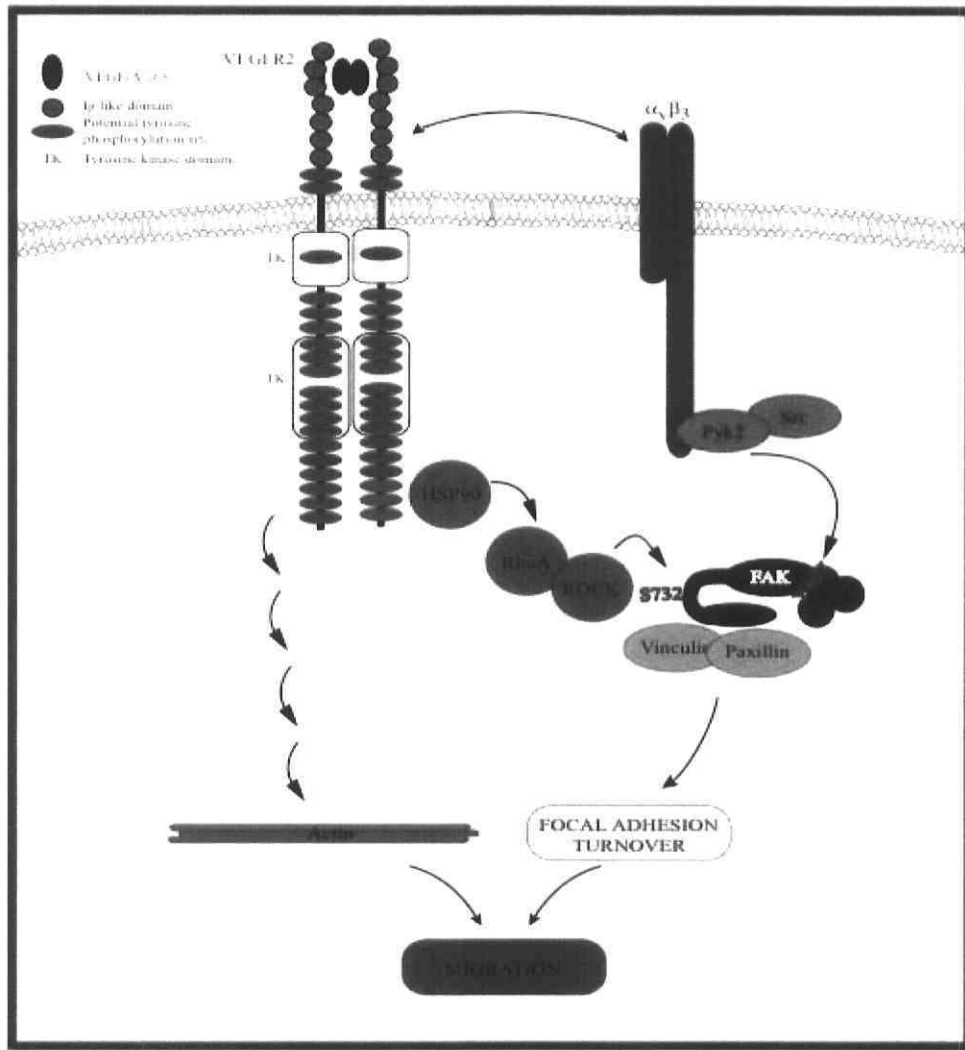


Figure 4-1 : Modèle de travail

Le VEGF-A165 fixe le VEGFR2 présent à la surface des cellules endothéliales et active différentes voies signalétiques conduisant à la polymérisation des fibres d'actine, au turnover des points focaux d'adhérence et à la migration cellulaire. Nous avons montré que HSP90 interagit avec la partie C-terminale de VEGFR2 en réponse au VEGF et que cela induit l'activation de RhoA et ROCK. Nous avons également montré que l'activation de ROCK conduit à la phosphorylation de la sérine 732 de FAK ce qui contribue à un changement de conformation de la protéine démasquant le site tyrosine 407 le rendant ainsi accessible à PYK2. La phosphorylation de la tyrosine 407 contribue alors à la migration cellulaire en réponse au VEGF.

4.1. La voie VEGFR2-HSP90-RhoA-ROCK

Une contribution majeure de cette thèse a été de déterminer que FAK est activée en réponse au VEGF via deux voies distinctes. La première voie de signalisation est directement dépendante du VEGFR2 et implique l'activation des protéines RhoA et ROCK, via HSP90. En effet, nous avons observé que seulement certains sites de phosphorylation de FAK comme le site tyrosine 407 sont sensibles à la geldanamycine, un inhibiteur spécifique de HSP90. Dans ce contexte, nous avons cherché à déterminer la kinase intermédiaire entre HSP90 et la phosphorylation du site Y407 de FAK. Nous avons donc utilisé différents inhibiteurs de kinase et, nous avons déterminé que l'inhibiteur de la kinase dépendante de RhoA, le Y27632, conduit à l'inhibition de la phosphorylation du site tyrosine 407 de FAK. De plus des dominants négatifs de RhoA et ROCK empêchent également la phosphorylation du site 407. Nos résultats suggèrent donc que la phosphorylation du résidu tyrosine 407 de FAK s'effectue en aval de la séquence VEGFR2-HSP90-RhoA-ROCK de FAK. Cependant, la kinase ROCK est une sérine/thréone kinase et ne possède aucune potentialité pour phosphoryler un site tyrosine. Comme nous le verrons plus en détail dans le paragraphe suivant, la cible de la voie VEGFR2-HSP90-RhoA-ROCK correspond au site sérine 732 de FAK. En fait, nous avons démontré que la kinase ROCK phosphoryle le site sérine 732 de FRNK, un peptide de FAK, en essais kinases *in vitro*. Il est important de noter que ces expériences ont été réalisées en utilisant des constructions de ROCKI ce qui met en évidence le rôle de ROCKI dans la phosphorylation du site sérine 732. Il n'est cependant pas à exclure la participation de ROCKII dans la phosphorylation de ce même site sérine. En effet, il a été montré qu'il existait une certaine redondance dans la fonction des deux isoformes de ROCK (Yoneda, Multhaupt et al. 2005). En fait, nous avons pu observé que ROCKII, tout comme ROCKI, est capable de phosphoryler le résidu sérine 732 de FAK de manière directe en essai *in-vitro*.

4.1.1. Le rôle de HSP90

HSP90 est une molécule chaperonne possédant de très nombreuses cibles signalétiques. Il a été démontré que HSP90 interagit avec le VEGFR2. En effet, en réponse au VEGF, la concentration en HSP90 est augmentée sur le VEGFR2. De plus, nous avons déterminé que la partie c-terminale du VEGFR2 est importante pour cette interaction. En effet, si nous utilisons une construction du VEGFR2 délétée dans sa partie c-terminale au niveau de ses 130 derniers acides aminés, l'interaction HSP90/VEGFR2 est perdue. Les 130 derniers acides aminés en c-terminale du récepteur jouent un rôle important dans la régulation de l'activité de FAK par le VEGFR2: si cette portion est délétée, non seulement HSP90 n'interagit plus avec le récepteur mais la phosphorylation de FAK sur au moins un site tyrosine (le résidu tyrosine 407) est inhibée et, la migration des cellules endothéliales inexistante. En effet, la forme de VEGFR2 inapte à recruter HSP90 (le $\Delta 130$ VEGFR2) conduit à l'inhibition de la phosphorylation du site tyrosine 407 de FAK normalement induite en réponse au VEGF dans les cellules endothéliales. Le rôle précis de HSP90 dans la signalisation émanant du VEGFR2 reste cependant encore à préciser. Il est possible que HSP90 joue un rôle clé dans le maintien d'une structure tridimensionnelle adéquate du récepteur lui permettant d'initier la signalisation vers les protéines RhoA et ROCK jusqu'à la phosphorylation de FAK. Une autre possibilité pourrait être l'implication de HSP90 au niveau d'un facteur d'échange d'un GDP en GTP au niveau de la petite GTPase RhoA et ainsi permettant l'activation de la voie ROCK. Par ailleurs, il a été observé que HSP90 est phosphorylée sur résidus tyrosine en réponse au VEGF. Le rôle de cette phosphorylation de HSP90 est inconnu mais est présumément impliquée dans l'internalisation de VEGFR2 et dans l'activation de eNOS (article en préparation Duval, Le Bœuf et al. 2006).

4.2. La voie $\alpha_v\beta_3$ -Src-Pyk2

La phosphorylation de certains sites tyrosines, comme le site tyrosine 861, est inhibée par la présence de l'inhibiteur spécifique des activités Src kinase, le PP2. Le VEGFR2 interagit avec l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ pour réguler la phosphorylation de FAK (Masson-Gadais, Houle et al. 2003). Les molécules de la famille Src ont été proposées pour phosphoryler le résidu tyrosine 861 de FAK dans le contexte d'une activation des cellules, lorsqu'elles sont en cours de réaliser leurs points focaux d'adhérence (Frame 2004). Dans ce contexte, nous avons observé que Src co-immunoprécipitait avec la sous unité β_3 de l'intégrine dans les cellules endothéliales en réponse au VEGF.

Une contribution importante de cette thèse est de suggérer que Pyk2, le seul autre membre de la famille des protéines kinase non récepteur hormis FAK, est une protéine clé dans la phosphorylation de FAK sur tyrosine 407. Dans la littérature, Pyk2 a déjà été suggéré comme pouvant être un candidat pour phosphoryler le résidu tyrosine 407 de FAK (Li, Dy et al. 1999; Nakamura, Yano et al. 2001). Dans ce contexte, nous avons montré que Pyk2 est phosphorylée sur son site activateur, le résidu tyrosine 402, en réponse au VEGF avec une cinétique proche de celle du résidus tyrosine 407. La phosphorylation de ce site tyrosine 402 n'est ni sensible à l'inhibiteur de HSP90, ni à celui de ROCK ou des kinase Src suggérant ainsi que l'activation de Pyk2 n'émane pas du même sentier signalétique que la phosphorylation du résidus 732 de FAK. Comme nous l'avons déjà signalé, VEGFR2 peut s'associer avec l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ (Soldi, Mitola et al. 1999; Borges, Jan et al. 2000; Byzova, Kim et al. 2000; Masson-Gadais, Houle et al. 2003) et, l'activation de Pyk2 sur tyrosine 402 est dépendant de la sous unité β_3 de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ (Butler and Blystone 2005). Dans ce contexte, nous avons observé que la concentration de protéines Pyk2 activée est augmentée sur β_3 en réponse au VEGF dans les cellules HUVEC. De plus, la phosphorylation de Pyk2 est surtout liée à l'engagement de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, alors que la phosphorylation de FAK sur tyrosine 407 doit obligatoirement impliquer l'engagement des intégrines $\alpha_v\beta_3$ et de l'activation du VEGFR2. Ce résultat s'accorde d'ailleurs avec le fait

que l'activation des intégrines $\alpha_v\beta_3$ et $\alpha_5\beta_1$ par des anticorps n'est pas suffisante pour conduire à la phosphorylation du résidu tyrosine 407 de FAK (Shi and Boettiger 2003).

4.3. Complémentarité des voies VEGFR2-HSP90-Rhoa-ROCK et $\alpha_v\beta_3$ -Src-Pyk2

L'identification des deux voies VEGFR2-HSP90-RhoA-ROCK et $\alpha_v\beta_3$ -Src-Pyk2 est une contribution majeure dans la connaissance des mécanismes de régulation de FAK par le VEGF. En fait, elle est à l'origine de la principale contribution de cette thèse qui est de suggérer, pour la première fois, un modèle de régulation intramoléculaire de FAK via l'implication d'un résidu sérine sur la phosphorylation d'un site tyrosine. En effet, la phosphorylation du résidu sérine 732 semble être un prérequis pour la phosphorylation du résidu tyrosine 407. Les cinétiques comparées de ces deux résidus en réponse au VEGF sont très proches et la phosphorylation de ces deux sites est fortement diminuée en présence des inhibiteurs de HSP90 et de ROCK. De manière plus directe, nous avons observé qu'un mutant ponctuel pour le site sérine 732 conduisait à une inhibition de la phosphorylation du site tyrosine 407 alors que l'inverse, un mutant ponctuel pour le résidu tyrosine 407 n'a aucune influence sur la phosphorylation du résidu sérine 732. Enfin, la phosphorylation des résidus sérine 732 et tyrosine 407 est impliquée dans la formation de points focaux d'adhérence au niveau des plaques ventrales des cellules endothéliales ainsi que dans la migration des cellules MEF FAK^{-/-}. Ces observations nous ont amené à élaborer le modèle proposé à la figure 9 de l'article soumis à la revue *The Molecular Biology of the Cell*, selon lequel nous proposons que l'activation du VEGFR2 par le VEGF favorise la formation d'un oligomère avec $\alpha_v\beta_3$. Cette oligomérisation est nécessaire à l'activation des deux récepteurs. Par la suite un signal émane de VEGFR2 qui conduit à l'activation de ROCK et à la phosphorylation du site sérine 732. Ceci amène un changement dans la configuration de FAK qui démasque le site tyrosine 407 qui devient alors accessible à la phosphorylation par la voie Pyk2 en aval de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. Ces résultats sont originaux et ouvrent de nouveaux horizons dans la compréhension des mécanismes de régulation de FAK.

Chapitre 5

Conclusion

5. Conclusions et perspectives

5.1. Conclusions générales

L'objectif de cette thèse était de préciser les mécanismes par lesquels HSP90 et l'association des récepteurs VEGFR2/intégrine $\alpha_v\beta_3$ régulent l'activation de FAK en réponse au facteur de croissance VEGF. Les résultats ont démontré qu'en réponse au VEGF, deux voies signalétiques sont activées. La première émane directement du VEGFR2, via HSP90-RhoA-ROCK. Le second sentier signalétique émane de l'oligomérisation du VEGFR2 avec l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ et active Src d'une part et Pyk2 d'autre part. Les kinases Src activées vont alors phosphoryler certains sites de FAK comme le résidu tyrosine 861. La voie HSP90 dépendante va aboutir à la phosphorylation directe du résidu 732 par la kinase ROCK. Cette phosphorylation conduit alors à un probable changement moléculaire de FAK qui rend le résidu tyrosine 407 accessible à la kinase Pyk2. Les résidus sérines 732 et tyrosine 407 ainsi que leurs voies signalétiques associées sont primordiaux pour la formation des points focaux d'adhérence et pour la migration cellulaire en réponse au facteur de croissance VEGF sécrété par les cellules cancéreuses.

5.2. Perspectives et orientations futures

Les résultats de cette thèse permettent d'ouvrir de nouvelles perspectives quant au rôle central de FAK dans la signalisation émanant du VEGFR2. Quatre ouvertures pourraient être approfondies :

- 1- Déterminer précisément le site d'interaction du VEGFR2 avec HSP90.
- 2- Confirmer le changement moléculaire qui s'opère dans la protéine FAK suite à la phosphorylation du résidu sérine 732.
- 3- Déterminer le rôle du résidu sérine 843 de FAK phosphorylable en réponse au VEGF.
- 4- Déterminer si la Proline-rich tyrosine kinase-2 (Pyk2) peut phosphoryler directement FAK sur son site Tyrosine 407.

5.2.1. Déterminer précisément le site d'interaction du VEGFR2 avec HSP90

Un résultat clé présenté dans cette thèse est le rôle central joué par HSP90 dans la signalisation émanant du VEGFR2. L'association de HSP90 avec le récepteur conduit à l'activation de la petite GTPase RhoA et de sa kinase associée ROCK aboutissant ainsi à la phosphorylation directe du résidu 732 de FAK. De plus, HSP90 est une protéine phosphorylée en réponse au VEGF. Nous avons montré que HSP90 interagit avec la partie c-terminal du récepteur. Comme mentionné dans la discussion générale, la fonction précise de HSP90 reste encore à déterminer. Il est possible que HSP90 joue un rôle crucial dans le maintien d'une structure tridimensionnelle adéquate du récepteur lui permettant d'initier la signalisation vers les protéines RhoA et ROCK jusqu'à la phosphorylation de FAK. Une autre possibilité pourrait être l'implication de HSP90 au niveau d'un facteur d'échange d'un GDP en GTP au niveau de la petite GTPase RhoA et ainsi permettant l'activation de la voie ROCK.

Dans un premier temps, il serait particulièrement intéressant de déterminer plus précisément le domaine ou résidu(s) du VEGFR2 qui permet d'interagir avec HSP90. En effet, la connaissance de ce domaine ou résidu(s) permettrait tout d'abord de mieux comprendre le fonctionnement de cette protéine chaperonne et, d'avoir potentiellement une cible afin de développer un outil thérapeutique bloquant la migration cellulaire.

Dans ce contexte, nous avons cherché à identifier des séquences intéressantes dans la partie c-terminale du VEGFR2, au niveau des 130 derniers acides aminés. Nous avons ainsi déterminé la présence de trois résidus tyrosines potentiellement intéressants dont le Y1319. Ces résidus tyrosines pourraient avoir une accessibilité et donc une phosphorylation dépendante de la chaperonne HSP90. Il est d'ailleurs à noter que cette partie c-terminale est particulièrement intéressante à plusieurs niveaux. En effet, nous avons pu remarquer que, non seulement, il existait différents résidus tyrosines mais, qu'un de ceux-ci, la tyrosine 1319, est l'équivalent d'un résidu tyrosine du VEGFR1 qui a été proposé être impliqué dans l'internalisation du récepteur (Kobayashi, Sawano et al. 2004). De plus, différentes

séquences comme une série de résidus lysine et une séquence DSG(X)_{n+2}S sont présents. Ce dernier motif est connu pour être la cible du complexe SFC^{βTrCP} qui est impliqué dans la polyubiquitination de protéines et donc dans la dégradation de celles-ci via le protéasome (Lang, Janzen et al. 2003). Ainsi, HSP90 est non seulement primordiale pour la signalisation du VEGFR2 conduisant à la phosphorylation de FAK mais pourrait également intervenir au niveau de l'internalisation et ou de la dégradation du récepteur.

5.2.2. Confirmer le changement moléculaire qui s'opère dans la protéine FAK suite à la phosphorylation du résidu sérine 732

Un résultat central de cette thèse est l'importante contribution au mode de fonctionnement intramoléculaire de FAK. En effet, nous avons pour la première fois montré que la phosphorylation du résidu sérine 732 de FAK par la kinase ROCK est nécessaire pour que le résidu tyrosine 407 soit également phosphorylé. Ce résultat suggère fortement l'existence d'un mécanisme intramoléculaire qui lorsque le résidu sérine 732 est phosphorylé, permet un changement de conformation de FAK qui conduit au démasquage du résidu tyrosine 407. Ce démasquage permet alors à la kinase Pyk2 activée par le VEGF, de phosphoryler le site tyrosine 407 de FAK. Schaller, dans une revue très récente, a représenté la molécule de manière bien plus complexe que la forme habituellement symbolisée (Schaller 2004). En effet, FAK est habituellement représentée de manière très simpliste sous une forme de rectangle allongée alors que Schaller l'a représentée sous une forme repliée dénotant ainsi le possible repliement/dépliement de la molécule (**figure 5-1**). À ce stade, il serait particulièrement intéressant de réaliser des études en cristallographie permettant de comprendre la structure globale de FAK suivant son état d'activation. À ce jour, seul le domaine FAT de FAK est connu en cristallographie montrant une structure complexe en hélices (Hayashi, Vuori et al. 2002).

Il serait de plus intéressant d'élargir cette observation en vérifiant si le changement intramoléculaire suivant l'état d'activation de FAK existe également dans d'autres types

cellulaires que les cellules endothéliales en réponse à d'autres facteurs d'activation ou, si cette observation est spécifique du VEGF. Déjà, nous savons que FAK est phosphorylée sur résidu sérine 732 dans les cellules neuronales et que cet événement est important pour la migration de ce type cellulaire suggérant ainsi que ce modèle de repliement/dépliement pourrait être élargi.

Enfin, une meilleure compréhension du rôle des résidus sérines dans l'activation de FAK pourrait aboutir à l'élaboration d'un modèle pouvant servir de base pour l'étude d'autres kinases possédant également des résidus sérines et tyrosines.

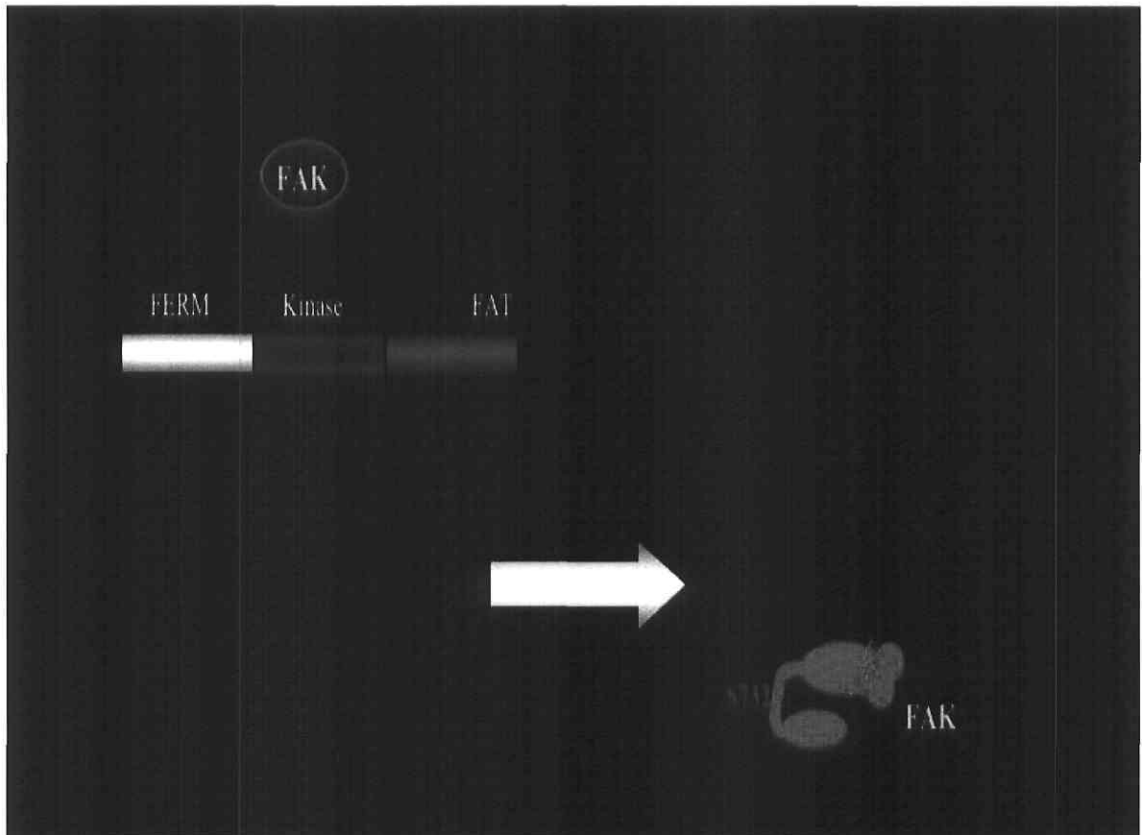


Figure 5-1 : Modèle montrant la complexification de représentation de la kinase FAK

La kinase d'adhérence focale est une protéine étudiée depuis plus de dix ans qui possède de nombreuses fonctions importantes dans la cellule. Tout d'abord représentée simplement, sa schématisation se complexifie de plus en plus au gré des nouvelles découvertes de son fonctionnement.

Adapté de (Schaller 2004)

5.2.3. Déterminer le rôle du résidu sérine 843 de FAK phosphorylable en réponse au VEGF

Lorsque nous avons commencé à étudier les résidus sérines de FAK, nous avons remarqué qu'il en existait quatre situés en c-terminal dont deux étaient phosphorylés en réponse au VEGF dans les cellules endothéliales. Les cinétiques de phosphorylation de ces deux résidus étaient différents et surtout, la phosphorylation du résidu 732 était inhibée alors que celle du 843 n'était en rien modifiée. À l'heure actuelle, la littérature ne fait que très peu référence au rôle de ce résidu sérine. Cependant, dans des cellules swiss 3T3, le résidu sérine 843 est phosphorylé et précède la phosphorylation du site d'autophosphorylation Y397 de FAK activé par la bombésine (Fan, Jacamo et al. 2005). Ainsi, ce site sérine pourrait être la cible d'une autre voie de signalisation émanant du VEGFR2. Cependant, il n'est pas à exclure que cette nouvelle voie d'activation émane du récepteur de manière indirecte par les corécepteurs du VEGFR2 que peuvent être les intégrines ou la neuropiline.

5.2.4. Déterminer si la Proline-rich tyrosine kinase-2 (Pyk2) peut phosphoryler directement FAK sur son site Tyrosine 407

Un résultat important présenté ici est d'avoir montré l'implication de la kinase Pyk2 dans la phosphorylation du résidu tyrosine 407 de FAK en réponse au VEGF. Ceci a été un pas déterminant dans une meilleure compréhension des événements conduisant à l'activation de FAK. En effet, la phosphorylation du résidu tyrosine 407 de FAK est un événement primordial dans l'activation de la migration des cellules endothéliales en réponse au VEGF. Savoir que Pyk2 est impliquée est essentiel dans le contexte d'une recherche d'une cible thérapeutique potentielle. Cependant, nous n'avons encore que des évidences indirectes par l'utilisation d'adénovirus Pyk2 *wild type* et mutés sur résidu tyrosine 402. Il serait donc intéressant dans un premier temps de confirmer que Pyk2 est la kinase phosphorylant le résidu 407 de FAK. Pour cela nous pourrions tout d'abord envisager des expériences de

farwestern. Ensuite, il serait intéressant de réaliser des essais kinase in-vitro afin de déterminer si Pyk2 activée par le VEGF peut phosphoryler une séquence peptidique contenant le résidu tyrosine 407 de FAK. Dans un second temps et dans un cadre plus large, il serait important de vérifier si Pyk2 peut phosphoryler ce même résidu lors de l'utilisation d'autres facteurs de croissance ou activateurs de FAK en général. En effet, il serait intéressant de savoir si des facteurs de croissance comme le *basic Fibroblast Growth Factor* peuvent également conduire à ce même modèle ou bien si celui-ci est spécifique du VEGF.

La molécule FAK est une protéine centrale lorsque l'on discute de migration cellulaire. Nombre de publications ont été réalisées permettant d'augmenter nos connaissances sur cette protéine. Cependant, il reste encore beaucoup d'éléments qui échappent encore à notre compréhension. La tendance actuelle des publications montre que le modèle initialement proposé de l'activation de FAK est beaucoup plus compliqué et peut varier selon le type d'activateur. Le travail présenté dans cette thèse tend à démontrer que lorsqu'on travaille sur FAK, il faut non seulement considérer le site d'autophosphorylation, les autres sites tyrosines qui ne sont pas obligatoirement dépendant du premier, mais aussi les sites sérines qui peuvent influencer les sites tyrosines. Ainsi, dans le cadre du développement d'outils thérapeutiques dits antiangiogéniques, FAK pourrait être une cible de choix dans les années à venir.

ANNEXE A

Phosphorylation de HSP90 par le
VEGFR2.

A. L'internalisation du VEGFR2 dépendante de la dynamine module la phosphorylation sur tyrosine de HSP90 et de la voie signalétique eNOS dans les cellules endothéliales.

Ce chapitre fait l'objet d'un article en collaboration avec l'équipe du Dr Gratton Jean-Philippe qui sera soumis sous peu. J'ai participé à cet article par la réalisation de la figure 5. J'ai également contribué à sa révision.

Dynamin-dependent internalization of VEGFR-2 modulates the tyrosine phosphorylation of HSP90 and eNOS signaling in endothelial cells.

Martine Duval^{1,2}, Fabrice Le Bœuf⁴, Jacques Huot⁴ and Jean-Philippe Gratton^{1,2,3},

*

¹Laboratory of Endothelial Cell Biology, Institut de recherches cliniques de Montréal (IRCM), 110 des Pins Ave West, Montreal, Quebec, Canada, H2W 1R7. Departments of ²Pharmacology and ³Medicine, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada. ⁴Le Centre de recherche en cancérologie de l'Université Laval, 9 rue McMahan, Québec, Canada, G1R 2J6.

Running title: Tyrosine phosphorylation of HSP90 by VEGFR-2

Key words: VEGFR-2, dynamin, HSP90, nitric oxide, c-Src

Subject category: Signal transduction

*To whom correspondence should be addressed: IRCM, 110 des Pins Ave West, Montreal, Quebec, Canada, H2W 1R7, Email: jean-philippe.gratton@ircm.qc.ca, Phone: 514-987-5610, Fax: 514-987-5676

ABSTRACT

Vascular endothelial growth factor (VEGF) is a potent proangiogenic cytokine. The VEGF receptor-2 (VEGFR-2) mediates most of the functional and biochemical effects of VEGF in endothelial cells including proliferation, migration, survival and release of nitric oxide (NO). We investigated the contribution of VEGFR-2 internalization on VEGF signalling using an inhibitor of endocytic vesicle formation, the dominant-negative form of the GTPase dynamin (K44A dynamin). We report that K44A-dynamin expression inhibits VEGFR-2 internalization, which results in a diminished tyrosine phosphorylation of a VEGFR-2 associated protein that we have identified as HSP90 β . We found that VEGF-induced tyrosine phosphorylation of HSP90 requires VEGFR-2 internalization and c-Src kinase activity. In addition, VEGFR-2 internalization is necessary for the activation of signalling proteins known to be regulated by HSP90: the protein kinase Akt and its substrate eNOS, the enzyme responsible for NO release from endothelial cells. Overall, these results suggest that receptor internalization and c-Src-mediated tyrosine phosphorylation of HSP90 are important regulatory mechanisms for VEGFR-2-stimulated eNOS activation and thus NO production by endothelial cells.

INTRODUCTION

Vascular endothelial growth factor (VEGF) is a potent proangiogenic cytokine that activates three specific receptor tyrosine kinases (RTK) namely, VEGFR-1, VEGFR-2 and VEGFR-3. Gene knockout studies have revealed that VEGF and its receptors are essential for the development of the vasculature in mouse embryos (Fong *et al.*, 1995; Shalaby *et al.*, 1995; Carmeliet *et al.*, 1996; Dumont *et al.*, 1998). In addition to its functional roles in vasculogenesis, VEGF plays key roles in adult physiological and pathological angiogenesis such as wound healing and tumour vascularization. Binding of VEGF induces receptor dimerization followed by auto and transphosphorylation of tyrosine residues of the C-terminal cytoplasmic domain (Cross *et al.*, 2003).

The VEGFR-2 mediates most of the functional and biochemical effects of VEGF in endothelial cells including proliferation, migration, survival and nitric oxide (NO) release. These effects are produced through the activation of multiple signalling pathways, such as the PI-3 kinase/Akt, p38 MAPK, PLC- γ and Erk/MAPK, following the activation of VEGFR-2 (Rousseau *et al.*, 1997; Takahashi and Shibuya, 1997; Gerber *et al.*, 1998; Takahashi *et al.*, 2001). VEGF-mediated activation of the Ser/Thr kinase Akt leads to phosphorylation of serine 1179 on bovine endothelial nitric oxide synthase (eNOS) (Ser¹¹⁷⁷ in the human form), which causes an increase of eNOS catalytic activity and results in release of NO from endothelial cells (Fulton *et al.*, 1999; Dimmeler *et al.*, 1999). In turn, NO released from endothelium contributes to the proangiogenic effects of VEGF. Indeed, VEGF-mediated vascular permeability, angiogenesis, and endothelial cell precursor mobilization are markedly impaired in eNOS deficient mice (Fukumura *et al.*, 2001; Aicher *et al.*, 2003).

The 90 kDa heat shock protein (HSP90) is a multifunctional molecular chaperone that plays a major role in the regulation of eNOS activity. HSP90 associates with eNOS and Akt following VEGF stimulation, which increases eNOS activity (Garcia-Cardena *et al.*, 1998; Fontana *et al.*, 2002). It is thought that binding of HSP90 to Akt prevents the phosphatase 2A-mediated dephosphorylation of Thr³⁰⁸ of Akt, which maintains its positive functional effects on eNOS catalytic activity (Sato *et al.*, 2000; Takahashi and Mendelsohn, 2003).

Many studies have demonstrated the implication of several important receptorial elements required for VEGF-mediated VEGFR-2 activation. However, much less is known about mechanisms that negatively regulate VEGFR-2 signal transduction. We recently demonstrated that VEGFR-2 is rapidly down-regulated following sustained VEGF stimulation, a process that involves the ubiquitin ligase c-Cbl, which results in the inhibition of VEGF-mediated NO release and VEGFR-2 degradation (Duval *et al.*, 2003). It has also been proposed that non-classical PKC isozymes participate in VEGFR-2 degradation, a process that involves serine phosphorylation of the carboxyl-terminal domain of VEGFR-2 (Singh *et al.*, 2005).

Internalization of activated RTK from plasma membrane is a critical step of signal transduction either by terminating membrane signalling or by redirecting and sustaining signalling intracellularly. Receptor endocytosis is regulated in part by the 100 kDa GTPase dynamin which is responsible for the scission of vesicles from the plasma membrane (Hinshaw, 2000). The demonstration that MAPK activation by EGF is a process dependent on dynamin-mediated internalization of EGFR confirmed that receptor endocytosis is a regulatory mechanism of RTK function (Vieira *et al.*, 1996). Moreover, many studies suggest that receptor signals are maintained in the endosomal compartment, which may serve as a mechanism for sustaining and amplifying membrane signalling (Urbe *et al.*, 2000; Hayes *et al.*, 2002).

In this study, we investigated the contribution of VEGFR-2 internalization on VEGF-mediated activation of specific intracellular signalling pathways that governs nitric oxide release. We show that VEGF induces a dynamin-dependent internalization of VEGFR-2 in endothelial cells. Our results also reveal that VEGFR-2 internalization is essential for tyrosine phosphorylation of VEGFR-2 bound HSP90 through the concomitant activation of the tyrosine kinase c-Src. In addition, inhibition of VEGFR-2 internalization abrogates Akt activation in response to VEGF and impairs NO release. This suggests that phosphorylated HSP90, in addition to its scaffolding role for eNOS and Akt, may also serve as a receptorial partner of VEGFR-2 signalling following internalization.

RESULTS

Dynamin mediates VEGF-induced internalization of VEGFR-2.

Internalization of activated receptor tyrosine kinases from the plasma membrane is a critical step of signal transduction. However, VEGF-induced VEGFR-2 internalization is ill-studied. In order to investigate VEGFR-2 endocytosis, we used human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) infected with adenoviruses coding for β -galactosidase (β -gal) as a control or for HA-tagged K44A-dynamin, a dominant-negative form of the GTPase to inhibit internalization. Immunodetection, using anti-HA antibody, was performed on lysates from HUVEC infected with either Ad- β -gal or Ad-K44A-dynamin and revealed the presence of an HA immunoreactive 100 kDa band indicating that cell infection resulted in the expression of the mutant dynamin (Figure 1A). In addition, we confirmed that infection of HUVEC with Ad-K44A-dynamin, in contrast to Ad- β -gal, significantly inhibited the uptake of fluorescently labelled transferrin into cells confirming that expression of the dominant-negative dynamin in HUVEC had functional consequences on known dynamin-dependent processes (results not shown).

FACS analysis was used to detect the presence of VEGFR-2 at the cell surface of endothelial cells before and following VEGF stimulation (40 ng/ml, 30 min). In cells infected with Ad- β -gal, VEGF stimulation resulted in a loss of VEGFR-2 expression at the cell surface (Figure 1B) suggesting that VEGF induces VEGFR-2 internalization in HUVEC. Expression of K44A-dynamin completely inhibited VEGF-induced VEGFR-2 internalization (Figure 1B). Quantitatively, the percentage of mean surface fluorescence (FITC) was reduced by 40% ($P < 0.05$) following VEGF treatment of Ad- β -gal infected cells. In contrast, VEGF treatment did not reduce surface expression of VEGFR-2 in cells that express K44A-dynamin (Figure 1C). These findings indicate that VEGF induces a dynamin-dependent internalization of VEGFR-2 in endothelial cells.

VEGFR-2 internalization promotes tyrosine phosphorylation of an associated protein identified as HSP90 β

In order to evaluate whether the expression of K44A-dynamin affects the autophosphorylation on tyrosine residues of VEGFR-2, we co-transfected COS-7 cells with VEGFR-2 and either wild-type dynamin (WT) or K44A-dynamin. Cell lysates were immunoprecipitated with antibodies against VEGFR-2 and tyrosine phosphorylation levels of VEGFR-2 were monitored by western blotting. Transient expression of VEGFR-2 in COS-7 cells results in constitutive autophosphorylation of the receptor; western blot analysis showed that the levels of tyrosine phosphorylation of VEGFR-2 were not affected by the co-expression of K44A-dynamin, indicating that inhibition of VEGFR-2 internalization does not affect autophosphorylation and activation *per se* of the receptor (Figure 2A, top panel, 200 and 250 kDa bands). Interestingly, in the VEGFR-2 immunoprecipitates, we also observed the presence of a highly tyrosine phosphorylated protein of approximately 85 kDa in cells expressing wildtype dynamin. This phospho-protein band was absent when VEGFR-2 internalization was inhibited by K44A-dynamin (Figure 2A). We used LC MS/MS analysis to identify this protein. COS-7 cells were transfected with plasmids coding for VEGFR-2 or eGFP, as a control, and HA-tagged WT-dynamin. Cell lysates were incubated with anti-VEGFR-2 antibodies for immunoprecipitation. The immunoprecipitated proteins were resolved by SDS-PAGE and detected by silver staining (Figure 2B). The \approx 85kDa protein, present only in the immunoprecipitate from cells expressing VEGFR-2, was cut out from the gel, subjected to trypsin digestion and analyzed by tandem mass spectrometry. Protein database search using Mascot analysis (Matrix Science) revealed the presence of 7 peptides with a total score of 241 corresponding to human HSP90 β (Supplementary information). These results indicate that promotion of VEGFR-2 internalization induces tyrosine phosphorylation of HSP90 associated with VEGFR-2 in COS-7 cells.

Activation of VEGFR-2 leads to tyrosine phosphorylation of HSP90

We have previously reported a regulated association of HSP90 with VEGFR-2 (Le Boeuf *et al.*, 2004). However, this is the first report of VEGFR-2-mediated tyrosine phosphorylation

of the chaperone. To further study the relationship between HSP90 phosphorylation and VEGFR-2 internalization, we first looked at endogenous HSP90 association to VEGFR-2 in COS-7 cells. Cells were co-transfected with VEGFR-2 and WT-dynamin or K44A-dynamin. Cell lysates were prepared and immunoprecipitated with antibodies against VEGFR-2. Figure 3A shows that endogenous HSP90 is associated to VEGFR-2 irrespectively of the presence of WT or K44Adynamin. In contrast, immunoprecipitation of HSP90 from these same lysates, revealed that tyrosine phosphorylation of HSP90 is increased only in cells expressing both VEGFR-2 and HA-dynamin. Conversely, K44A-dynamin expression completely abolished the VEGFR-2-stimulated tyrosine phosphorylation of HSP90 (Figure 3A). In addition, increased tyrosine phosphorylation of transiently transfected HA-tagged HSP90 β was observed in COS-7 cells that expressed both VEGFR-2 and HA-HSP90 β as revealed by immunoprecipitation using anti-HA-tag antibodies (Figure 3B). These results further confirm that the tyrosine phosphorylated protein presented in figure 2 is HSP90 β and suggest that internalization of VEGFR2 is required for the phosphorylation of HSP90. To investigate if tyrosine phosphorylation of HSP90 occurs in endothelial cells in response to VEGF stimulation, HSP90 was immunoprecipitated from lysates of BAEC that were stimulated with VEGF (40 ng/ml) for various time points. Phosphotyrosine immunoblotting done on HSP90 immunoprecipitates showed that VEGF stimulation of BAEC led to a marked increase in the phosphorylation of HSP90 on tyrosine residues at 15 min of VEGF stimulation and that the maximum was reached at 30 min of stimulation (Figure 3C).

Role of c-Src in VEGF-mediated tyrosine phosphorylation of HSP90

The tyrosine kinase c-Src is involved in various aspects of VEGF signalling. We thus explored the possibility of a contribution of c-Src kinase activity in VEGF-mediated tyrosine phosphorylation of HSP90. In this context, COS-7 cells were co-transfected with plasmids coding for HA-tagged HSP90 β , β -gal, c-Src or the dominant negative form K298R-Src (Figure 4A). Tyrosine phosphorylation of HSP90 β was monitored in HA-HSP90 β immunoprecipitates. In c-Src overexpressing COS-7 cells, an important increase in tyrosine phosphorylation levels of HSP90 β was observed. Conversely, tyrosine

phosphorylation of HSP90 β was barely detectable in cells expressing K298R-Src (Figure 4A). An *in vitro* kinase assay was also performed in order to confirm the ability of c-Src to directly phosphorylate HSP90. Purified HSP90 and recombinant c-Src were incubated in kinase buffer in the presence or absence of ATP and tyrosine phosphorylation was detected by immunoblotting with antiphosphotyrosine antibody. Figure 4B shows that tyrosine phosphorylation levels of HSP90 are increased only when c-Src and ATP are both present in the kinase reaction. Since overexpression of c-Src alone increased tyrosine phosphorylation of HSP90 (Figure 4A), we wondered if K298R-Src might inhibit VEGFR-2-mediated tyrosine phosphorylation of HSP90 in transfected COS-7 cells and in BAEC. Again COS-7 cells were co-transfected with VEGFR-2, HA-HSP90 β , K298R-Src or β -gal, as a control plasmid, and cell lysates were immunoprecipitated with anti-HA antibodies. Phosphotyrosine immunodetection of the HA-HSP90 β immunoprecipitate showed, as in figure 3B, that VEGFR-2 expression induced a marked increase in HSP90 tyrosine phosphorylation levels (Figure 4C; top panel). Concomitant expression of K298R-Src significantly inhibited the VEGFR-2-stimulated tyrosine phosphorylation of HSP90 β (Figure 4C; top panel). Simultaneously, VEGFR-2 was immunoprecipitated from these cell extracts and a slight but consistent reduction in the association of HA-HSP90 β to VEGFR-2 was observed in cells expressing the dominant negative form of c-Src (Figure 4C; middle panel).

We also monitored in endothelial cells the effect of K298R-Src expression on VEGF-stimulated increase in tyrosine phosphorylation levels of HSP90. K298R-Src was thus transfected in BAEC and the cells were stimulated with VEGF (40 ng/ml; 15 min). HSP90 immunoprecipitation from these cell extracts revealed that expression of the dominant negative Src inhibits the VEGF-stimulated increase in HSP90 tyrosine phosphorylation levels (Figure 4D). Overall, these results indicate that Src activity is essential for the phosphorylation of HSP90 following VEGFR-2 activation and that phosphorylation of HSP90 may favour the interaction between the receptor and HSP90.

Association of HSP90 to the VEGFR-2 is required for tyrosine phosphorylation

We previously reported that HSP90 is recruited to VEGFR-2 in response to VEGF, that this association is impaired by inhibiting HSP90 with geldanamycin (GA) and that it requires the last 130 amino acids of the VEGFR-2 cytoplasmic tail (Le Boeuf *et al.*, 2004). In order to better understand the relationship between the association of HSP90 to VEGFR-2 and the VEGF-dependent tyrosine phosphorylation of HSP90, we expressed, in BAEC, HA-tagged wild-type VEGFR-2 and a truncated VEGFR-2 mutant lacking the last 130 amino acids of the cytoplasmic tail (VEGFR-2- Δ 130). As previously reported, transfected BAEC were stimulated with VEGF and immunoprecipitation studies, using anti-HA antibodies, showed that HSP90 was not recruited to the truncated receptor in response to VEGF treatment (Le Boeuf *et al.*, 2004). Consequently, no increase in phosphorylation of HSP90 was detected in the VEGFR-2- Δ 130-HA immunoprecipitate in contrast to the wild-type receptor (Figure 5A). Interestingly, we also found in HUVEC that treatment of the cells with GA, a specific inhibitor of HSP90 that impairs the VEGF-induced recruitment of HSP90 to VEGFR-2 (Le Boeuf *et al.*, 2004), was also associated with an inhibition of the VEGF-stimulated tyrosine phosphorylation of HSP90 (Figure 5B). These results strongly suggest that a direct association to the receptor is necessary for the subsequent phosphorylation of HSP90 by c-Src.

In addition, we expressed, in BAEC, wild-type VEGFR-2 fused to green fluorescent protein (GFP) and the truncated mutant lacking the last 130 amino acids of VEGFR-2 (VEGFR-2- Δ 130) also fused to GFP. Transfected BAEC were stimulated with VEGF and the cellular trafficking of the receptor was examined using confocal microscopy. Results showed that both types of GFP-tagged VEGFR-2 were found at the basal pole in untreated cells. Following exposure to VEGF, the WT form of VEGFR-2 is quickly internalized as indicated by its relocalization from the basal to the median pole after 30 min. In contrast, even after 45 minutes, the truncated VEGFR-2- Δ 130-GFP mostly remained in the basal pole and only a small amount was found in the median pole (Figure 5C). This indicates that the last 130 amino acids of VEGFR-2 are required for internalization of the receptor. However, internalization of VEGFR-2, measured by FACS analysis, was not impaired by

GA (data not shown). This indicates that the last 130 amino acid portion of the receptor is required for the internalization of VEGFR-2, for HSP90 association and for its subsequent phosphorylation. However, receptor internalization is independent of HSP90 association and phosphorylation since GA abrogated recruitment of HSP90 to the VEGFR-2 but did not affect the VEGF-dependent internalization process. These results further suggest that tyrosine phosphorylation of HSP90 occurs on the internalized receptor.

Inhibition of VEGFR-2 internalization inhibits tyrosine phosphorylation of HSP90

To further demonstrate, in endothelial cells, that internalization of VEGFR-2 is necessary for VEGF-dependent tyrosine phosphorylation of HSP90, we expressed in BAEC HA-tagged WT-dynamin and K44A-dynamin and monitored the increase in HSP90 phosphorylation levels in response to VEGF stimulation. Figure 6A shows, as previously, that VEGF treatment of control untransfected BAEC increases phosphotyrosine levels of immunoprecipitated HSP90. Similarly, in cells overexpressing WT-dynamin, VEGF induced an increase in the tyrosine phosphorylation levels of HSP90. In contrast, K44A-dynamin expression in BAEC completely inhibited the VEGF-stimulated increase in HSP90 tyrosine phosphorylation levels (Figure 6A). These findings are in strong support that internalization of VEGFR-2 is a prerequisite for the phosphorylation of HSP90 in endothelial cells.

K44A-dynamin expression inhibits VEGFR-2 signalling to Akt and nitric oxide release

To evaluate the contribution of VEGFR-2 internalization and HSP90 phosphorylation on VEGF-induced activation of intracellular signalling pathways in endothelial cells, we infected BAEC with Ad-K44A-dynamin or Ad- β -gal adenoviruses and monitored the activation of well established VEGF-sensitive signalling pathways. Ad-K44A-dynamin expression, as monitored by western blotting against HA (Figure 6B, bottom panel), resulted in a marked decrease of VEGF-induced activation of Akt, as monitored by Ser 473 phosphorylation levels (Figure 6B, top panel). Interestingly, activation of PLC- γ and MAPK pathways was unaltered by K44A dynamin expression. The cellular levels of Akt

and PLC- γ were not affected by the adenoviral infection. These data suggest that VEGF-mediated Akt activation depends, at least in part, on internalization of the VEGFR-2.

It is well established that VEGF-stimulated nitric oxide release from endothelial cells is downstream from the PI-3 kinase/Akt signalling pathway (Fulton *et al.*, 1999; Dimmeler *et al.*, 1999). In addition, HSP90 is already known as a positive regulator of eNOS activity through allosteric association with the enzyme in response to various stimuli including VEGF (Garcia-Cardena *et al.*, 1998). We thus further investigated the importance of VEGFR-2 internalization on stimulated nitric oxide release from transiently transfected COS-7 cells. COS-7 cells were transfected with VEGFR-2 and eNOS expression vectors and the effect of expression of HA-tagged WT- and K44A-dynamin on NO release were monitored. Figure 7A shows that similar amounts of WT- and K44A-dynamin are expressed in COS-7 as detected using anti-HA antibody. Overnight accumulation of nitric oxide in the cell culture media was measured by specific chemiluminescence. Co-expression of VEGFR-2 with eNOS and WT-dynamin significantly increased NO production when compared to cells transfected with β -gal, eNOS and WT-dynamin. This confirms that VEGFR-2 stimulates eNOS-dependent NO release in transfected COS-7 cells. Interestingly, co-expression of K44A-dynamin with VEGFR-2 and eNOS inhibited by more than 50% VEGFR-2-stimulated NO release from COS-7 cells. This effect of the mutant dynamin is specific for the effects mediated by the VEGFR-2 since stimulation of NO release by the calcium ionophore ionomycin (3 μ M) was not affected by K44A-dynamin expression (Figure 7B). To further demonstrate the specificity of the effect of K44A-dynamin on VEGFR-2, we examined whether the kinase activity of PI-3 kinase or Akt was altered by K44A-dynamin expression. COS-7 cells were transfected with a constitutively active form of the p110 subunit of PI-3 kinase (p110-myr) or with Akt in addition to eNOS. We then monitored the effect of wild-type dynamin and K44A-dynamin expression on NO release stimulated by both kinases. Figure 7C shows that the capacity of p110 and Akt to induce NO release was not affected by the expression of K44A-dynamin. Thus, diminished NO production that results from the inhibition of VEGFR-2 internalization is due to a specific receptordependent effect since K44A-dynamin does not

influence NO release stimulated by downstream kinases nor by a calcium mobilizing agent, suggesting that expression of K44A-dynamin only affects VEGFR-2 mediated NO release via diminished HSP90 tyrosine phosphorylation and activation of the Akt/eNOS pathway.

DISCUSSION

Herein, we present evidences that uncover a role for intracellular VEGFR-2 in the VEGF-mediated activation of eNOS. We demonstrate that internalization of VEGFR-2 is necessary for the tyrosine phosphorylation of receptor-bound HSP90 β , more than likely through direct phosphorylation by the tyrosine kinase c-Src. We delineate an intracellular VEGF signalling axis that begins with the internalization of the VEGFR-2 and culminates with the activation of eNOS and NO release from endothelial cells and in which tyrosine phosphorylation of the chaperone HSP90 β by c-Src is an important regulator.

Firstly, our study demonstrates that internalization of the VEGFR-2 is dependent on the GTPase activity of dynamin since the overexpression of the K44A mutant of dynamin inhibits VEGF-stimulated VEGFR-2 internalization from the endothelial cell surface. It is known that the VEGFR-2 internalizes following activation and that full kinase activity of the receptor is necessary for internalization (Dougher and Terman, 1999). However, a role for dynamin-mediated internalization in VEGFR-2 intracellular signalling had never been demonstrated. Interestingly, the VEGFR-2 has recently been shown to colocalize with dynamin-2 and the early endosomal antigen (EEA1) protein (Bhattacharya *et al.*, 2005). We thus attempted to delineate a role for VEGFR-2 internalization in VEGF signalling using the dominant negative dynamin mutant. Inhibition of VEGFR-2 internalization, while not affecting overall tyrosine kinase activity of the VEGFR-2, shows that a receptor-associated protein was less phosphorylated on tyrosyl residues when internalization of the receptor is inhibited (Figure 2A). We have clearly identified this protein as HSP90 β . As previously mentioned, HSP90 had been shown to interact with VEGFR-2 and this VEGF-promoted effect contributes to signalling to FAK and actin remodelling (Rousseau *et al.*, 2000; Masson-Gadais *et al.*, 2003). We now provide novel data suggesting that tyrosine phosphorylation of VEGFR-2-associated HSP90 β is an early event in signal transduction leading to VEGF-mediated effects in endothelial cells. Also, we have previously shown that HSP90 is recruited to the last 130 AA of the VEGFR-2 in response to VEGF stimulation of endothelial cells (Le Boeuf *et al.*, 2004). Our results now suggest that association of HSP90, through the C-terminal tail of the receptor, in response to VEGF is

necessary for the subsequent tyrosine phosphorylation of HSP90. In addition, the fact that deletion of the last 130 AA of the VEGFR-2 inhibits VEGF-stimulated receptor internalization following its activation demonstrates a coordinated relationship between receptor trafficking and phosphorylation of HSP90. Interestingly, we have previously shown that the last 130 AA of the VEGFR-2 are dispensable for activation of p38 MAPK by VEGF (Le Boeuf *et al.*, 2004). Taken together our results suggest that a pool of non-phosphorylated HSP90 quickly associates with the last 130 AA of the receptor in response to VEGF and that after internalization, which again requires the last 130 AA of VEGFR-2, this pool of HSP90 becomes phosphorylated in a Src-dependent manner. In corollary, the fact that the HSP90 inhibitor, geldanamycin, inhibits the recruitment of HSP90 to VEGFR-2 but does not affect the VEGF-dependent internalization of the receptor indicates that association and phosphorylation of HSP90 are not required for the internalization process.

c-Src has been implicated in various signalling pathways downstream of the VEGFR-2 such as NO and prostacyclin release (He *et al.*, 1999). In addition, Src kinase activity is necessary for VEGF-mediated vascular permeability involved in angiogenesis, tumour cell extravasation and metastasis (Eliceiri *et al.*, 1999; Weis *et al.*, 2004). We now provide evidence that c-Src catalyses the tyrosine phosphorylation of HSP90 in response to VEGF stimulation and that Src kinase activity in a reconstituted expression system as well as in endothelial cells is essential for the VEGFR-2-dependent tyrosine phosphorylation of HSP90. In preliminary experiments, we have attempted to identify the tyrosine residues on HSP90 β that are phosphorylated by c-Src. The single mutation to phenylalanine of tyrosyl residues 154, 456, and 511 on HSP90 β , identified as potential consensus motifs for tyrosine kinases, did not result in a detectable reduction of the tyrosine phosphorylation levels (results not shown). Phosphomapping experiments are ongoing to identify the tyrosine residues phosphorylated by c-Src. Interestingly, Src kinases have long been documented as a target for the chaperoning functions of HSP90 (Nathan *et al.*, 1997; Xu *et al.*, 1999). Our demonstration that HSP90 is also a *bona fide* Src substrate in response to VEGFR-2 activation by VEGF indicates a reciprocal influence of these two proteins in endothelial cell signalling.

Internalization of RTK has been proposed to participate in the termination of

receptor signalling however it has also been recognized as a mean to redirect and sustain signalling in specific intracellular compartments such as the endosome (Galperin and Sorkin, 2003). While we do not provide here a direct evidence for endosomal signalling from internalized VEGFR-2, we however demonstrate that inhibition of VEGFR-2 internalization using the dynamin mutant inhibits specific intracellular pathways while maintaining others intact. Indeed, VEGFR-2 internalization is required for tyrosine phosphorylation of HSP90 β , activation of Akt and it participates in VEGF intracellular signalling to eNOS and NO release. The possibility that growth factor signals are triggered by endocytosed receptors has been suggested by studies demonstrating the presence of phosphorylated receptors and receptor-associated effector proteins, such as c-Src, in the endosomal fractions of cellular microsome (Adamson *et al.*, 1992; Di Guglielmo *et al.*, 1994). Additional evidences supporting the signalling endosome hypothesis came from genetic and biochemical experiments with the EGFR and the β -adrenergic receptor. Conditional K44A-dynamin expression resulted in specific signal transduction pathways being upregulated (PLC γ and Shc) and others being attenuated (MAPK and PI3K) (Vieira *et al.*, 1996). Similarly, in experiments with the β -adrenergic receptor, inhibition of endocytosis by the mutant dynamin resulted in inhibition of MAPK activation (Daaka *et al.*, 1998; Ahn *et al.*, 1999). We now suggest that VEGFR-2 signalling to HSP90, Akt and eNOS depend in part on the internalization of the receptor for maximal NO release from cells. Interestingly, all the components of this pathway have been previously shown to interact directly; it is thus logical that they all depend on the internalization process for efficient signalling. In addition, pharmacological inhibition of Src activity with PP2 attenuates VEGF-signalling to Akt and eNOS while maintaining unaffected MAPK, similarly to inhibition of the internalization process presented here (Lavoie, J.R., Duval, M., Gratton, J.P., and Huot, J. unpublished results). The direct and regulated binding of HSP90 to eNOS as been shown to increase eNOS activity in endothelial cells (Garcia-Cardena *et al.*, 1998). It is noteworthy that prior to the identification of HSP90 as a modulator of eNOS activity, a tyrosine phosphorylated protein was identified in complex with eNOS (Venema *et al.*, 1996). However, further studies now suggest that this initially identified phosphorylated protein is in fact HSP90 (Harris *et al.*, 2000). It is also well known that pharmacological inhibition of HSP90 by geldanamycin, attenuates Akt and

eNOS activity leading to inhibition of angiogenesis (Brouet *et al.*, 2001; Sun and Liao, 2004). On the basis of our study we now suggest that VEGF-mediated tyrosine phosphorylation of HSP90 by c-Src following receptor internalization, might be a crucial event for the allosteric modulation of Akt and eNOS in endothelial cells.

In summary, our study brings new insights on VEGFR-2 endocytosis, a phenomena which is required for the full activation of VEGF intracellular signals. We found that dynamin-dependent internalization of VEGFR-2 is necessary for the tyrosine phosphorylation of HSP90, Akt activation and NO release. We also demonstrate that c-Src is responsible for the VEGFmediated tyrosine phosphorylation of HSP90 which is a novel signalling intermediate in VEGF mediated angiogenesis. In this context, one may envision that the inhibition of HSP90 phosphorylation by geldanamycin derivatives may contribute to their anticancer effects.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture

Bovine aortic endothelial cells (BAEC) were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% FBS (HyClone, Logan, UT), 2.0 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin. Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) (VEC Technologies) were plated on 0.1% gelatin-coated 60 mm dishes and cultured in M199 Earles medium supplemented with 20% FBS (Gibco), 50 µg/ml endothelial cell growth supplement (Sigma), 100 µg/ml heparin (Sigma), 2.0 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin. COS-7 cells were cultured in DMEM supplemented with 10% FBS (Gibco), 2.0 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin. Endothelial cells were used between passages 3 and 8. Recombinant human VEGF obtained from the BRB Preclinical Repository of the NCI-Frederick Cancer Research and Development Center was used for cell stimulation throughout this study.

Adenoviruses and cell infections

Hemagglutinin (HA)-tagged K44A-dynamin adenoviruses were generously given by Dr. Jeffrey E. Pessin (SUNY Stony Brook). Expansion of the virus was done at the Animal Reproduction and Biotechnology Lab of Colorado State University. For cell infections, 80 % confluent dishes of BAEC or HUVEC were used. Cells were infected, at a multiplicity of infection (MOI) of 10 for 8 to 16h, with recombinant adenoviruses coding for β-galactosidase or HA-K44A-dynamin. The adenoviruses were removed and cells were left to recover for 24 to 48h in complete medium. These conditions resulted in uniform expression of the transgenes in close to 95% of the cells as determined by β-galactosidase activity staining.

Receptor internalization studies by FACS analysis

HUVEC infected with either Ad- β -gal or Ad-K44A-dynamin were trypsinized and incubated with mouse anti-human VEGFR-2 antibody (Sigma) for 30 minutes on ice. Cells were then incubated with FITC-conjugated affinity-purified goat F(ab')₂ anti-mouse IgG (Jackson Immuno Research Laboratories) on ice for 30 minutes. Cells were fixed with 1% paraformaldehyde and subsequently analyzed using a FACScan Cytometer. 10 000 events were analyzed for fluorescence intensity with dead cells excluded by gating on forward and side scatter.

Plasmid construction and transfections

cDNA coding for bovine eNOS (in pcDNA3), human VEGFR-2 (in pRK7), β -galactosidase (in pcDNA3) and HA-HSP90 β (in pcDNA3) cDNAs were described previously (Fulton *et al.*, 1999; Fontana *et al.*, 2002). Akt and p110 expression plasmids were given by Dr. William C. Sessa (Yale University, New Haven, CT, USA). HA tagged WT-dynamin and K44Adynamin expression vectors (pcDNA3) were obtained from Dr. S.A. Laporte (McGill University, Montreal, Canada). VEGFR-2-GFP and VEGFR-2- Δ 130-GFP constructs were obtained by inserting VEGFR-2 wild type and VEGFR-2- Δ 130 cDNAs in XhoI and SacII restriction sites of pEGFP-N3 vector (Le Boeuf *et al.*, 2004). COS-7 and BAEC were transfected using Lipofectamine 2000 according to manufacturer's protocol (Invitrogen). Cells were cultured in either 6 wells plates, 60 or 100 mm dishes and were transfected at 90% confluence. Protein expression was confirmed (60 μ g of total cell lysate) by SDS-PAGE and western blot analysis 48h following transfections.

Nitric oxide release

Cell media were processed for the measurement of nitrite (NO₂⁻), the stable breakdown product of NO in aqueous solution, by NO-specific chemiluminescence using a NO analyser (Ionics Instruments) as described previously (Sessa *et al.*, 1995). Transfected COS-7 cells were processed for the measurement of nitrite, 48h after transfection.

Antibodies, immunoprecipitations and immunoblotting

The primary antibodies used were: anti-VEGFR-2 mAb (Santa Cruz Biotechnology), Anti-eNOS, -HSP90, -HA-Tag (pAbs) (BD Transduction Lab), HA-Tag (mAb), phospho-Tyr⁷⁸³-PLC- δ 1, PLC- δ 1, phospho-p44/42 MAPK (Thr²⁰²/ Tyr²⁰⁴) phospho-Akt (Ser⁴⁷³), Akt and phospho-Ser¹¹⁷⁹-eNOS (Cell Signaling) and anti-phosphotyrosine (4G10) (Upstate Biotech). For immunoprecipitations, cells were solubilized with a lysis buffer containing 1% NP-40, 20mM Tris-HCL, 100 mM NaCl, 2,5 mM EDTA, 20mM sodium fluoride, 1 mM sodium pyrophosphate, 1 mM sodium orthovanadate, and protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics). Soluble proteins were incubated with the primary antibody (2 μ g) at 4°C for 2 hours. Protein A-Sepharose (Sigma) (50 μ l of a 50% slurry) was then added and incubated for an additional hour. The immune complexes were precipitated by centrifugation, washed 3 times with lysis buffer, boiled in SDS sample buffer and separated by SDS-PAGE, transferred onto a nitrocellulose membrane (Hybond ECL, Amersham) and western blotted. Antibody detection was performed by a chemiluminescence-based detection system (ECL, Amersham) or by a LICOR Odyssey infrared imaging system (LICOR Biosciences) using Alexa 680 and Alexa 800 labelled secondary antibodies (Invitrogen). For HSP90 immunoprecipitations, cells were solubilized using the following lysis buffer: 1% Tx-100, 20mM Tris-HCL, 100 mM NaCl, 2,5 mM EDTA, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 20mM sodium fluoride, 1 mM sodium pyrophosphate, 1 mM sodium orthovanadate, and protease inhibitor cocktail.

In vitro kinase assay

Purified HSP90 (1 μ g; Stressgen Bioreagents) was incubated with 5.25 U of recombinant c-Src (Upstate) for 20 min at 30°C in buffer containing 20mM HEPES, pH 7.4, 10mM MgCl₂, 10mM MnCl₂, 1mM DTT and 0.05mM sodium orthovanadate with or without 100 μ M ATP (Sigma). The kinase reaction was stopped by adding SDS sample buffer. Following SDS-PAGE and transfer to a nitrocellulose membrane, the tyrosine phosphorylation was monitored by immunoblotting using anti-phosphotyrosine antibody as above.

Confocal microscopy

BAEC were transfected with VEGFR-2-GFP fusion constructs with Poly(ethyleneimine) solution purchased from Sigma. The transfected BAEC were then plated on gelatin-coated Labtek chambers. After VEGF treatments, cells were fixed with 3.7% formaldehyde and permeabilized with 0.1% saponin in PBS, pH 7.5. The cells were examined by confocal microscopy.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) (MOP-15402 to J.H and MOP-53295 to J.P.G) and by a grant from the Terry Fox Foundation through the National Cancer Institute of Canada (#15139 to J.P.G.). M.D. is a recipient of a studentship from the Heart and Stroke Foundation of Canada. F.L.B. holds a studentship from Le Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ). J.P.G. holds a Tier II Canada Research Chair.

REFERENCES

- Adamson P, Paterson HF, and Hall A (1992) Intracellular localization of the P21rho proteins. *J Cell Biol*, **119**, 617-627.
- Ahn S, Stuart M, Luttrell LM, Lefkowitz RJ, and Daaka Y (1999) Src-mediated tyrosine phosphorylation of dynamin is required for beta2-adrenergic receptor internalization and mitogen-activated protein kinase signaling. *J Biol Chem*, **274**, 1185-1188.
- Aicher A, Heeschen C, Mildner-Rihm C, Urbich C, Ihling C, Technau-Ihling K, Zeiher AM, and Dimmeler S (2003) Essential role of endothelial nitric oxide synthase for mobilization of stem and progenitor cells. *Nat Med*, **9**, 1370-1376.
- Bhattacharya R, Kang-Decker N, Hughes DA, Mukherjee P, Shah V, McNiven MA, and Mukhopadhyay D (2005) Regulatory role of dynamin-2 in VEGFR-2/KDR-mediated endothelial signaling. *FASEB J*, **19**, 1692-1694.
- Brouet A, Sonveaux P, Dessy C, Moniotte S, Balligand JL, and Feron O (2001) Hsp90 and caveolin are key targets for the proangiogenic nitric oxide-mediated effects of statins. *Circ Res*, **89**, 866-873.
- 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, and Nagy A (1996) Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature*, **380**, 435-439.
- Cross MJ, Dixelius J, Matsumoto T, and Claesson-Welsh L (2003) VEGF-receptor signal transduction. *Trends Biochem Sci*, **28**, 488-494.
- Daaka Y, Luttrell LM, Ahn S, Della Rocca GJ, Ferguson SSG, Caron MG, and Lefkowitz RJ (1998) Essential role for G protein-coupled receptor endocytosis in the activation of mitogenactivated protein kinase. *J Biol Chem*, **273**, 685-688.

- Di Guglielmo GM, Baass PC, Ou WJ, Posner BI, and Bergeron JJ (1994) Compartmentalization of SHC, GRB2 and mSOS, and hyperphosphorylation of Raf-1 by EGF but not insulin in liver parenchyma. *EMBO J*, **13**, 4269-4277.
- Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, and Zeiher AM (1999) Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature*, **399**, 601-605.
- Dougher M and Terman BI (1999) Autophosphorylation of KDR in the kinase domain is required for maximal VEGF-stimulated kinase activity and receptor internalization. *Oncogene*, **18**, 1619-1627.
- Dumont DJ, Jussila L, Taipale J, Lymboussaki A, Mustonen T, Pajusola K, Breitman M, and Alitalo K (1998) Cardiovascular failure in mouse embryos deficient in VEGF receptor-3. *Science*, **282**, 946-949.
- Duval M, Bedard-Goulet S, Delisle C, and Gratton JP (2003) Vascular endothelial growth factor-dependent down-regulation of Flk-1/KDR involves Cbl-mediated ubiquitination. Consequences on nitric oxide production from endothelial cells. *J Biol Chem*, **278**, 20091-20097.
- Eliceiri BP, Paul R, Schwartzberg PL, Hood JD, Leng J, and Cheresh DA (1999) Selective requirement for Src kinases during VEGF-induced angiogenesis and vascular permeability. *Mol Cell*, **4**, 915-924.
- Fong GH, Rossant J, Gertsenstein M, and Breitman ML (1995) Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature*, **376**, 66-70.
- Fontana J, Fulton D, Chen Y, Fairchild TA, McCabe TJ, Fujita N, Tsuruo T, and Sessa WC (2002) Domain mapping studies reveal that the M domain of hsp90 serves as a molecular scaffold to regulate Akt-dependent phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase and NO release. *Circ Res*, **90**, 866-873.

Fukumura D, Gohongi T, Kadambi A, Izumi Y, Ang J, Yun CO, Buerk DG, Huang PL, and Jain RK (2001) Predominant role of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis and vascular permeability. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 26042609.

Fulton D, Gratton JP, McCabe TJ, Fontana J, Fujio Y, Walsh K, Franke TF, Papapetropoulos A, and Sessa WC (1999) Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature*, **399**, 597-601.

Galperin E and Sorkin A (2003) Visualization of Rab5 activity in living cells by FRET microscopy and influence of plasma-membrane-targeted Rab5 on clathrin-dependent endocytosis. *J Cell Sci*, **116**, 4799-4810.

Garcia-Cardena G, Fan R, Shah V, Sorrentino R, Cirino G, Papapetropoulos A, and Sessa WC (1998) Dynamic activation of endothelial nitric oxide synthase by Hsp90. *Nature*, **392**, 821-824.

Gerber HP, McMurtrey A, Kowalski J, Yan M, Keyt BA, Dixit V, and Ferrara N (1998) 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*, **273**, 30336-30343.

Harris MB, Ju H, Venema VJ, Blackstone M, and Venema RC (2000) Role of heat shock protein 90 in bradykinin-stimulated endothelial nitric oxide release. *Gen Pharmacol*, **35**, 165-170.

Hayes S, Chawla A, and Corvera S (2002) TGF beta receptor internalization into EEA1-enriched early endosomes: role in signaling to Smad2. *J Cell Biol*, **158**, 1239-1249.

He H, Venema VJ, Gu X, Venema RC, Marrero MB, and Caldwell RB (1999) Vascular endothelial growth factor signals endothelial cell production of nitric oxide and prostacyclin through flk-1/KDR activation of c-Src. *J Biol Chem*, **274**, 25130-25135.

- Hinshaw JE (2000) Dynamin and its role in membrane fission. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **16**, 483-519.
- Le Boeuf F, Houle F, and Huot J (2004) 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*, **279**, 39175-39185.
- Masson-Gadais B, Houle F, Laferriere J, and Huot J (2003) Integrin α v β 3, requirement for VEGFR2-mediated activation of SAPK2/p38 and for Hsp90-dependent phosphorylation of focal adhesion kinase in endothelial cells activated by VEGF. *Cell Stress Chaperones*, **8**, 37-52.
- Nathan DF, Vos MH, and Lindquist S (1997) In vivo functions of the *Saccharomyces cerevisiae* Hsp90 chaperone. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 12949-12956.
- Rousseau S, Houle F, Kotanides H, Witte L, Waltenberger J, Landry J, and Huot J (2000) 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*, **275**, 10661-10672.
- Rousseau S, Houle F, Landry J, and Huot J (1997) p38 MAP kinase activation by vascular endothelial growth factor mediates actin reorganization and cell migration in human endothelial cells. *Oncogene*, **15**, 2169-2177.
- Sato S, Fujita N, and Tsuruo T (2000) Modulation of Akt kinase activity by binding to Hsp90. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 10832-10837.
- Sessa WC, Garcia-Cardena G, Liu J, Keh A, Pollock JS, Bradley J, Thiru S, Braverman IM, and Desai KM (1995) The Golgi association of endothelial nitric oxide synthase is necessary for the efficient synthesis of nitric oxide. *J Biol Chem*, **270**, 17641-17644.

Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, Gertsenstein M, Wu XF, Breitman ML, and Schuh AC (1995) Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature*, **376**, 62-66.

Singh AJ, Meyer RD, Band H, and Rahimi N (2005) The carboxyl terminus of VEGFR-2 is required for PKC-mediated down-regulation. *Mol Biol Cell*, **16**, 2106-2118.

Sun J and Liao JK (2004) Induction of angiogenesis by heat shock protein 90 mediated by protein kinase Akt and endothelial nitric oxide synthase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **24**, 2238-2244.

Takahashi S and Mendelsohn ME (2003) Synergistic activation of endothelial nitric-oxide synthase (eNOS) by HSP90 and Akt: calcium-independent eNOS activation involves formation of an HSP90-Akt-CaM-bound eNOS complex. *J Biol Chem*, **278**, 30821-30827.

Takahashi T and Shibuya M (1997) The 230 kDa mature form of KDR/Flk-1 (VEGF receptor-2) activates the PLC-gamma pathway and partially induces mitotic signals in NIH3T3 fibroblasts. *Oncogene*, **14**, 2079-2089.

Takahashi T, Yamaguchi S, Chida K, and Shibuya M (2001) A single autophosphorylation site on KDR/Flk-1 is essential for VEGF-A-dependent activation of PLC-gamma and DNA synthesis in vascular endothelial cells. *EMBO J*, **20**, 2768-2778.

Urbe S, Mills IG, Stenmark H, Kitamura N, and Clague MJ (2000) Endosomal localization and receptor dynamics determine tyrosine phosphorylation of hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate. *Mol Cell Biol*, **20**, 7685-7692.

Venema VJ, Marrero MB, and Venema RC (1996) Bradykinin-stimulated protein tyrosine phosphorylation promotes endothelial nitric oxide synthase translocation to the cytoskeleton. *Biochem Biophys Res Commun*, **226**, 703-710.

Vieira AV, Lamaze C, and Schmid SL (1996) Control of EGF receptor signaling by clathrin-mediated endocytosis. *Science*, **274**, 2086-2089.

Weis S, Cui J, Barnes L, and Cheresh D (2004) Endothelial barrier disruption by VEGF-mediated Src activity potentiates tumor cell extravasation and metastasis. *J Cell Biol*, **167**, 223229.

Xu Y, Singer MA, and Lindquist S (1999) Maturation of the tyrosine kinase c-src as a kinase and as a substrate depends on the molecular chaperone Hsp90. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 109114.

FIGURES LEGENDS

Figure 1. VEGF induces a dynamin-dependent internalization of VEGFR-2. **(A)** HUVEC were infected with adenoviruses (10 MOI) coding for β -gal (Ad- β -gal) or HA-K44A-dynamin (Ad-HA-K44A-dyn). Cells were lysed and HA-K44A-dyn expression was monitored by Western blot (wb) against HA. **(B)** Adenovirus infected HUVEC were serum starved and stimulated with VEGF (40 ng/ml, 30 min.). Cells were then incubated on ice with mouse anti-hVEGFR-2 for 1h followed by incubation with FITC-conjugated secondary antibodies. Cells were subsequently analysed by FACS. **(C)** % of mean fluorescence (FITC) comparison between cells expressing β -gal and HA-K44A-dyn, before and after VEGF treatment. * $P < 0.05$ vs control cells, ANOVA followed by Bonferroni.

Figure 2. VEGFR-2 internalization is required for tyrosine phosphorylation of an associated protein. **(A)** COS-7 cells were co-transfected with VEGFR-2, eGFP, as a control, HA-dynamin (HA-dyn) and HA-K44A-Dynamin (HA-K44A-dyn) expressing vectors as indicated. Cell lysates were immunoprecipitated with an anti-VEGFR-2 antibody, separated by SDS-PAGE and western blotted (wb) using anti-phosphotyrosine antibodies (p-Tyr). Equal protein expression and immunoprecipitation levels were determined by anti-VEGFR-2 and anti-HA western blotting in the immunoprecipitate (IP) and in total cell lysates (TCL). These results were repeated three times with similar outcomes. **(B)** VEGFR-2 internalization is necessary for HSP90 phosphorylation. VEGFR-2 immunoprecipitate from COS-7 cells co-transfected as in **(A)** were separated by SDS-PAGE and proteins detected by silver staining. The unique ≈ 85 kDa protein present in the VEGFR-2 transfected cells (arrow) was cut and subjected to LC/MS/MS analysis (see Supplementary information). LC/MS/MS analysis identified this protein as HSP90 β .

Figure 3. VEGF induces tyrosine phosphorylation of HSP90. **(A)** COS-7 cells were transiently transfected with VEGFR-2, HA-dynamin (HA-dyn) and HA-K44A-dynamin (HA-K44A-dyn) as indicated. Cell lysates were immunoprecipitated (IP) using anti-VEGFR-2 or anti-HSP90 antibodies and tyrosine phosphorylation levels of HSP90 were monitored by antiphosphotyrosine (p-Tyr) immunodetection and HSP90 association to the VEGFR-2 was revealed by anti-HSP90 western blotting (wb) on the VEGFR-2

immunoprecipitate. Anti-HA antibodies were used to control for dynamin expression in total cell lysates (TCL). **(B)** VEGFR-2 stimulates tyrosine phosphorylation of HSP90 β . COS-7 cells were co-transfected as indicated. Anti-HA antibodies were used for HA-HSP90 β immunoprecipitation and anti-p-Tyr antibodies were used to detect phosphorylated tyrosine residues on HA-HSP90 β . **(C)** VEGF stimulation of endothelial cells induces tyrosine phosphorylation of HSP90. Serum starved BAEC were stimulated with VEGF (40 ng/ml) for the indicated time and HSP90 was immunoprecipitated from the cell extracts. Anti-p-Tyr antibodies were used to detect HSP90 tyrosine phosphorylation levels.

Figure 4. c-Src mediates the VEGF-stimulated tyrosine phosphorylation of HSP90. **(A)** c-Src expression induces tyrosine phosphorylation of HSP90 β . COS-7 cells were transfected with as indicated and cell extracts were immunoprecipitated (IP) using antibodies against HA. HA-HSP90 β tyrosine phosphorylation was determined by western blotting using anti-p-Tyr. **(B)** c-Src phosphorylates HSP90 *in vitro*. Purified HSP90 was incubated with recombinant c-Src in presence or absence of ATP for 20 min at 30°C then immunoblotted with anti-p-Tyr, anti-HSP90 or anti-c-Src antibodies. **(C)** c-Src activity is necessary for VEGFR-2 stimulated phosphorylation of HSP90 β . COS-7 cells were transfected as indicated. HA-HSP90 β and VEGFR-2 immunoprecipitates were immunoblotted with anti-p-Tyr, Anti-VEGFR-2 and anti-HA antibodies. Anti-Src antibodies were used to control for equal transfection levels in total cell lysate (TCL). **(D)** c-Src activity is necessary for VEGF-stimulated phosphorylation of HSP90 in endothelial cells. BAEC were transiently transfected with K298R-Src expressing vector. Serum starved cells were stimulated with VEGF (40 ng/ml, 15min.) and cell lysates were immunoprecipitated using anti-HSP90 antibody and tyrosine phosphorylation detected by anti-p-Tyr immunoblotting.

Figure 5. VEGFR-2 cytoplasmic tail is essential for VEGF-mediated tyrosine phosphorylation and association of HSP90. **(A)** BAEC were transfected with plasmids coding for VEGFR-2-HA or VEGFR-2- Δ 130-HA. Serum starved cells were stimulated with VEGF (40 ng/ml, 10 min). Cell lysates were incubated with antibodies against HA for VEGFR-2 immunoprecipitation (IP). Immunoprecipitated proteins were detected with anti-HSP90 and anti-HA antibodies. Anti-p-Tyr antibodies were used to detect phosphorylated

tyrosine on immunoprecipitated proteins. (B) Geldanamycin (GA) inhibits VEGF-stimulated tyrosine phosphorylation and recruitment of HSP90. HUVEC were pretreated with GA and stimulated with VEGF as indicated. Tyrosine phosphorylation levels of HSP90 immunoprecipitates were monitored by western blot (wb) using anti-p-Tyr antibodies. (C) The c-terminal tail of VEGFR-2 is essential for receptor internalization. VEGFR-2 and VEGFR-2- Δ 130 were fused to GFP and transiently transfected in BAEC. Cells were stimulated with VEGF (10 ng/ml) for the indicated time. Cells were fixed and examined by confocal microscopy. Images were taken at the basal and median poles of the cells, as indicated.

Figure 6. K44A-dynamin expression abrogates VEGF-stimulated tyrosine phosphorylation of HSP90 and activation of Akt. (A) VEGFR-2 internalization is necessary for VEGF-induced tyrosine phosphorylation of HSP90. BAEC were transiently transfected with plasmids coding for HA-dynamin (HA-dyn), HA-K44A-dynamin (HA-K44A-dyn) or β -gal. Serum starved cells were stimulated with VEGF (40 ng/ml, 15 min). Cell lysates were immunoprecipitated for HSP90 and tyrosine phosphorylation level of HSP90 was detected with anti-phosphotyrosine antibody (p-Tyr). Expression of wild-type and K44A-dynamin was monitored using HA-tag antibody on total cell lysates (TCL). (B) K44A-dynamin expression in endothelial cells inhibits Akt activation. BAEC were infected with adenoviruses coding for β -galactosidase (Ad- β -gal) or HA-K44A-dynamin (Ad-HA-K44A-dyn) as indicated. Serum starved cells were stimulated with VEGF (40 ng/ml) for the indicated time. Cell lysates were separated by SDS-PAGE and immunoblotted using antibodies against phospho-Ser⁴⁷³-Akt, phospho-Tyr⁷⁸³-PLC- γ and phospho-p42-44 Erk to monitor activation of VEGF sensitive signalling pathways. Total Akt, PLC- γ and HA were western blotted (wb) to monitor for equal protein loading and protein expression.

Figure 7. K44A-dynamin expression inhibits VEGFR-2-mediated nitric oxide release. (A) COS-7 cells were transfected with VEGFR-2, eNOS, HA-dynamin (HA-dyn) and HA-K44A-dynamin (HA-K44A-dyn) as indicated. 48 hours after transfection, cell culture media were processed for the measurement of NO. *P < 0.05 vs. cells expressing HA-dyn, ANOVA followed by Bonferroni. (B) Calcium ionophore-stimulated NO production is not

affected by K44A-dynamin expression. COS-7 cells were transfected with eNOS, HA-tagged WT- and K44A-dynamin. Serum starved cells were incubated with ionomycin (3 μ M, 30 min). Cell culture media were collected for NO analysis. (C) K44A-dynamin does not influence VEGF independent Akt signalling. COS-7 cells were transiently transfected with eNOS expression plasmid in presence of HA-WT- or HA-K44A-dynamin. In some cases, eNOS was activated by co-transfection with Akt or the constitutively active form of PI-3 kinase, p110-myr. 48 hours post-transfection, cell culture media were collected for the measurement of NO. Anti-VEGFR-2, anti-eNOS and anti-HA antibodies were used to control for equal transfection levels. wb: Western blot.

Figure 1

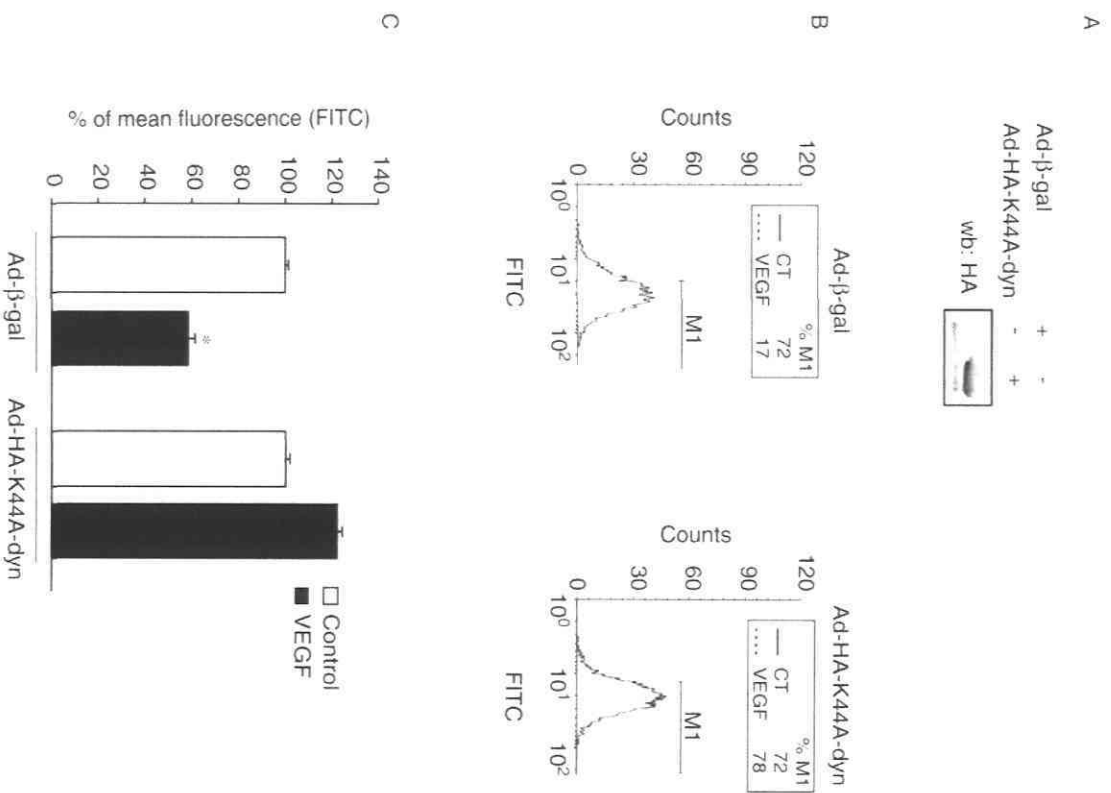


Figure 2

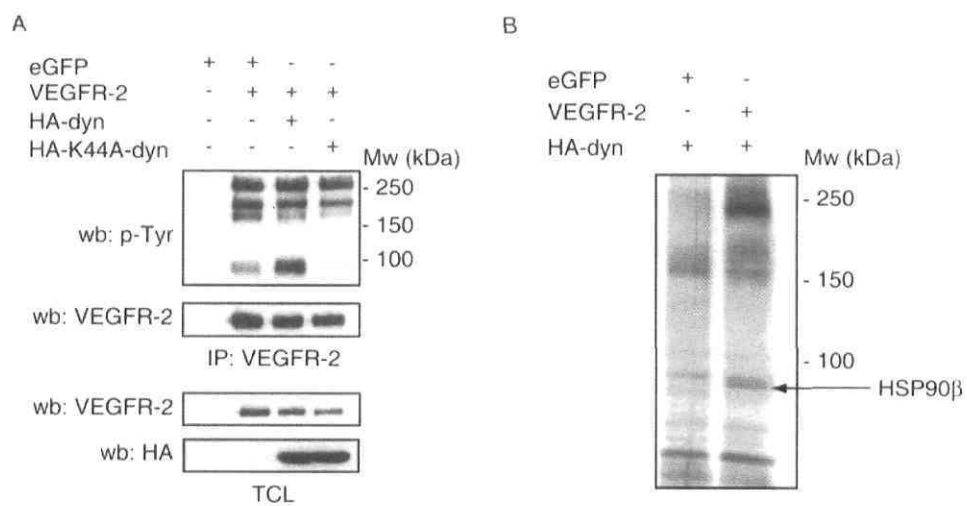


Figure 3

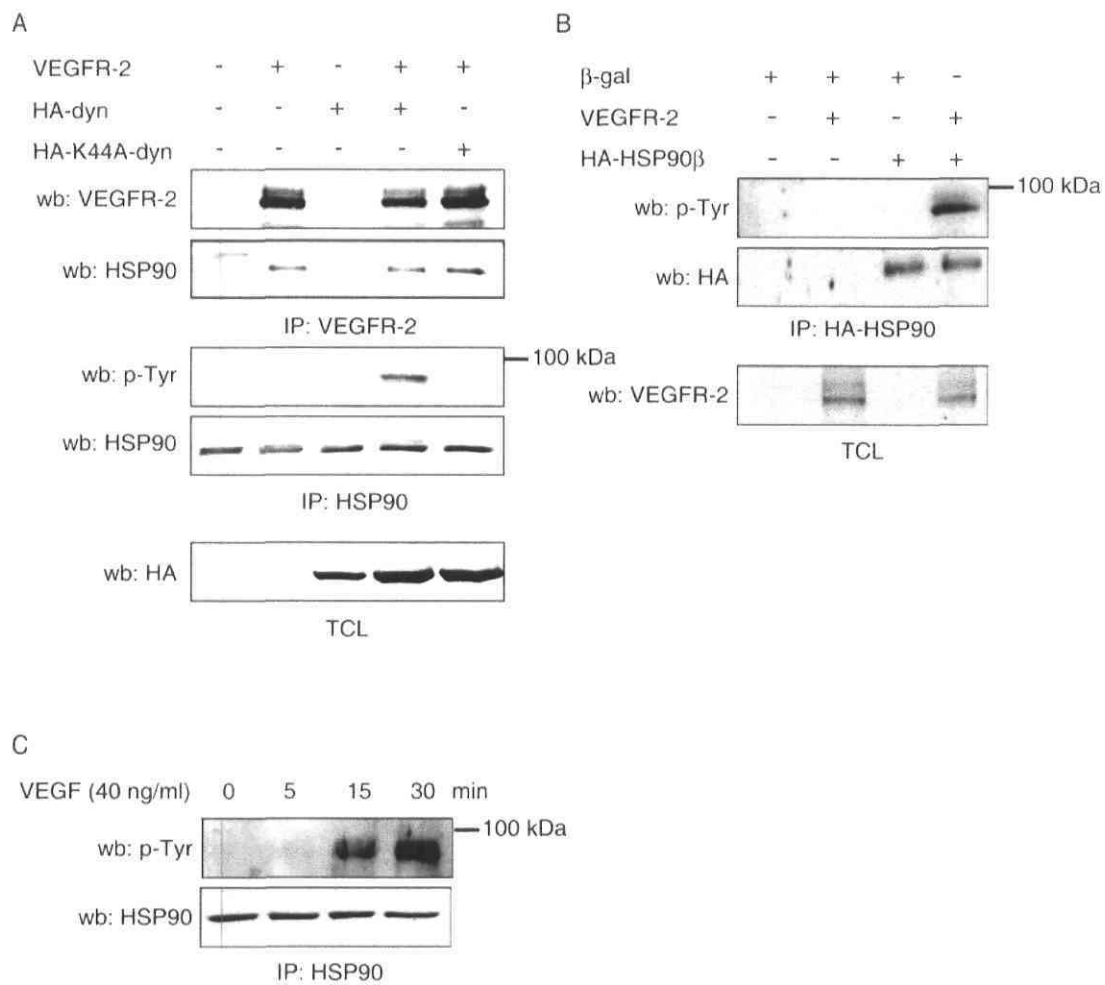


Figure 4

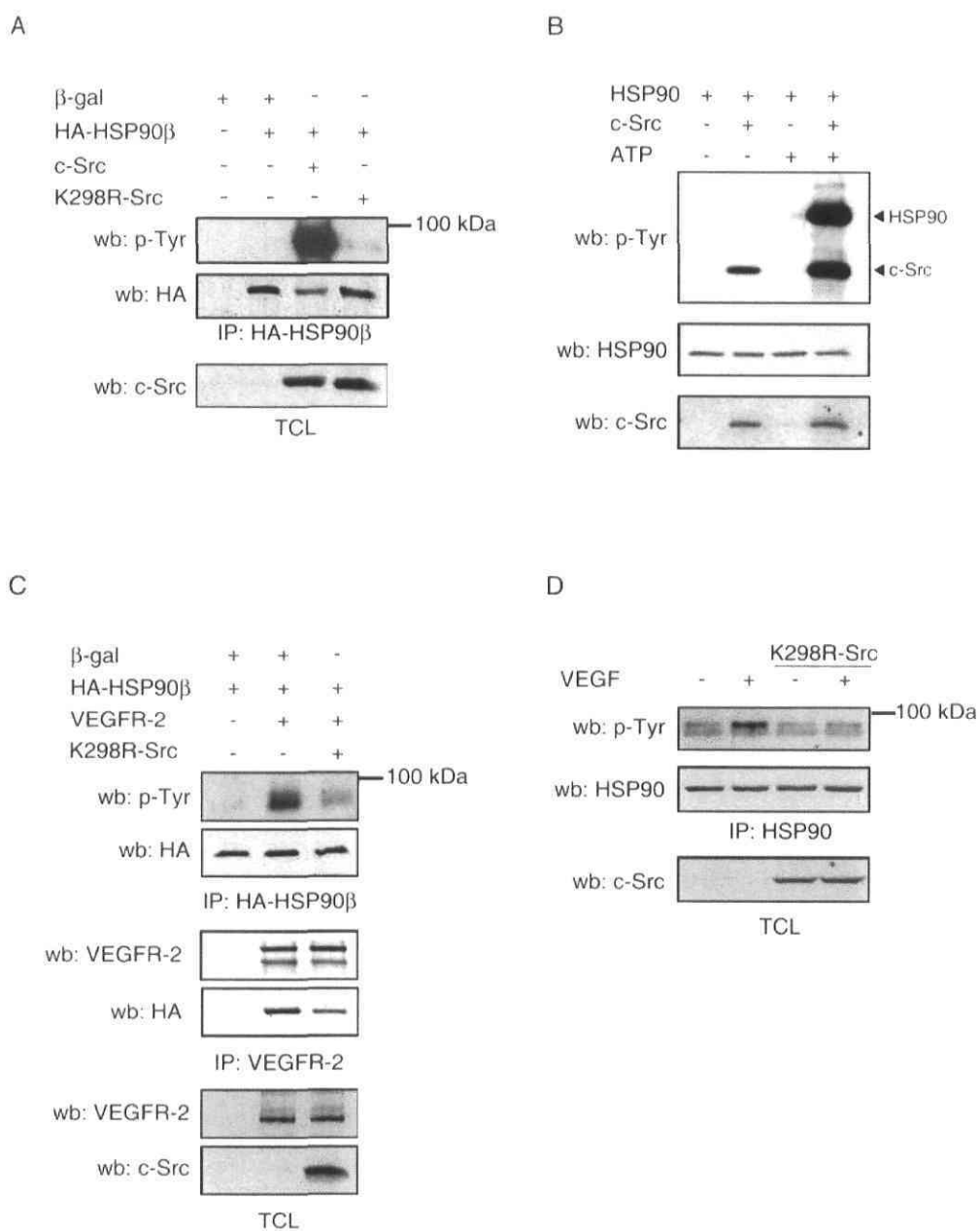


Figure 5

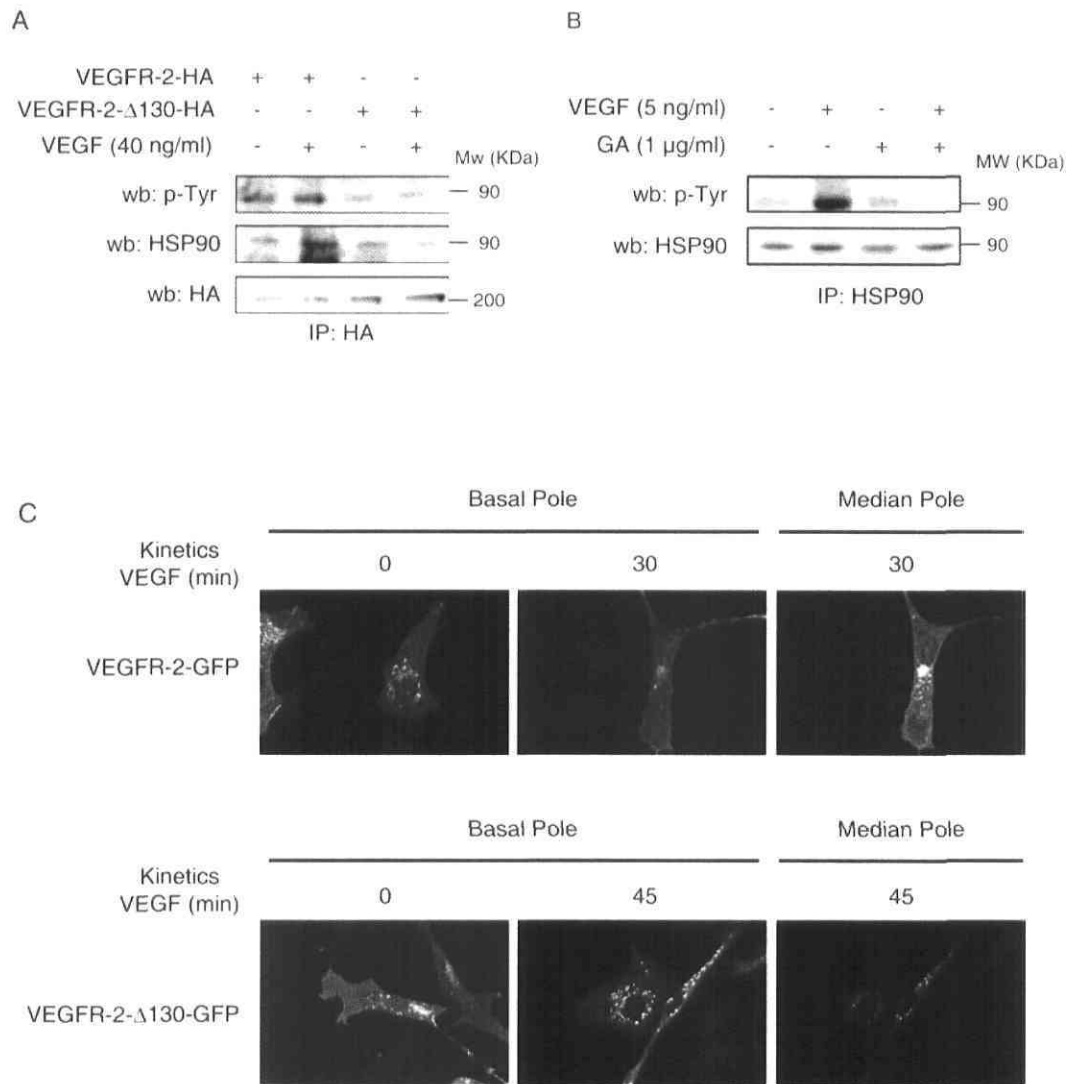
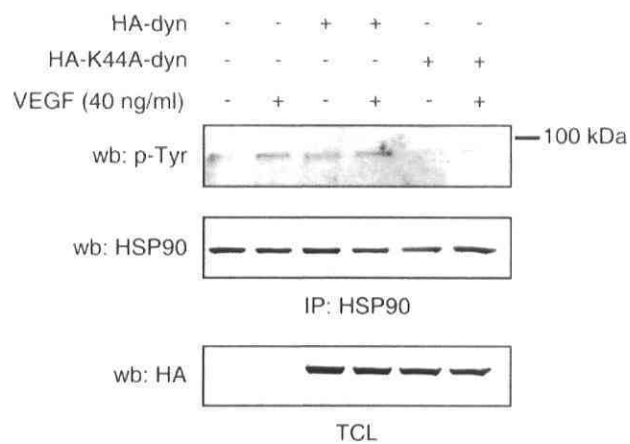
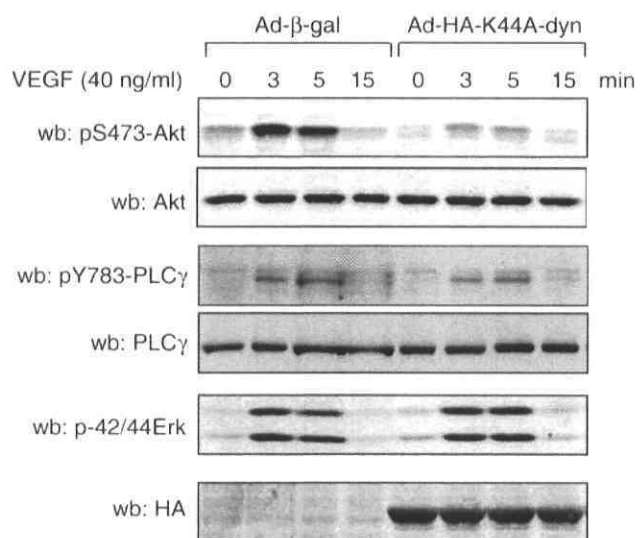


Figure 6

A



B



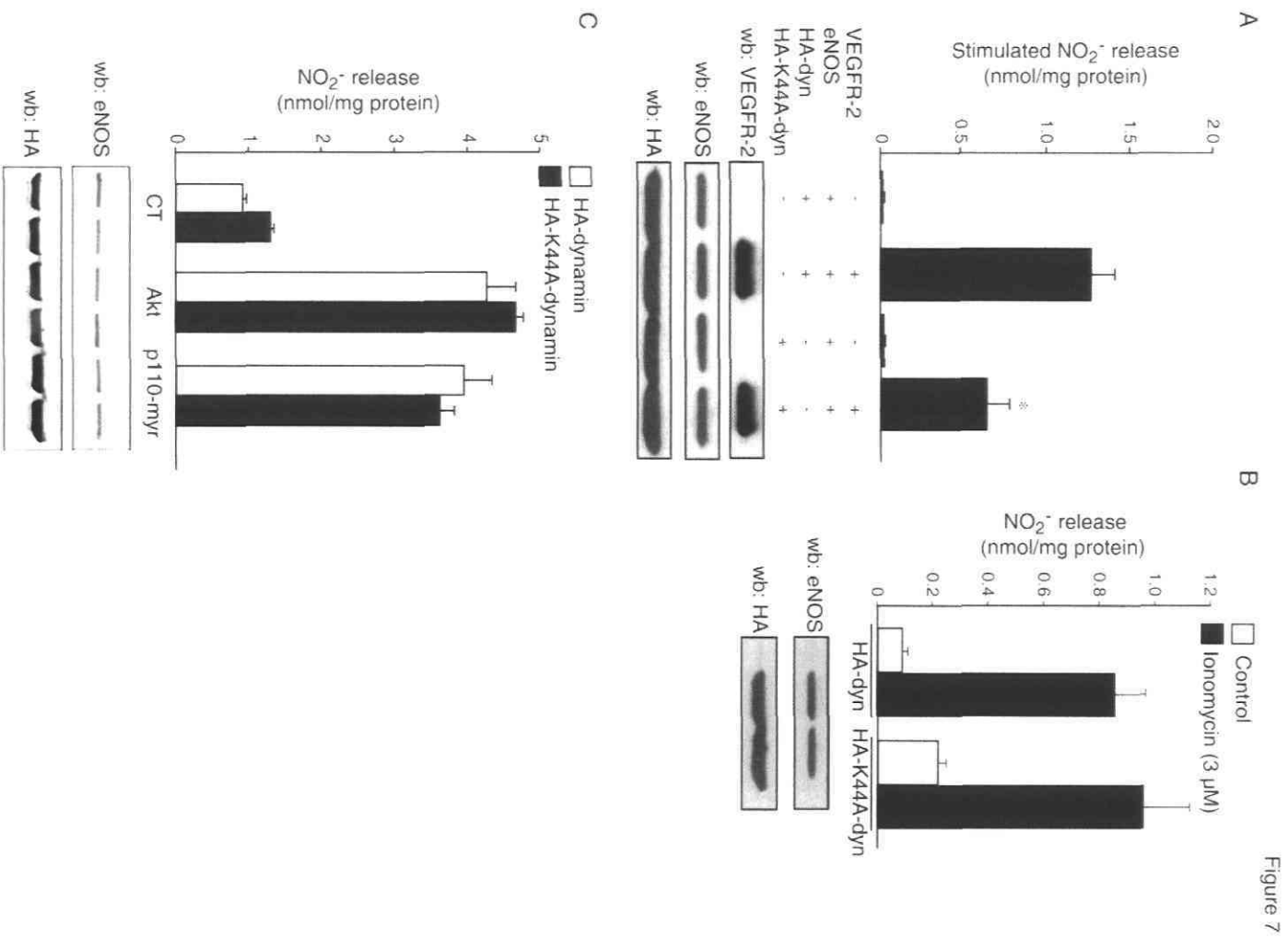


Figure 7

ANNEXE B

Curriculum Vitae

B. CV *Curriculum Vitae*

Dans cette section, on retrouve la liste de mes publications et communications présentées au cours de mes études graduées. Les publications ont fait l'objet de chapitres de cette thèse (2, 3), à l'exception de l'article en collaboration avec le Dr Gratton qui sera soumis sous peu. Ce dernier projet en relation avec mon travail m'a en effet permis une collaboration.

B.1 Publications

Fabrice Le Bœuf, François Houle, Mark Sussman and Jacques Huot. Phosphorylation of FAK on Ser732 is induced by ROCK and is essential for Pyk2-mediated phosphorylation of FAK on Tyr407 in response to VEGF. *Mol. Cell. Biol.* (*Accepté avec modifications le 20 Janvier 2006, Resoumis le 4 Mai 2006*)

Martine Duval, **Fabrice Le Bœuf**, Jacques Huot and Jean-Philippe Gratton. Dynamin-dependent internalization of VEGFR-2 modulates the tyrosine phosphorylation of HSP90 and eNOS signaling in endothelial cells.

Fabrice Le Boeuf, François Houle and Jacques Huot. Regulation of VEGFR2-mediated phosphorylation of focal adhesion kinase by heat shock protein 90 and Src kinase activities. *J. Biol. Chem.* **279**(37) : p. 39175-39185

Stéphanie Coupel, **Fabrice LeBoeuf**, Gwenola Boulday, Jean-Paul Soulillou, and Béatrice Charreau. RhoA Activation Mediates Phosphatidylinositol 3-Kinase-Dependent Proliferation of Human Vascular Endothelial Cells: An Alloimmune Mechanism of Chronic Allograft Nephropathy. *J Am Soc Nephrol* **15**(9) : p. 2429–2439

B.2 Communications

B.2.1 communications Orales

Fabrice le Boeuf* and Jacques Huot. Mechanisms regulating activation and functions of FAK in response to VEGF in endothelial cells. Ottawa Health Research Institut, Ottawa, 23 septembre 2005. **Conférencier invité.*

Fabrice Le Boeuf, François Houle and Jacques Huot. Role of HSP90, ROCK and PYK2 in regulating mediated phosphorylation of focal adhesion kinase in VEGFR2-activation. FIFTH ESH EUROCONFERENCE ON ANGIOGENESIS. Sitges, Espagne- 27 au 30 Mai, 2005. *Bourse de congrès obtenue.*

Fabrice Le Boeuf, François Houle and Jacques Huot. Concerted role of HSP90 and Src kinase activities in regulating VEGFR2-mediated phosphorylation of focal adhesion kinase in response to VEGF. INTERDISCIPLINARY EUROCONFERENCE IV ON ANGIOGENESIS.. Helsinki, Finlande - 21 au 24 Mai, 2004. *Bourse de congrès obtenue.*

Fabrice Le Boeuf#, Laurent Lamalice# and Jacques Huot. VEGFR2-mediated activation of SAPK2/p38 and FAK in response to VEGF. SIGNALLING IN NORMAL AND CANCER CELLS, Banff, Alberta, CANADA, 26 au 30 Mars 2004. # *Contribution égale.*

LeBoeuf F, Houle F and Huot J. Role of HSP90 in regulating VEGFR2 and integrin $\alpha\beta3$ -mediated activation of FAK in response to VEGF. 1ST INTERNATIONAL CONGRESS ON STRESS RESPONSE IN BIOLOGY AND MEDICINE, Mt St Anne, CANADA, 10 au 14 Septembre 2003.

Huot J., Lamalice L., **Le Boeuf F.** et Houle F. Étapes moléculaires conduisant à l'activation de la MAP Kinase SAPK2/p38 et de la kinase d'adhérence focale FAK par le récepteur VEGFR2 du VEGF. Signalisation Québec. Québec, Juillet 2003.

LeBoeuf F, Houle F and Huot J. The activation of focal adhesion kinase by VEGF requires the concerted activation of the VEGFR2-HSP90 and $\alpha\beta3$ integrin-Src pathways. Stress signaling in cancer, Québec, CANADA, 25 au 27 Juillet 2003.

LeBoeuf F, Houle F and Huot J. Concerted role of HSP90 and Src in regulating VEGFR2 and integrin $\alpha v \beta 3$ -mediated activation of focal adhesion kinase in response to VEGF. Protein Phosphorylation & Cell Signaling, Cold Spring Harbor Laboratory, NY, USA, 14 au 18 Mai 2003.

LeBoeuf F., Coupel S., Boulday G., Le Bas-Bernardet S., Soullillou JP. & Charreau B. Anti-class I HLA antibodies promote angiogenesis through RHOA and IL-8 regulation in human endothelial cells. ATC, Avril 2002, Washington, USA.

Coupel S., Pallier A., **Le Boeuf F.**, Boulday G., Moreau A., Soullillou JP. And Charreau B. In vivo assessment of endothelial cell activation in response to human xenogeneic antibodies. IV Congress of the international Xenotransplantation Association, 29 Septembre au 3 Octobre, 2001, Chicago, USA.

Le Boeuf F., Boulday G., Le Bas-Bernardet S., Soullillou JP. and Charreau B. Differential gene expression mediated by anti-HLA class I antibodies in endothelial cells. 10th Congress of the European Society for organ Transplantation, 6-11 Octobre 2001, Lisbonne, PORTUGAL.

B.2.2. Autres réalisations

Le Boeuf Fabrice, Houle François et Huot Jacques. *Rôle de HSP90 et de RhoA dans l'activation de la Kinase d'Adhérence Focale FAK induite par le récepteur VEGFR2 du VEGF.* Centre de recherche de l'Hôtel Dieu de Québec, CANADA, Août 2004. **Premier prix des affiches**

LE BOEUF Fabrice, Houle François et Huot Jacques. *Rôle de HSP90 et de RhoA dans l'activation de la Kinase d'Adhérence Focale FAK induite par le récepteur VEGFR2 du Vascular endothelial Growth Factor.* 6^e Journée de la recherche, faculté de Médecine, Université Laval, Québec, CANADA, 3 Juin 2004. **Premier prix des oraux**

LeBoeuf F, Houle F and Huot J. *Rôle de HSP90 dans l'activation de FAK induit par le VEGFR2 et l'intégrine $\alpha\beta3$ en réponse au VEGF*. Centre de recherche de l'Hôtel Dieu de Québec, CANADA, Août 2003. **Premier prix des oraux**

LeBoeuf F, Houle F and Huot J. *Rôles Complémentaires de Hsp90 et de Src dans l'Activation de FAK par le VEGF*. Centre de recherche de l'Hôtel Dieu de Québec, CANADA, Août 2002.

Le Boeuf F. et Charreau B. *Étude de l'activation des cellules endothéliales par l'interaction des alloanticorps anti-HLA de classe I. Application de la technique de RNA differential Display*. Université de Médecine, Dijon, FRANCE, Septembre 2001.

Le Boeuf F. et Breathnach R. *TIA-1, molécule effectrice contrôlant l'épissage alternatif*. Université des Sciences, Nantes, FRANCE, Juin 2000.

Bibliographie

- Abedi, H. and I. Zachary (1997). "Vascular endothelial growth factor stimulates tyrosine phosphorylation and recruitment to new focal adhesions of focal adhesion kinase and paxillin in endothelial cells." *J Biol Chem* **272**(24): 15442-51.
- Abu-Ghazaleh, R., J. Kabir, et al. (2001). "Src mediates stimulation by vascular endothelial growth factor of the phosphorylation of focal adhesion kinase at tyrosine 861, and migration and anti-apoptosis in endothelial cells." *Biochem J* **360**(Pt 1): 255-64.
- Arold, S. T., M. K. Hoellerer, et al. (2002). "The structural basis of localization and signaling by the focal adhesion targeting domain." *Structure* **10**(3): 319-27.
- Avraham, H., S. Y. Park, et al. (2000). "RAFTK/Pyk2-mediated cellular signalling." *Cell Signal* **12**(3): 123-33.
- Avraham, H. K., T. H. Lee, et al. (2003). "Vascular endothelial growth factor regulates focal adhesion assembly in human brain microvascular endothelial cells through activation of the focal adhesion kinase and related adhesion focal tyrosine kinase." *J Biol Chem* **278**(38): 36661-8. Epub 2003 Jul 3.
- Avraham, S., R. London, et al. (1995). "Identification and characterization of a novel related adhesion focal tyrosine kinase (RAFTK) from megakaryocytes and brain." *J Biol Chem* **270**(46): 27742-51.
- Barleon, B., G. Siemeister, et al. (1997). "Vascular endothelial growth factor up-regulates its receptor fms-like tyrosine kinase 1 (FLT-1) and a soluble variant of FLT-1 in human vascular endothelial cells." *Cancer Res* **57**(23): 5421-5.
- Belletti, B., P. Ferraro, et al. (1999). "Modulation of in vivo growth of thyroid tumor-derived cell lines by sense and antisense vascular endothelial growth factor gene." *Oncogene* **18**(34): 4860-9.
- Bellis, S. L., J. T. Miller, et al. (1995). "Characterization of tyrosine phosphorylation of paxillin in vitro by focal adhesion kinase." *J Biol Chem* **270**(29): 17437-41.
- Bernatchez, P. N., S. Soker, et al. (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): 31047-54.
- Bernatchez, P. N., S. Soker, et al. (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): 31047-54.
- Bisht, K. S., C. M. Bradbury, et al. (2003). "Geldanamycin and 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin potentiate the in vitro and in vivo radiation response of cervical tumor cells via the heat shock protein 90-mediated intracellular signaling and cytotoxicity." *Cancer Res* **63**(24): 8984-95.
- Bohnsack, B. L. and K. K. Hirschi (2003). "The FAKs about blood vessel assembly." *Circ Res* **92**(3): 255-7.

- Borges, E., Y. Jan, et al. (2000). "PDGF-receptor-(beta) and EGF-receptor-2 bind to the (beta)3 integrin through its extracellular domain." J Biol Chem.
- Breier, G., U. Albrecht, et al. (1992). "Expression of vascular endothelial growth factor during embryonic angiogenesis and endothelial cell differentiation." Development **114**(2): 521-32.
- Brogi, E., T. Wu, et al. (1994). "Indirect angiogenic cytokines upregulate VEGF and bFGF gene expression in vascular smooth muscle cells, whereas hypoxia upregulates VEGF expression only." Circulation **90**(2): 649-52.
- Brooks, P. C., R. A. Clark, et al. (1994). "Requirement of vascular integrin alpha v beta 3 for angiogenesis." Science **264**(5158): 569-71.
- Brooks, P. C., A. M. Montgomery, et al. (1994). "Integrin alpha v beta 3 antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels." Cell **79**(7): 1157-64.
- Burrows, F., H. Zhang, et al. (2004). "Hsp90 activation and cell cycle regulation." Cell Cycle **3**(12): 1530-6.
- Butler, B. and S. D. Blystone (2005). "Tyrosine phosphorylation of beta3 integrin provides a binding site for Pyk2." J Biol Chem **280**(15): 14556-62.
- Byzova, T. V., W. Kim, et al. (2000). "Activation of integrin alpha(V)beta(3) regulates cell adhesion and migration to bone sialoprotein." Exp Cell Res **254**(2): 299-308.
- Cai, H. and R. R. Reed (1999). "Cloning and characterization of neuropilin-1-interacting protein: a PSD-95/Dlg/ZO-1 domain-containing protein that interacts with the cytoplasmic domain of neuropilin-1." J Neurosci **19**(15): 6519-27.
- Calalb, M. B., T. R. Polte, et al. (1995). "Tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase at sites in the catalytic domain regulates kinase activity: a role for Src family kinases." Mol Cell Biol **15**(2): 954-63.
- Carmeliet, P. (2003). "Angiogenesis in health and disease." Nat Med **9**(6): 653-60.
- Carmeliet, P. (2005). "Angiogenesis in life, disease and medicine." Nature **438**(7070): 932-6.
- Carmeliet, P., V. Ferreira, et al. (1996). "Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele." Nature **380**(6573): 435-9.
- Cary, L. A., J. F. Chang, et al. (1996). "Stimulation of cell migration by overexpression of focal adhesion kinase and its association with Src and Fyn." J Cell Sci **109** (Pt 7): 1787-94.
- Charo, I. F., L. Nannizzi, et al. (1990). "The vitronectin receptor alpha v beta 3 binds fibronectin and acts in concert with alpha 5 beta 1 in promoting cellular attachment and spreading on fibronectin." J Cell Biol **111**(6 Pt 1): 2795-800.
- Chen, B. H., J. T. Tzen, et al. (2002). "Roles of Rho-associated kinase and myosin light chain kinase in morphological and migratory defects of focal adhesion kinase-null cells." J Biol Chem **277**(37): 33857-63.

- Chen, H. C. and J. L. Guan (1994). "Association of focal adhesion kinase with its potential substrate phosphatidylinositol 3-kinase." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(21): 10148-52.
- Chen, R., O. Kim, et al. (2001). "Regulation of the PH-domain-containing tyrosine kinase Etk by focal adhesion kinase through the FERM domain." Nat Cell Biol **3**(5): 439-44.
- Cheresh, D. A., R. Pytela, et al. (1987). "An Arg-Gly-Asp-directed receptor on the surface of human melanoma cells exists in an divalent cation-dependent functional complex with the disialoganglioside GD2." J Cell Biol **105**(3): 1163-73.
- Clyman, R. I., F. Mauray, et al. (1992). "Beta 1 and beta 3 integrins have different roles in the adhesion and migration of vascular smooth muscle cells on extracellular matrix." Exp Cell Res **200**(2): 272-84.
- Cobb, B. S., M. D. Schaller, et al. (1994). "Stable association of pp60src and pp59fyn with the focal adhesion-associated protein tyrosine kinase, pp125FAK." Mol Cell Biol **14**(1): 147-55.
- Connolly, D. T., J. V. Olander, et al. (1989). "Human vascular permeability factor. Isolation from U937 cells." J Biol Chem **264**(33): 20017-24.
- Cornillon, J., L. Campos, et al. (2003). "[Focal adhesion kinase (FAK), a multifunctional protein]." Med Sci (Paris) **19**(6-7): 743-52.
- Courter, D. L., L. Lomas, et al. (2005). "Src kinase activity is required for integrin alphaVbeta3-mediated activation of nuclear factor-kappaB." J Biol Chem **280**(13): 12145-51.
- Danilkovitch, A., S. Donley, et al. (2000). "Two independent signaling pathways mediate the antiapoptotic action of macrophage-stimulating protein on epithelial cells." Mol Cell Biol **20**(6): 2218-27.
- Davis, G. E. (1992). "Affinity of integrins for damaged extracellular matrix: alpha v beta 3 binds to denatured collagen type I through RGD sites." Biochem Biophys Res Commun **182**(3): 1025-31.
- de Melker, A. A. and A. Sonnenberg (1999). "Integrins: alternative splicing as a mechanism to regulate ligand binding and integrin signaling events." Bioessays **21**(6): 499-509.
- Dikic, I., I. Dikic, et al. (1998). "Identification of a new Pyk2 isoform implicated in chemokine and antigen receptor signaling." J Biol Chem **273**(23): 14301-8.
- DiPalma, T., M. Tucci, et al. (1996). "The placenta growth factor gene of the mouse." Mamm Genome **7**(1): 6-12.
- Drake, C. J., D. A. Cheresh, et al. (1995). "An antagonist of integrin alpha v beta 3 prevents maturation of blood vessels during embryonic neovascularization." J Cell Sci **108** (Pt 7): 2655-61.

- Dunty, J. M. and M. D. Schaller (2002). "The N termini of focal adhesion kinase family members regulate substrate phosphorylation, localization, and cell morphology." J Biol Chem **277**(47): 45644-54.
- Eide, B. L., C. W. Turck, et al. (1995). "Identification of Tyr-397 as the primary site of tyrosine phosphorylation and pp60src association in the focal adhesion kinase, pp125FAK." Mol Cell Biol **15**(5): 2819-27.
- Eliceiri, B. (2003). "Mechanisms of signal transduction in vascular permeability: potential targets." Pathophysiol Haemost Thromb **33 Suppl 1**: 5-6.
- Eliceiri, B. P., R. Klemke, et al. (1998). "Integrin alphavbeta3 requirement for sustained mitogen-activated protein kinase activity during angiogenesis." J Cell Biol **140**(5): 1255-63.
- Eliceiri, B. P., X. S. Puente, et al. (2002). "Src-mediated coupling of focal adhesion kinase to integrin alpha(v)beta5 in vascular endothelial growth factor signaling." J Cell Biol **157**(1): 149-60.
- Eriksson, U. and K. Alitalo (1999). "Structure, expression and receptor-binding properties of novel vascular endothelial growth factors." Curr Top Microbiol Immunol **237**: 41-57.
- Fan, R. S., R. O. Jacamo, et al. (2005). "G protein-coupled receptor activation rapidly stimulates focal adhesion kinase phosphorylation at Ser-843. Mediation by Ca²⁺, calmodulin, and Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II." J Biol Chem **280**(25): 24212-20.
- Farnebo, F., F. Piehl, et al. (1999). "Restricted expression pattern of vegf-d in the adult and fetal mouse: high expression in the embryonic lung." Biochem Biophys Res Commun **257**(3): 891-4.
- Ferrara, N. (1999). "Molecular and biological properties of vascular endothelial growth factor." J Mol Med **77**(7): 527-43.
- Ferrara, N. and S. Bunting (1996). "Vascular endothelial growth factor, a specific regulator of angiogenesis." Curr Opin Nephrol Hypertens **5**(1): 35-44.
- Ferrara, N. and T. Davis-Smyth (1997). "The biology of vascular endothelial growth factor." Endocr Rev **18**(1): 4-25.
- Ferrara, N., H. P. Gerber, et al. (2003). "The biology of VEGF and its receptors." Nat Med **9**(6): 669-76.
- Ferrara, N. and R. S. Kerbel (2005). "Angiogenesis as a therapeutic target." Nature **438**(7070): 967-74.
- Frame, M. C. (2004). "Newest findings on the oldest oncogene; how activated src does it." J Cell Sci **117**(Pt 7): 989-98.
- Franke, T. F., D. R. Kaplan, et al. (1997). "PI3K: downstream AKTion blocks apoptosis." Cell **88**(4): 435-7.

- Friedlander, M., P. C. Brooks, et al. (1995). "Definition of two angiogenic pathways by distinct alpha v integrins." Science **270**(5241): 1500-2.
- Gerber, H. P., A. McMurtry, et al. (1998). "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 **273**(46): 30336-43.
- Germer, M., S. M. Kanse, et al. (1998). "Kinetic analysis of integrin-dependent cell adhesion on vitronectin--the inhibitory potential of plasminogen activator inhibitor-1 and RGD peptides." Eur J Biochem **253**(3): 669-74.
- Giancotti, F. G. and E. Ruoslahti (1999). "Integrin signaling." Science **285**(5430): 1028-32.
- Gluzman-Poltorak, Z., T. Cohen, et al. (2000). "Neuropilin-2 is a receptor for the vascular endothelial growth factor (VEGF) forms VEGF-145 and VEGF-165 [corrected]." J Biol Chem **275**(24): 18040-5.
- Golubovskaya, V., L. Beviglia, et al. (2002). "Dual inhibition of focal adhesion kinase and epidermal growth factor receptor pathways cooperatively induces death receptor-mediated apoptosis in human breast cancer cells." J Biol Chem **277**(41): 38978-87.
- Guan, J. L., J. E. Trevithick, et al. (1991). "Fibronectin/integrin interaction induces tyrosine phosphorylation of a 120-kDa protein." Cell Regul **2**(11): 951-64.
- Guo, D. Q., L. W. Wu, et al. (2000). "Tumor necrosis factor employs a protein-tyrosine phosphatase to inhibit activation of KDR and vascular endothelial cell growth factor-induced endothelial cell proliferation." J Biol Chem **275**(15): 11216-21.
- Han, D. C. and J. L. Guan (1999). "Association of focal adhesion kinase with Grb7 and its role in cell migration." J Biol Chem **274**(34): 24425-30.
- Hanks, S. K., M. B. Calalb, et al. (1992). "Focal adhesion protein-tyrosine kinase phosphorylated in response to cell attachment to fibronectin." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(18): 8487-91.
- Hanks, S. K., L. Ryzhova, et al. (2003). "Focal adhesion kinase signaling activities and their implications in the control of cell survival and motility." Front Biosci **8**: d982-96.
- Harte, M. T., J. D. Hildebrand, et al. (1996). "p130Cas, a substrate associated with v-Src and v-Crk, localizes to focal adhesions and binds to focal adhesion kinase." J Biol Chem **271**(23): 13649-55.
- Hauck, C. R., D. A. Hsia, et al. (2002). "v-Src SH3-enhanced interaction with focal adhesion kinase at beta 1 integrin-containing invadopodia promotes cell invasion." J Biol Chem **277**(15): 12487-90.
- Hauck, C. R., D. A. Hsia, et al. (2002). "FRNK blocks v-Src-stimulated invasion and experimental metastases without effects on cell motility or growth." Embo J **21**(23): 6289-302.

- Hauck, C. R., D. J. Sieg, et al. (2001). "Inhibition of focal adhesion kinase expression or activity disrupts epidermal growth factor-stimulated signaling promoting the migration of invasive human carcinoma cells." Cancer Res **61**(19): 7079-90.
- Hayashi, I., K. Vuori, et al. (2002). "The focal adhesion targeting (FAT) region of focal adhesion kinase is a four-helix bundle that binds paxillin." Nat Struct Biol **9**(2): 101-6.
- Helmbrecht, K., E. Zeise, et al. (2000). "Chaperones in cell cycle regulation and mitogenic signal transduction: a review." Cell Prolif **33**(6): 341-65.
- Hildebrand, J. D., M. D. Schaller, et al. (1995). "Paxillin, a tyrosine phosphorylated focal adhesion-associated protein binds to the carboxyl terminal domain of focal adhesion kinase." Mol Biol Cell **6**(6): 637-47.
- Holash, J., S. Davis, et al. (2002). "VEGF-Trap: a VEGF blocker with potent antitumor effects." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(17): 11393-8.
- Holmqvist, K., M. J. Cross, et al. (2004). "The adaptor protein Shb binds to tyrosine 1175 in the VEGFR-2 and regulates VEGF-dependent cellular migration." J Biol Chem **16**: 16.
- Hood, J. D. and D. A. Cheresh (2002). "Role of integrins in cell invasion and migration." Nat Rev Cancer **2**(2): 91-100.
- Houck, K. A., D. W. Leung, et al. (1992). "Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms." J Biol Chem **267**(36): 26031-7.
- Huot, J., F. Houle, et al. (1997). "Oxidative stress-induced actin reorganization mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase/heat shock protein 27 pathway in vascular endothelial cells." Circ Res **80**(3): 383-92.
- Huot, J., F. Houle, et al. (1998). "SAPK2/p38-dependent F-actin reorganization regulates early membrane blebbing during stress-induced apoptosis." J Cell Biol **143**(5): 1361-73.
- Huot, J., F. Houle, et al. (1996). "HSP27 phosphorylation-mediated resistance against actin fragmentation and cell death induced by oxidative stress." Cancer Res **56**(2): 273-9.
- Hynes, R. O. (1992). "Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion." Cell **69**(1): 11-25.
- Ilic, D., Y. Furuta, et al. (1995). "Reduced cell motility and enhanced focal adhesion contact formation in cells from FAK-deficient mice." Nature **377**(6549): 539-44.
- Isaacs, J. S., W. Xu, et al. (2003). "Heat shock protein 90 as a molecular target for cancer therapeutics." Cancer Cell **3**(3): 213-7.
- Ishizaki, T., M. Naito, et al. (1997). "p160ROCK, a Rho-associated coiled-coil forming protein kinase, works downstream of Rho and induces focal adhesions." FEBS Lett **404**(2-3): 118-24.

- Jones, R. J., V. G. Brunton, et al. (2000). "Adhesion-linked kinases in cancer; emphasis on src, focal adhesion kinase and PI 3-kinase." Eur J Cancer **36**(13 Spec No): 1595-606.
- Kamal, A., M. F. Boehm, et al. (2004). "Therapeutic and diagnostic implications of Hsp90 activation." Trends Mol Med **10**(6): 283-90.
- Kanno, S., N. Oda, et al. (2000). "Roles of two VEGF receptors, Flt-1 and KDR, in the signal transduction of VEGF effects in human vascular endothelial cells." Oncogene **19**(17): 2138-46.
- Kawasaki, T., T. Kitsukawa, et al. (1999). "A requirement for neuropilin-1 in embryonic vessel formation." Development **126**(21): 4895-902.
- Kitsukawa, T., A. Shimono, et al. (1995). "Overexpression of a membrane protein, neuropilin, in chimeric mice causes anomalies in the cardiovascular system, nervous system and limbs." Development **121**(12): 4309-18.
- Klingbeil, C. K., C. R. Hauck, et al. (2001). "Targeting Pyk2 to beta 1-integrin-containing focal contacts rescues fibronectin-stimulated signaling and haptotactic motility defects of focal adhesion kinase-null cells." J Cell Biol **152**(1): 97-110.
- Kobayashi, S., A. Sawano, et al. (2004). "The c-Cbl/CD2AP complex regulates VEGF-induced endocytosis and degradation of Flt-1 (VEGFR-1)." Faseb J **18**(7): 929-31.
- Kornberg, L., H. S. Earp, et al. (1992). "Cell adhesion or integrin clustering increases phosphorylation of a focal adhesion-associated tyrosine kinase." J Biol Chem **267**(33): 23439-42.
- Kroll, J. and J. Waltenberger (1997). "The vascular endothelial growth factor receptor KDR activates multiple signal transduction pathways in porcine aortic endothelial cells." J Biol Chem **272**(51): 32521-7.
- Ladoux, A. and C. Frelin (1993). "Hypoxia is a strong inducer of vascular endothelial growth factor mRNA expression in the heart." Biochem Biophys Res Commun **195**(2): 1005-10.
- Lamallice, L., F. Houle, et al. (2004). "Phosphorylation of tyrosine 1214 on VEGFR2 is required for VEGF-induced activation of Cdc42 upstream of SAPK2/p38." Oncogene **23**(2): 434-45.
- Lang, V., J. Janzen, et al. (2003). "betaTrCP-mediated proteolysis of NF-kappaB1 p105 requires phosphorylation of p105 serines 927 and 932." Mol Cell Biol **23**(1): 402-13.
- Le Boeuf, F., F. Houle, et al. (2004). "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 **279**(37): 39175-85. Epub 2004 Jul 6.
- Leu, T. H. and M. C. Maa (2002). "Tyr-863 phosphorylation enhances focal adhesion kinase autophosphorylation at Tyr-397." Oncogene **21**(46): 6992-7000.

- Lev, S., H. Moreno, et al. (1995). "Protein tyrosine kinase PYK2 involved in Ca(2+)-induced regulation of ion channel and MAP kinase functions." Nature **376**(6543): 737-45.
- Levy, A. P., N. S. Levy, et al. (1996). "Post-transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor by hypoxia." J Biol Chem **271**(5): 2746-53.
- Li, X., R. C. Dy, et al. (1999). "Interactions between two cytoskeleton-associated tyrosine kinases: calcium-dependent tyrosine kinase and focal adhesion tyrosine kinase." J Biol Chem **274**(13): 8917-24.
- Lipfert, L., B. Haimovich, et al. (1992). "Integrin-dependent phosphorylation and activation of the protein tyrosine kinase pp125FAK in platelets." J Cell Biol **119**(4): 905-12.
- Liu, S., W. Kiosses, et al. (2002). "A fragment of Paxillin binds the alpha 4 integrin cytoplasmic domain (Tail) and selectively inhibits {alpha}4-mediated cell migration." J Biol Chem **277**: 27.
- Lu, D., P. Kussie, et al. (2000). "Identification of the residues in the extracellular region of KDR important for interaction with vascular endothelial growth factor and neutralizing anti-KDR antibodies." J Biol Chem **275**(19): 14321-30.
- Ma, A., A. Richardson, et al. (2001). "Serine phosphorylation of focal adhesion kinase in interphase and mitosis: a possible role in modulating binding to p130(Cas)." Mol Biol Cell **12**(1): 1-12.
- Makinen, T., B. Olofsson, et al. (1999). "Differential binding of vascular endothelial growth factor B splice and proteolytic isoforms to neuropilin-1." J Biol Chem **274**(30): 21217-22.
- Marti, H. J., M. Bernaudin, et al. (2000). "Hypoxia-induced vascular endothelial growth factor expression precedes neovascularization after cerebral ischemia." Am J Pathol **156**(3): 965-76.
- Masson-Gadais, B., F. Houle, et al. (2003). "Integrin alphavbeta3, requirement for VEGFR2-mediated activation of SAPK2/p38 and for Hsp90-dependent phosphorylation of focal adhesion kinase in endothelial cells activated by VEGF." Cell Stress Chaperones **8**(1): 37-52.
- Matsumoto, T. and L. Claesson-Welsh (2001). "VEGF receptor signal transduction." Sci STKE **2001**(112): RE21.
- Matsumura, F. (2005). "Regulation of myosin II during cytokinesis in higher eukaryotes." Trends Cell Biol **15**(7): 371-7.
- McLean, G. W., V. J. Fincham, et al. (2000). "v-Src induces tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase independently of tyrosine 397 and formation of a complex with Src." J Biol Chem **275**(30): 23333-9.
- Melendez, J., C. Turner, et al. (2004). "Cardiomyocyte apoptosis triggered by RAFTK/pyk2 via Src kinase is antagonized by paxillin." J Biol Chem **279**(51): 53516-23.

- Meyer, M., M. Clauss, et al. (1999). "A novel vascular endothelial growth factor encoded by Orf virus, VEGF-E, mediates angiogenesis via signalling through VEGFR-2 (KDR) but not VEGFR-1 (Flt-1) receptor tyrosine kinases." Embo J **18**(2): 363-74.
- Miao, H. Q., P. Lee, et al. (2000). "Neuropilin-1 expression by tumor cells promotes tumor angiogenesis and progression." Faseb J **14**(15): 2532-9.
- Mimnaugh, E. G., C. Chavany, et al. (1996). "Polyubiquitination and proteasomal degradation of the p185c-erbB-2 receptor protein-tyrosine kinase induced by geldanamycin." J Biol Chem **271**(37): 22796-801.
- Mitra, S. K., D. A. Hanson, et al. (2005). "Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility." Nat Rev Mol Cell Biol **6**(1): 56-68.
- Mortier, E., F. Cornelissen, et al. (2001). "The focal adhesion targeting sequence is the major inhibitory moiety of Fak-related non-kinase." Cell Signal **13**(12): 901-9.
- Nakamura, K., H. Yano, et al. (2001). "Different modes and qualities of tyrosine phosphorylation of Fak and Pyk2 during epithelial-mesenchymal transdifferentiation and cell migration: analysis of specific phosphorylation events using site-directed antibodies." Oncogene **20**(21): 2626-35.
- Neagoe, P. E., C. Lemieux, et al. (2005). "Vascular endothelial growth factor (VEGF)-A165-induced prostacyclin synthesis requires the activation of VEGF receptor-1 and -2 heterodimer." J Biol Chem **280**(11): 9904-12.
- Nemeth, J. A., M. L. Cher, et al. (2003). "Inhibition of alpha(v)beta3 integrin reduces angiogenesis, bone turnover, and tumor cell proliferation in experimental prostate cancer bone metastases." Clin Exp Metastasis **20**(5): 413-20.
- Nolan, K., J. Lacoste, et al. (1999). "Regulated expression of focal adhesion kinase-related nonkinase, the autonomously expressed C-terminal domain of focal adhesion kinase." Mol Cell Biol **19**(9): 6120-9.
- Nowakowski, J., C. N. Cronin, et al. (2002). "Structures of the cancer-related Aurora-A, FAK, and EphA2 protein kinases from nanovolume crystallography." Structure **10**(12): 1659-67.
- Okigaki, M., C. Davis, et al. (2003). "Pyk2 regulates multiple signaling events crucial for macrophage morphology and migration." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(19): 10740-5.
- Olofsson, B., K. Pajusola, et al. (1996). "Genomic organization of the mouse and human genes for vascular endothelial growth factor B (VEGF-B) and characterization of a second splice isoform." J Biol Chem **271**(32): 19310-7.
- Owen, J. D., P. J. Ruest, et al. (1999). "Induced focal adhesion kinase (FAK) expression in FAK-null cells enhances cell spreading and migration requiring both auto- and activation loop phosphorylation sites and inhibits adhesion-dependent tyrosine phosphorylation of Pyk2." Mol Cell Biol **19**(7): 4806-18.

- Owens, L. V., L. Xu, et al. (1995). "Overexpression of the focal adhesion kinase (p125FAK) in invasive human tumors." Cancer Res **55**(13): 2752-5.
- Paavonen, K., N. Horelli-Kuitunen, et al. (1996). "Novel human vascular endothelial growth factor genes VEGF-B and VEGF-C localize to chromosomes 11q13 and 4q34, respectively." Circulation **93**(6): 1079-82.
- Pajusola, K., O. Aprelikova, et al. (1994). "Signalling properties of FLT4, a proteolytically processed receptor tyrosine kinase related to two VEGF receptors." Oncogene **9**(12): 3545-55.
- Parsons, J. T. (2003). "Focal adhesion kinase: the first ten years." J Cell Sci **116**(Pt 8): 1409-16.
- Parsons, J. T. and S. J. Parsons (1997). "Src family protein tyrosine kinases: cooperating with growth factor and adhesion signaling pathways." Curr Opin Cell Biol **9**(2): 187-92.
- Penta, K., J. A. Varner, et al. (1999). "Dell induces integrin signaling and angiogenesis by ligation of alphaVbeta3." J Biol Chem **274**(16): 11101-9.
- Petitclerc, E., S. Stromblad, et al. (1999). "Integrin alpha(v)beta3 promotes M21 melanoma growth in human skin by regulating tumor cell survival." Cancer Res **59**(11): 2724-30.
- Petrova, T. V., T. Makinen, et al. (1999). "Signaling via vascular endothelial growth factor receptors." Exp Cell Res **253**(1): 117-30.
- Polte, T. R. and S. K. Hanks (1995). "Interaction between focal adhesion kinase and Crk-associated tyrosine kinase substrate p130Cas." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(23): 10678-82.
- Polte, T. R. and S. K. Hanks (1997). "Complexes of focal adhesion kinase (FAK) and Crk-associated substrate (p130(Cas)) are elevated in cytoskeleton-associated fractions following adhesion and Src transformation. Requirements for Src kinase activity and FAK proline-rich motifs." J Biol Chem **272**(9): 5501-9.
- Pratt, W. B. and D. O. Toft (2003). "Regulation of signaling protein function and trafficking by the hsp90/hsp70-based chaperone machinery." Exp Biol Med (Maywood) **228**(2): 111-33.
- Qi, J. H. and L. Claesson-Welsh (2001). "VEGF-induced activation of phosphoinositide 3-kinase is dependent on focal adhesion kinase." Exp Cell Res **263**(1): 173-82.
- Rahimi, N. and A. Kazlauskas (1999). "A role for cadherin-5 in regulation of vascular endothelial growth factor receptor 2 activity in endothelial cells." Mol Biol Cell **10**(10): 3401-7.
- Reiske, H. R., S. C. Kao, et al. (1999). "Requirement of phosphatidylinositol 3-kinase in focal adhesion kinase-promoted cell migration." J Biol Chem **274**(18): 12361-6.

- Richardson, A., R. K. Malik, et al. (1997). "Inhibition of cell spreading by expression of the C-terminal domain of focal adhesion kinase (FAK) is rescued by coexpression of Src or catalytically inactive FAK: a role for paxillin tyrosine phosphorylation." Mol Cell Biol **17**(12): 6906-14.
- Ross, F. P., J. Chappel, et al. (1993). "Interactions between the bone matrix proteins osteopontin and bone sialoprotein and the osteoclast integrin alpha v beta 3 potentiate bone resorption." J Biol Chem **268**(13): 9901-7.
- Rousseau, S., F. Houle, et al. (2000). "Integrating the VEGF Signals Leading to Actin-Based Motility in Vascular Endothelial Cells." Trends Cardiovasc Med **10**(8): 321-327.
- Rousseau, S., F. Houle, et al. (2000). "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 **275**(14): 10661-72.
- Rousseau, S., F. Houle, et al. (1997). "p38 MAP kinase activation by vascular endothelial growth factor mediates actin reorganization and cell migration in human endothelial cells." Oncogene **15**(18): 2169-77.
- Sasaki, H., K. Nagura, et al. (1995). "Cloning and characterization of cell adhesion kinase beta, a novel protein-tyrosine kinase of the focal adhesion kinase subfamily." J Biol Chem **270**(36): 21206-19.
- Sastry, S. K., M. Lakonishok, et al. (1999). "Quantitative changes in integrin and focal adhesion signaling regulate myoblast cell cycle withdrawal." J Cell Biol **144**(6): 1295-309.
- Schaller, M. D. (2004). "FAK and paxillin: regulators of N-cadherin adhesion and inhibitors of cell migration?" J Cell Biol **166**(2): 157-9.
- Schaller, M. D., C. A. Borgman, et al. (1992). "pp125FAK a structurally distinctive protein-tyrosine kinase associated with focal adhesions." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(11): 5192-6.
- Schaller, M. D., C. A. Borgman, et al. (1993). "Autonomous expression of a noncatalytic domain of the focal adhesion-associated protein tyrosine kinase pp125FAK." Mol Cell Biol **13**(2): 785-91.
- Schaller, M. D., J. D. Hildebrand, et al. (1999). "Complex formation with focal adhesion kinase: A mechanism to regulate activity and subcellular localization of Src kinases." Mol Biol Cell **10**(10): 3489-505.
- Schaller, M. D., J. D. Hildebrand, et al. (1994). "Autophosphorylation of the focal adhesion kinase, pp125FAK, directs SH2-dependent binding of pp60src." Mol Cell Biol **14**(3): 1680-8.
- Schaller, M. D., C. A. Otey, et al. (1995). "Focal adhesion kinase and paxillin bind to peptides mimicking beta integrin cytoplasmic domains." J Cell Biol **130**(5): 1181-7.

- Schlaepfer, D. D., S. K. Hanks, et al. (1994). "Integrin-mediated signal transduction linked to Ras pathway by GRB2 binding to focal adhesion kinase." Nature **372**(6508): 786-91.
- Schlaepfer, D. D., C. R. Hauck, et al. (1999). "Signaling through focal adhesion kinase." Prog Biophys Mol Biol **71**(3-4): 435-78.
- Schlaepfer, D. D. and T. Hunter (1996). "Evidence for in vivo phosphorylation of the Grb2 SH2-domain binding site on focal adhesion kinase by Src-family protein-tyrosine kinases." Mol Cell Biol **16**(10): 5623-33.
- Senger, D. R., S. J. Galli, et al. (1983). "Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid." Science **219**(4587): 983-5.
- Shen, Y. and M. D. Schaller (1999). "Focal adhesion targeting: the critical determinant of FAK regulation and substrate phosphorylation." Mol Biol Cell **10**(8): 2507-18.
- Shi, Q. and D. Boettiger (2003). "A Novel Mode for Integrin-mediated Signaling: Tethering Is Required for Phosphorylation of FAK Y397." Mol Biol Cell **14**(10): 4306-15.
- Shibuya, M., N. Ito, et al. (1999). "Structure and function of vascular endothelial growth factor receptor-1 and -2." Curr Top Microbiol Immunol **237**: 59-83.
- Short, S. M., G. A. Talbott, et al. (1998). "Integrin-mediated signaling events in human endothelial cells." Mol Biol Cell **9**(8): 1969-80.
- Shweiki, D., A. Itin, et al. (1993). "Patterns of expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptors in mice suggest a role in hormonally regulated angiogenesis." J Clin Invest **91**(5): 2235-43.
- Sieg, D. J., C. R. Hauck, et al. (2000). "FAK integrates growth-factor and integrin signals to promote cell migration." Nat Cell Biol **2**(5): 249-56.
- Sieg, D. J., C. R. Hauck, et al. (1999). "Required role of focal adhesion kinase (FAK) for integrin-stimulated cell migration." J Cell Sci **112**(Pt 16): 2677-91.
- Slack, J. K., R. B. Adams, et al. (2001). "Alterations in the focal adhesion kinase/Src signal transduction pathway correlate with increased migratory capacity of prostate carcinoma cells." Oncogene **20**(10): 1152-63.
- Soldi, R., S. Mitola, et al. (1999). "Role of alphavbeta3 integrin in the activation of vascular endothelial growth factor receptor-2." Embo J **18**(4): 882-92.
- Stebbins, C. E., A. A. Russo, et al. (1997). "Crystal structure of an Hsp90-geldanamycin complex: targeting of a protein chaperone by an antitumor agent." Cell **89**(2): 239-50.
- Stewart, A., C. Ham, et al. (2002). "The focal adhesion kinase amino-terminal domain localises to nuclei and intercellular junctions in HEK 293 and MDCK cells independently of tyrosine 397 and the carboxy-terminal domain." Biochem Biophys Res Commun **299**(1): 62-73.

- Storgard, C. M., D. G. Stupack, et al. (1999). "Decreased angiogenesis and arthritic disease in rabbits treated with an alphavbeta3 antagonist." *J Clin Invest* **103**(1): 47-54.
- Stupack, D. G., E. Li, et al. (1999). "Matrix valency regulates integrin-mediated lymphoid adhesion via Syk kinase." *J Cell Biol* **144**(4): 777-88.
- Takahashi, A., H. Sasaki, et al. (1994). "Markedly increased amounts of messenger RNAs for vascular endothelial growth factor and placenta growth factor in renal cell carcinoma associated with angiogenesis." *Cancer Res* **54**(15): 4233-7.
- Takahashi, T., H. Ueno, et al. (1999). "VEGF activates protein kinase C-dependent, but Ras-independent Raf-MEK-MAP kinase pathway for DNA synthesis in primary endothelial cells." *Oncogene* **18**(13): 2221-30.
- Takahashi, T., S. Yamaguchi, et al. (2001). "A single autophosphorylation site on KDR/Flk-1 is essential for VEGF-A-dependent activation of PLC-gamma and DNA synthesis in vascular endothelial cells." *Embo J* **20**(11): 2768-2778.
- Tammela, T., B. Enholm, et al. (2005). "The biology of vascular endothelial growth factors." *Cardiovasc Res* **65**(3): 550-63.
- Taylor, J. M., C. P. Mack, et al. (2001). "Selective expression of an endogenous inhibitor of FAK regulates proliferation and migration of vascular smooth muscle cells." *Mol Cell Biol* **21**(5): 1565-72.
- Thomas, S. M., M. Hagel, et al. (1999). "Characterization of a focal adhesion protein, Hic-5, that shares extensive homology with paxillin." *J Cell Sci* **112** (Pt 2): 181-90.
- Totsukawa, G., Y. Yamakita, et al. (2000). "Distinct roles of ROCK (Rho-kinase) and MLCK in spatial regulation of MLC phosphorylation for assembly of stress fibers and focal adhesions in 3T3 fibroblasts." *J Cell Biol* **150**(4): 797-806.
- Toutant, M., A. Costa, et al. (2002). "Alternative splicing controls the mechanisms of FAK autophosphorylation." *Mol Cell Biol* **22**(22): 7731-43.
- Turner, C. E., M. D. Schaller, et al. (1993). "Tyrosine phosphorylation of the focal adhesion kinase pp125FAK during development: relation to paxillin." *J Cell Sci* **105** (Pt 3): 637-45.
- Valencik, M. L. and J. A. McDonald (2001). "Cardiac expression of a gain-of-function alpha(5)-integrin results in perinatal lethality." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **280**(1): H361-7.
- Varner, J. A., M. T. Nakada, et al. (1999). "Inhibition of angiogenesis and tumor growth by murine 7E3, the parent antibody of c7E3 Fab (abciximab; ReoPro)." *Angiogenesis* **3**(1): 53-60.
- Vincenti, V., C. Cassano, et al. (1996). "Assignment of the vascular endothelial growth factor gene to human chromosome 6p21.3." *Circulation* **93**(8): 1493-5.
- Wang, D., J. R. Grammer, et al. (2000). "p125 focal adhesion kinase promotes malignant astrocytoma cell proliferation in vivo." *J Cell Sci* **113** Pt 23: 4221-30.

- Wang, Q., Y. Xie, et al. (2003). "Regulation of the formation of osteoclastic actin rings by proline-rich tyrosine kinase 2 interacting with gelsolin." J Cell Biol **160**(4): 565-75.
- Wang, Z., M. R. Castresana, et al. (2001). "Reactive oxygen and nf-kappab in vegf-induced migration of human vascular smooth muscle cells." Biochem Biophys Res Commun **285**(3): 669-74.
- Webb, D. J., J. T. Parsons, et al. (2002). "Adhesion assembly, disassembly and turnover in migrating cells -- over and over and over again." Nat Cell Biol **4**(4): E97-100.
- Wen, L. P., J. A. Fahrni, et al. (1997). "Cleavage of focal adhesion kinase by caspases during apoptosis." J Biol Chem **272**(41): 26056-61.
- Whitesell, L., E. G. Mimnaugh, et al. (1994). "Inhibition of heat shock protein HSP90-pp60v-src heteroprotein complex formation by benzoquinone ansamycins: essential role for stress proteins in oncogenic transformation." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(18): 8324-8.
- Williams, B., A. Q. Baker, et al. (1995). "Angiotensin II increases vascular permeability factor gene expression by human vascular smooth muscle cells." Hypertension **25**(5): 913-7.
- Xie, Z., K. Sanada, et al. (2003). "Serine 732 phosphorylation of FAK by Cdk5 is important for microtubule organization, nuclear movement, and neuronal migration." Cell **114**(4): 469-82.
- Xie, Z. and L. H. Tsai (2004). "Cdk5 phosphorylation of FAK regulates centrosome-associated microtubules and neuronal migration." Cell Cycle **3**(2): 108-10.
- Xiong, W. and J. T. Parsons (1997). "Induction of apoptosis after expression of PYK2, a tyrosine kinase structurally related to focal adhesion kinase." J Cell Biol **139**(2): 529-39.
- Xu, L. H., L. V. Owens, et al. (1996). "Attenuation of the expression of the focal adhesion kinase induces apoptosis in tumor cells." Cell Growth Differ **7**(4): 413-8.
- Yoneda, A., H. A. Mulhaupt, et al. (2005). "The Rho kinases I and II regulate different aspects of myosin II activity." J Cell Biol **170**(3): 443-53.
- Yu, H., X. Li, et al. (1996). "Activation of a novel calcium-dependent protein-tyrosine kinase. Correlation with c-Jun N-terminal kinase but not mitogen-activated protein kinase activation." J Biol Chem **271**(47): 29993-8.
- Zeng, H., S. Sanyal, et al. (2001). "Tyrosine residues 951 and 1059 of vascular endothelial growth factor receptor-2 (KDR) are essential for vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor-induced endothelium migration and proliferation, respectively." J Biol Chem **276**(35): 32714-9.
- Zhai, J., H. Lin, et al. (2003). "Direct interaction of focal adhesion kinase with p190RhoGEF." J Biol Chem **278**(27): 24865-73.

Zhao, J. H., H. Reiske, et al. (1998). "Regulation of the cell cycle by focal adhesion kinase." J Cell Biol **143**(7): 1997-2008.