

Laboratoire d'angiogenèse moléculaire

Faculté des Sciences—GIGA Institute

Promoteur: Dr. I. Struman



Etude du lien entre la voie de signalisation du VEGF et celle du BMP9:

Implications dans la télangiectasie hémorragique héréditaire

Thomas Pollenus

**Thèse soumise en vue de l'obtention du grade de
docteur en Sciences**

Année académique 2018-2019

Arrivé au bout de ce travail, je tiens à adresser mes plus profonds remerciements à toutes les personnes qui de près ou de loin ont contribué à la réalisation de cette thèse.

Pour commencer, j'aimerais remercier le docteur Ingrid Struman qui m'a permis, depuis la réalisation de mon mémoire, de faire partie de ce laboratoire. Tout simplement merci de m'avoir permis de travailler sur ce projet et de m'avoir donné l'occasion de réaliser cette thèse.

Ensuite, merci à Cécile qui m'a guidée au début de ma thèse avec ses précieux conseils. Je tiens à te remercier également pour ta disponibilité et ta bonne humeur. Merci à toi pour toutes les discussions et tous les bons moments passés lors des longues journées au laboratoire.

Amandine alias Cortex, merci pour ton aide précieuse lors de mes dernières manipulations. J'aimerais également te remercier chaleureusement pour ta joie de vivre qui m'a permis de garder espoir dans les moments plus difficiles. Plus jamais on ne reverra un duo aussi efficace. Un jour on va conquérir le monde (peut-être à ton mariage qui sait).

Anne-So, Al, La Klau Kla et Arny (qui n'aime pas ce surnom), merci pour toutes ces discussions qui très souvent n'aboutissaient à rien mais qui me permettait de rigoler tout au long de la journée. Encore merci pour toutes les soirées et les voyages fait tous ensemble qui nous ont soudés et qu'on oubliera probablement jamais (enfin ça on verra). Un merci tout particulier à Al pour m'avoir laissé l'utiliser comme souffre-douleur, à Anne-So pour m'avoir suivi dans les expéditions petites du labo, à Clau pour m'avoir appris à parler à moitié français et à moitié espagnol et à Arny pour toutes nos discussions (la plupart sportives), nos défis, l'organisation du traditionnel ski annuel et j'en passe.

Merci également à Oli et Mimi, sans qui je pense aucune thèse n'aurait vu le bout du tunnel. Oli merci pour ta disponibilité et les nombreuses qRT dont toi seul détient le secret. Mimi merci pour ta simplicité, pour tous tes petites conseils et aussi je dois l'avouer pour tes fiches de préparations des solutions du laboratoire.

J'aimerais également remercier l'ensemble des membres du laboratoire d'angiogenèse moléculaire et notamment Stel, ma co-doctorante. On a commencé ensemble et on finira également ensemble. Merci pour l'explication de tes 1460 rêves (oui au moins un par jour sur 4 ans) qui sont tous plus tirés par les cheveux les uns que les autres mais qui nous feront toujours autant rire. Merci à Anais qui a contribué à la réalisation d'une bonne partie de ce projet et sans qui ce travail n'aurait pas abouti.

De manière plus globale, merci à toutes les personnes travaillant au premier étage de la tour GIGA (excepté Voldemort et ses mange-morts). J'ai eu plus d'affinité avec certaines personnes que d'autres mais de manière générale, on forme un peu une grande famille et je tiens à vous remercier pour tous ce que vous avez pu m'apporter, même si c'était parfois de l'énervement.

Je remercie également toute mon équipe de volley. Ils ne le savent probablement pas mais ils m'ont beaucoup apporté en contribuant à me vider la tête (et toutes les bières d'Esneux) lors de nos nombreux entraînements, matchs et fêtes.

Enfin, une dernière salve de remerciement mais pas des moindres.

Ingrid, je tiens à te témoigner le plus grand merci du monde pour m'avoir supporté pendant ces quatre années. Merci d'avoir toujours été là et d'avoir su me remonter le moral dans les moments où ça n'allait pas fort. Merci pour toutes les conversations qu'on a eues sur le laboratoire et sur mes recherches. Malgré que tu ne sois pas dans le domaine, ta vision épurée m'a beaucoup apportée. Sans toi je ne serai pas là où j'en suis.

Je voudrais également remercier mes parents. Sans eux rien n'aurait été possible (vu que je ne serais pas né). Merci de m'avoir mis la pression et de m'avoir poussé à toujours voir plus loin lors de mes études. Vous avez largement contribué à ce que je suis devenu aujourd'hui. Tout particulièrement merci pour m'avoir servi de banque depuis ma naissance.

Un dernier remerciement pour la route mais qui compte beaucoup à mes yeux

Merci à NessNess et ShiShi, mes deux adorables chattes qui jour après jour m'attendent derrière la porte d'entrée afin de m'accueillir avec leurs miaulements les plus chaleureux (en fait elles veulent juste à manger)..

Bref,

Merci à tous !

Résumé

La télangiectasie hémorragique héréditaire est une maladie génétique provoquant divers troubles vasculaires (épistaxis, télangiectasies et malformations artériovoineuses). Ces troubles sont provoqués par la présence de mutations au sein de différents gènes codant des protéines de la superfamille du *Transforming Growth Factor- β* (TGF- β). Basé sur le gène muté provoquant l'apparition de ce syndrome, on distingue deux types principaux de la maladie, HHT1 et HHT2. Ceux-ci sont caractérisés par des mutations dans les gènes codant pour l'endogline et l'ALK1, respectivement. Ces dernières années le ligand *Bone morphogenetic protein 9* (BMP9) est apparu comme un élément clé dans la compréhension de la maladie et dans la régulation de l'angiogenèse.

L'angiogenèse est le processus de formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de ceux préexistants. Elle est très active durant l'embryogenèse mais devient quiescente à l'âge adulte. Cependant, ce mécanisme peut être à nouveau activé lors de la réparation tissulaire et lors du cycle menstruel. Un défaut dans l'angiogenèse (que ce soit une diminution ou au contraire une activation trop importante) conduit à des problèmes vasculaires favorisant le développement de diverses pathologies comme le cancer, la dégénérescence maculaire liée à l'âge ou encore certains diabètes. La formation des vaisseaux sanguins est modulée par de nombreux facteurs qui permettent de l'activer ou de l'inhiber. La balance entre ces deux types de régulateurs est essentielle pour le bon déroulement de l'angiogenèse. Le facteur le plus connu pour réguler positivement ce procédé est le *Vascular endothelial growth factor* (VEGF).

Au sein de la première partie de cette thèse, nous avons établi la présence d'un lien entre la voie du VEGF et celle du BMP9. Ce facteur régule négativement l'angiogenèse induite par le VEGF en modifiant les interactions entre le VEGFR2 et ALK1 (récepteur de type I du BMP9), les voies de signalisation intracellulaires (ERK1/2, PTEN,...) mais également en influençant l'internalisation du récepteur VEGFR2.

Au cours de la seconde partie, nous avons observé que BMP9 augmente l'expression du micro-ARN 205 dont les cibles sont Smad1 et Smad4. Par cette régulation, BMP9 met en place une boucle d'auto-régulation négative. De surcroît, l'augmentation du niveau de ce miR provoque une diminution de l'expression du VEGF et de la phosphatase PTEN au sein des cellules endothéliales. Des expériences menées sur des cellules endothéliales provenant de patients HHT2 montrent que, dans ce contexte, BMP9 n'est plus capable

d'activer complètement ces différentes voies ce qui conduit à une dérégulation de l'angiogenèse.

En conclusion, BMP9 possède un rôle de régulateur négatif de l'angiogenèse induite par le VEGF. Ceci permet d'empêcher une sur-activation de l'angiogenèse et permettre la maturation des vaisseaux nouvellement formés. Chez les patients souffrant de la télangiectasie hémorragique héréditaire, la signalisation du BMP9 est diminuée et ne permet plus la régulation négative de l'angiogenèse.

Liste des abréviations

ARN	Acide ribonucléique
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ALK	Activin receptor-like kinase
ANG-1	Angiopoïétine-1
ANG-2	Angiopoïétine-2
ARNdb	ARN double brin
ARNm	ARN messenger
ARNsb	ARN simple brin
AVM	Malformation artério-veineuse
bFGF	<i>Basic fibroblast growth factor</i>
BAD	<i>Bcl-2-associated death promoter</i>
BMP	<i>Bone morphogenetic protein</i>
BrdU	5-bromo-2-déoxyuridine
CE	Cellule endothéliale
CLASP	<i>Clathrine associated protein</i>
DAB2	<i>Disabled homolog 2</i>
DAG	Diacylglycérol
Dll4	<i>Delta-like ligand 4</i>
EDTA	Ethylène diamine tétra acétique
EEA-1	<i>Early endosome antigen-1</i>
EGF	<i>Epithelial growth factor</i>
eNOS	<i>Endothelial nitric oxyde synthase</i>
FAK	<i>Focal adhesion kinase</i>
FBS	Sérum de veau fœtal
FLK-1	<i>Fetal liver kinase-1</i>
FLT-1	<i>Fms related tyrosine kinase-1</i>
GAPDH	Glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase
GDF	<i>Growth differentiation factor</i>
GPCR	Récepteur couplé aux protéines G
GRB2	<i>Growth factor receptor-bound protein 2</i>
HES	<i>hairly and enhancer of split-1</i>
HEY	<i>Hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif protein</i>
HHT	Télangiectasie hémorragique héréditaire
HIF-1	<i>Hypoxia-inducible factor-1</i>
HRP	<i>Horseradish peroxydase</i>
HS	<i>Heparan sulfate</i>
HUVEC	<i>Human umbilical vein endothelial cells</i>
IFN	Interféron

IL	Interleukine
IP3	Inositol 1,4,5-triphosphate
kDa	Kilodalton
KDR	<i>Kinase insert domain protein receptor</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MEC	Matrice extracellulaire
MH1, 2	<i>MAD homology 1, 2</i>
miARN	MicroARN
miR	MicroARN
MMP	<i>Matrix metalloproteinase</i>
NFAT	<i>Nuclear factor of activated T-cells</i>
NRP	Neuropiline
NO	Monoxide d'azote
PAH	Hypertension artérielle pulmonaire
PAI-1	<i>Plasminogen activator inhibitor-1</i>
PAK-2	<i>P21 activated protein kinase-2</i>
PAR3	<i>Partitioning defective protein 3</i>
PAVM	Malformation artério-veineuse du poumon
pb	paire de base
PBS	<i>Phosphate buffer saline</i>
PC	Péricyte
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i>
PDGFR	<i>Platelet-derived growth factor receptor</i>
PECAM	<i>Platelet endothelial cell adhesion molecule</i>
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinases
PIP2	Phosphatidylinositol 4,5-biphosphate
PKC	Protein kinase C
PLC	Phospholipase C
PIGF	<i>Placental growth factor</i>
pré-miARN	Précurseur de miARN
pri-miARN	Précurseur primaire de miARN
PRL	Prolactine
PTB	<i>Phosphotyrosine binding</i>
PTEN	<i>Phosphatase and TENsin homolog</i>
PTP	<i>Protein tyrosine phosphatase</i>
qRT-PCR	<i>quantitative real time polymérase chain reaction</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
RTK	Récepteurs tyrosine kinase
SBE	<i>Smad binding element</i>
SCK	<i>Shc-related adaptator protein</i>
SHB	<i>SH2 domain containing adaptator protein B</i>
SHC	<i>Src-homology-2-containing</i>
SMAD	<i>SMA and MAD</i>

SOS	<i>Son of sevenless</i>
TGF- β	<i>Transforming growth factor-β</i>
TNF- α	<i>Tumor necrosis factor-1</i>
TSP-1	<i>Thrombospondine-1</i>
uPA	<i>urokinase plasmingen activator</i>
uPAR	<i>urokinase plasmingen activator receptor</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
VEGFR	<i>Vascular endothelial growth factor receptor</i>
VE-PTP	<i>Vascular endothelial protein tyrosine phosphatase</i>
VPF	<i>Vascular permeability factor</i>
vSMC	<i>Vascular smooth muscle cell</i>
XIAP	<i>X-linked inhibitor of apoptosis protein</i>

Table des matières

INTRODUCTION.....	1
I. La télangiectasie hémorragique héréditaire	1
1.1 Les principes de bases.....	1
1.2 La pathogénicité de la maladie	2
1.2.1 Les symptômes et leurs causes	2
1.2.2 Evolution de la maladie avec l'âge	4
1.2.3 L'espérance de vie	6
1.3 Les bases génétiques et moléculaires de la maladie	7
1.3.1 Les différents types d'HHT et leurs mutations	8
1.3.2 Les apports des modèles murins dans la compréhension d'HHT	10
1.3.3 La variabilité phénotypique	14
1.4 Diagnostic et traitements	16
1.4.1 Le diagnostic moléculaire	17
1.4.2 Les traitements	19
II. La superfamille du TGF-β.....	24
2.1 Les acteurs moléculaires et leur signalisation	24
2.1.1 Les facteurs solubles de la superfamille du TGF- β	24
2.1.2 Les récepteurs et leur signalisation	26
2.1.3 Les SMADs, effecteurs intracellulaires	27
2.1.4 Les régulations de ces voies de signalisation.....	30
2.2 La signalisation du TGF- β dans les cellules endothéliales.....	32
2.2.1 Les études génétiques	33
2.2.2 La balance du TGF- β dans les cellules endothéliales.....	34
2.3 La sous-famille des BMPs.....	36
2.3.1 La signalisation des BMPs dans les cellules endothéliales	37
2.3.2 Le sous-groupe des BMP9/10 et leur importance dans la physiologie des cellules endothéliales	38
III. L'angiogenèse.....	42
3.1 Généralités.....	42
3.2 Initiation du réseau vasculaire	42
3.3 Le mécanisme et les différentes étapes de l'angiogenèse	43
3.3.1 La vasodilatation et la perméabilité vasculaire	45
3.3.2 La dégradation de la matrice extracellulaire	45
3.3.3 L'élongation des vaisseaux	46
3.3.4 La formation de la lumière	47
3.3.5 La fusion des vaisseaux naissants et perfusion.....	48
3.3.6 La maturation des nouveaux vaisseaux.....	48
3.4 La régulation de l'angiogenèse	50
IV. La famille du VEGF.....	52
4.1 Les ligands.....	52
4.2 Les récepteurs.....	54

4.2.1	Le VEGFR1.....	55
4.2.2	Le VEGFR3.....	55
4.2.3	Le VEGFR2.....	56
4.3	Les voies de signalisation induites par le couple VEGF-A/VEGFR2	60
4.3.1	La voie PLC γ -ERK1/2 et la signalisation du Ca ²⁺	60
4.3.2	La voie PI3K/AKT et les small GTPases.....	61
4.3.3	La voie SRC.....	62
4.3.4	Les kinases de stress et la voie STAT	63
4.4	Les co-récepteurs du VEGFR2	63
4.4.1	Les neuropilines.....	63
4.4.2	L'héparane sulfate (HS)	65
4.4.3	Les intégrines.....	65
4.5	Le trafficking du VEGFR2.....	67
4.5.1	L'internalisation du VEGFR2	68
4.5.2	La régulation de l'internalisation du VEGFR2	70
OBJECTIFS DU TRAVAIL.....		73
MATERIEL ET METHODES		75
1.	Solutions, tampons et réactifs	75
2.	Culture cellulaire	76
3.	Tests fonctionnels	77
3.1	Test de prolifération au BrdU	77
3.2	Test de migration	78
3.3	Test de tubulogenèse.....	78
4.	Immunofluorescence.....	79
5.	Proximity Ligation Assay.....	79
6.	Préparation des extraits protéiques	81
7.	Western blotting	81
8.	Biotinylation des protéines de surface	82
9.	Analyse quantitative du niveau d'expression de gènes par qRT-PCR	83
9.1	Extraction des ARN messagers et des miRs.....	83
9.2	Transcription inverse.....	83
9.2.1	Transcription inverse des ARNm	83
9.2.2	Transcription inverse de miRs	84
9.3	PCR quantitative en temps réel par la méthode du SYBR Green	84
9.3.1	La qPCR des ARN messagers.....	84
9.3.2	La qPCR des miRs	85
10.	Les séquences oligonucléotidiques.....	86

11. Statistiques	86
RESULTATS	87
1. Etude de l'interaction des récepteurs	87
1.1 Etude de l'interaction entre VEGFR2 et les récepteurs de la superfamille du TGF- β	87
1.2 VEGF et BMP9 modulent l'interaction entre VEGFR2 et ALK1	88
2. Impact du BMP9 sur les fonctions angiogènes des cellules endothéliales	89
2.1 Le BMP9 n'influence pas directement la physiologie des HUVECs	89
2.2 BMP9 diminue l'angiogenèse induite par VEGF et bFGF	90
2.3 BMP9 n'est plus capable de réguler négativement l'angiogenèse induite par VEGF dans les cellules de patients HHT2.....	92
3. Etude des voies de signalisation impliquées	93
3.1 VEGF-A ₁₆₅ et BMP9 modulent la phosphorylation des ERK1/2 et des SMAD1/5.....	93
3.2. La phosphatase PTEN est inactivée par VEGF-A ₁₆₅ et BMP9.....	96
3.3 Les voies Akt et p38 ne sont pas significativement modulées par le traitement VEGF-A ₁₆₅ et BMP9 97	98
3.4 BMP9 augmente l'internalisation du VEGFR2 induite par VEGF-A ₁₆₅	98
1. miR-205 est dérégulé chez les patients atteint de télangiectasie hémorragique héréditaire, affecte les voies de signalisation du TGF-β et les fonctions des cellules endothéliales.....	100
2. L'expression de miR-205 et de ses cibles est altérée dans les cellules de patients HHT2.....	102
2.1 L'expression du miR-205 est diminuée dans les cellules HHT2	102
2.2 L'expression de SMAD1, SMAD4 et d'ID-1 est augmentée dans les cellules HHT2	103
3. BMP9 induit l'expression du micro-ARN 205	104
4. miR-205 diminue l'expression de PTEN et du VEGF	105
DISCUSSION ET CONCLUSIONS.....	107
1. Discussion.....	107
2. Conclusion générale et perspectives.....	122
BIBLIOGRAPHIE	125

Introduction

I. La télangiectasie hémorragique héréditaire

1.1 Les principes de bases

La télangiectasie hémorragique héréditaire (HHT), aussi connue sous le nom de syndrome de Rendu-Osler-Weber, est une maladie héréditaire autosomique dominante responsables des troubles vasculaires d'importance variable (Shovlin 2010). Ce syndrome a été reconnu fin des années 1890 et début 1900 par Henry Rendu, William Osler et Francis P. Weber. Il a ensuite été renommé télangiectasie hémorragique héréditaire pour la première fois par l'américain Frederic M. Hanes.

Diverses études épidémiologiques ont montré que ce syndrome affecte approximativement 1 personne sur 5000 à 8000 (Dakeishi et al. 2002). Il existe cependant des variations en fonction de certaines régions ou communautés. En effet, c'est le cas dans la vallée de Valserine en France ou dans la population afro-caribéenne des Antilles néerlandaises où l'on retrouve proportionnellement un plus grand nombre de cas (Plauchu 1984; Westermann et al. 2003).

HHT a d'abord été décrite comme une maladie héréditaire caractérisée par de l'anémie. Ce symptôme a été mis en relation avec la présence d'épistaxis fréquents (Sant 1896). Très rapidement il est apparu que ces troubles étaient provoqués par un développement de vaisseaux sanguins avec des structures anormales. Par la suite, les médecins ont également découvert la présence de télangiectasies (vaisseaux dilatés) au niveau de la peau, de la bouche et des cavités gastro-intestinales. De plus, ces symptômes sont souvent accompagnés de malformations artério-veineuses (AVMs) retrouvées au niveau des poumons, du foie ou encore du cerveau. Malgré le fait que les symptômes soient faciles à détecter, il n'est pas toujours aisé de pouvoir diagnostiquer un patient atteint de la maladie. C'est pourquoi en 1997, les chercheurs, les médecins et une délégation de patients se sont réunis, lors d'un congrès à Curaçao, pour établir les critères selon lesquels une personne serait ou non atteinte de la maladie (Shovlin et al. 2000; Shovlin 2010). Depuis ce consensus, le diagnostic a pu être facilité.

Parmi ces critères, appelés critères de Curaçao, on en distingue quatre : les symptômes mentionnés ci-dessus, c'est-à-dire les épistaxis, télangiectasies, AVMs ainsi que la présence d'antécédents familiaux (d'autres membres de la famille atteints par HHT). En fonction du nombre de critères présentés par le patient, le diagnostic sera classé en

définitif, suspecté ou improbable (**Table I**) (Shovlin et al. 2000). Le diagnostic a été amélioré par l'utilisation de critères moléculaires. Ceux-ci seront développés dans un prochain paragraphe.

La pathogénicité de la maladie sera discutée plus loin dans cette introduction mais il est important d'introduire que de plus en plus de caractéristiques s'ajoutent à la liste des critères de Curaçao. En effet, de nombreux patients diagnostiqués comme étant atteints par HHT présentent d'autres pathologies comme l'hypertension artérielle, le syndrome de polypose juvénile, l'hypertension pulmonaire mais aussi certains dysfonctionnements immunitaires (Manes et al. 2001; Iyer et al. 2010; Guilhem et al. 2013).

Les critères de Curaçao

Le diagnostique de HHT

Définitif	Si 3 critères sont présents,
Probable ou suspecté	Si 2 critères sont présents, et
Improbable	Si moins de 2 critères sont présents

Les critères

1. Epistaxis	Saignements de nez spontanés et récurrents
2. Télangiectasies	Multiples au niveau de sites caractéristiques: <ul style="list-style-type: none"> • Lèvres • Cavité buccale • Doigts • Nez
3. Lésions viscérales	Comme: <ul style="list-style-type: none"> • Télangiectasies gastro-intestinales (avec ou sans saignements) • AVM pulmonaire • AVM hépatique • AVMs cérébraux
4. Antécédents familiaux	Un parent du premier degré atteint de HHT selon ces critères

Table I: Les critères de Curaçao

1.2 La pathogénicité de la maladie

1.2.1 Les symptômes et leurs causes

Chez une personne saine, le réseau vasculaire se développe de manière idéale afin de permettre l'acheminement de l'oxygène et de tous les éléments indispensables au bon fonctionnement des divers organes du corps humains. Le cœur envoie du sang chargé en oxygène dans des artères de gros diamètre. Comme le sang envoyé par le corps est

abondant et sous haute pression, le système artériel se doit d'être souple (grâce à la présence de fibres élastiques) et résistant (épaisseur des vaisseaux importante). A l'approche des organes, les artères sont plus petites, et entourées de cellules musculaires lisses, pour finalement se transformer en artérioles et former le réseau de capillaires où a lieu l'irrigation des organes et où la vitesse du sang est la plus faible. Ce réseau de capillaires est également composé de veinules qui récupèrent le sang appauvri. La pression sanguine y est diminuée et sera d'autant plus faible que le sang arrive dans des veines de gros calibre. Ainsi le système veineux est composé de vaisseaux beaucoup plus fragiles ne supportant pas les variations de pression comme les artères (Gilles 2006).

Chez les patients atteints de la télangiectasie hémorragique héréditaire, de nombreux problèmes vasculaires apparaissent dus à la formation anormale de certains vaisseaux dont ceux du réseau de capillaires entre les veines et les artères. Un exemple évident est les nombreuses télangiectasies dont sont victimes les patients HHT. Il ne s'agit rien d'autre que d'une dilation des veinules des capillaires qui se connectent alors avec des artérioles, elles aussi dilatées, provoquant la perte de réseau fin de capillaires. Le sang avec une pression importante venant des artères arrive dans ces veinules plus fragiles et dilatées provoquant les hémorragies caractéristiques des télangiectasies et des épistaxis (Braverman et al. 1990). Ces télangiectasies sont le plus souvent observées sur la peau mais peuvent également être observées sur d'autres organes. Une autre conséquence de cette maladie, liée à la mauvaise formation des vaisseaux sanguins, est la présence de larges malformations artério-veineuses. Selon Braverman et ses collègues, ces malformations plus importantes proviendraient des petites télangiectasies. Comme mentionné ci-dessus, les vaisseaux ont besoin d'une épaisseur et d'un diamètre adéquat et suffisamment important pour supporter la pression artérielle. Dans le cas des AVMs, ces conditions ne sont pas atteintes, les vaisseaux sont dilatés mais leur épaisseur n'est pas suffisante (Gilles 2006; Shovlin 2010) (**Figure 1**).

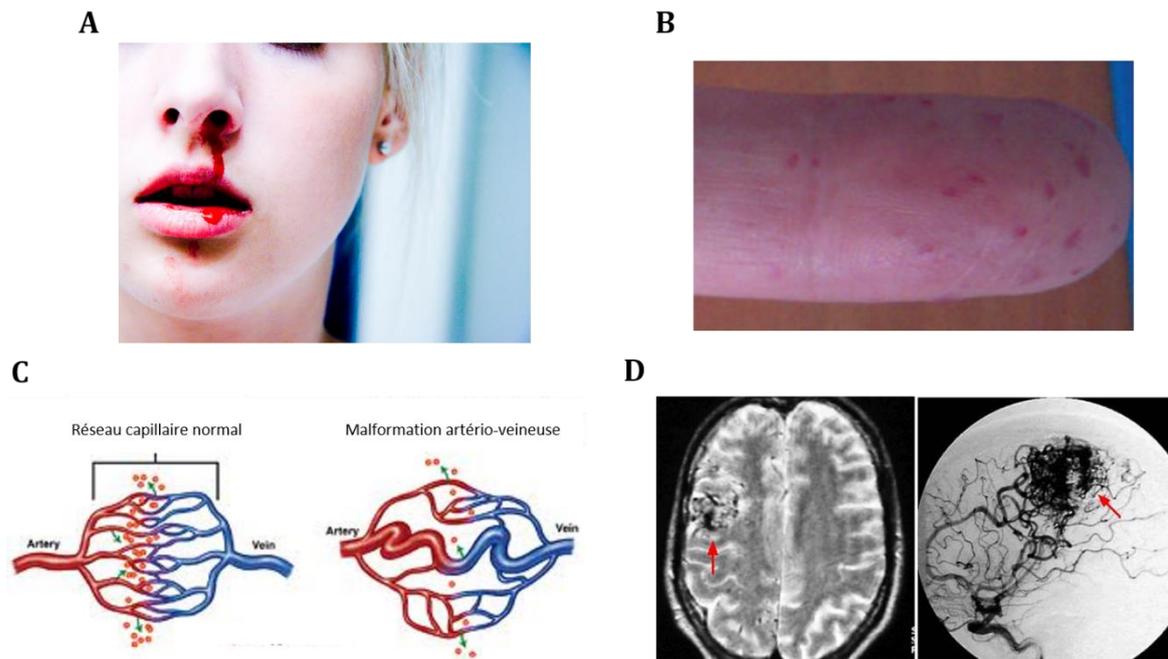


Figure 1: Les symptômes de la télangiectasie hémorragique héréditaire. (A) Epistaxis. (B) Télangiectasies dermiques. (C) Schéma comparant un réseau de capillaire sain et la formation d'un AVM. (D) Présence d'un AVM au sein du cerveau d'un patient.

En conclusion, même si le mécanisme exact de la maladie n'est pas encore complètement compris, la cause des différents symptômes l'est beaucoup plus. Il s'agit d'un mauvais développement des vaisseaux sanguins générant le réseau de capillaires. Ceci engendre l'apparition de vaisseaux volumineux mais fragiles et la connexion directe des artères et des veines, provoquant dès lors de nombreuses hémorragies plus ou moins critiques pour le patient.

1.2.2 Evolution de la maladie avec l'âge

La télangiectasie hémorragique héréditaire est une maladie qui est difficile à diagnostiquer à la naissance et qui évoluera plus ou moins rapidement avec l'âge. L'apparition des différents symptômes se fait progressivement rendant d'autant plus compliqué le diagnostic définitif de la maladie.

1.2.2.1 Les épistaxis

Les premiers saignements de nez apparaissent vers l'âge de dix ans dans 50% des cas. A l'âge de 21 ans, 80-90% des patients sont sujets à ces épistaxis. Cependant, la fréquence de ces saignements varie de manière importante d'une personne à l'autre. En effet, ces épisodes peuvent se produire moins de trois fois par an jusqu'à plusieurs fois par jour. De plus, le volume sanguin perdu lors de ces événements est également fort variable :

allant de quelques gouttes à un flux important pendant plusieurs minutes (Plauchu et al. 1989; McDonald et al. 2011). L'évolution du nombre et de la sévérité de ces événements avec l'âge est assez difficile à définir. En effet, certains patients présentent une augmentation du nombre d'épistaxis alors que dans d'autres cas, cette fréquence diminue (AAssar et al. 1991).

1.2.2.2 Les télangiectasies

En ce qui concerne les télangiectasies, elles ont tendance à augmenter en nombre avec l'âge et le pourcentage d'individus adultes atteints par ce symptôme s'approche des 100%. Cependant elles apparaissent généralement plus tard que les épistaxis. Ainsi, ces dernières ne sont pas observables avant l'âge de 20 à 30 ans sauf pour certains patients chez qui ces télangiectasies peuvent apparaître précocement. Généralement ces lésions sont localisées au niveau de la figure, des mains ou encore de la cavité buccale. Cependant, elles peuvent aussi apparaître en nombre au sein du système gastro-intestinal (Plauchu et al. 1989; McDonald et al. 2011; McDonald et al. 2015).

1.2.2.3 Les malformations artério-veineuses

Les malformations artério-veineuses (AVMs) sont des lésions qui sont présentes dès la naissance mais qui sont difficile à détecter. En effet, la présence d'AVMs ne présente pas forcément de symptômes directement observables et nécessitera l'utilisation de techniques d'imagerie pour permettre leurs détections. De plus, leurs apparitions sont très variables, même parmi les individus d'une même famille. Ces AVMs apparaissent en quantité et en sévérité très différentes. Les organes touchés par ces lésions peuvent également être fortement variables (**Figure 2**). Approximativement un quart des adultes atteints de HHT souffrent de saignements gastro-intestinaux. Ceux-ci apparaissant dans la plupart des cas après 50 ans, sont faibles mais persistants. Cependant, il arrive souvent que la sévérité de ces hémorragies augmente avec l'âge (Kjeldsen & Kjeldsen 2000). Un autre organe fréquemment touché par la formation d'AVMs est le poumon. Ces malformations engendrent ce qu'on appelle un shunt droite-gauche ; c'est-à-dire une connexion directe, indépendante de capillaires, entre la circulation sanguine pulmonaire et systémique. Ceci pouvant provoquer des déficiences gazeuses, des problèmes respiratoires, des problèmes neurologiques (abcès cérébraux, AVC,...) et diverses infections (méningites, septicémies,...) dus à la formation d'abcès dans différents organes (Dupuis-Girod et al. 2017). Le calcul de la fréquence et de l'apparition de ces AVMs pulmonaires (PAVMs)

n'est pas fiable car fortement dépendante des méthodes de détection et du type d'HHT. En effet, une étude a montré que l'utilisation de la tomographie à haute résolution indique une fréquence de patients atteints par des PAVMs de 37% alors qu'une technique d'échocardiographie transthoracique obtient une fréquence de 59% (Van Gent et al. 2010; McDonald et al. 2011). Ces dernières années, il semble que la deuxième technique soit privilégiée dans le screening des patients HHT. Ces malformations sont présentes dès la naissance et sont largement développées à l'âge adulte. De plus, elles peuvent s'élargir progressivement avec l'âge des patients (Dupuis-Girod et al. 2017). En plus de ces types de lésions assez fréquentes, des AVMs cérébraux peuvent se développer dans approximativement 10% des cas d'HHT. Cependant, les individus de jeune âge sont généralement traités préventivement pour éviter leurs apparitions et les complications qui en découlent. Le foie est également un des organes touchés par la formation de malformations artério-veineuses chez les patients souffrant de HHT. Cependant, comme pour les PAVMs, leur prévalence n'est pas évidente à prédire au vu du manque de techniques adéquates pour les détecter. Ceci engendre des pourcentages très variables d'une étude à une autre (McDonald et al. 2011).

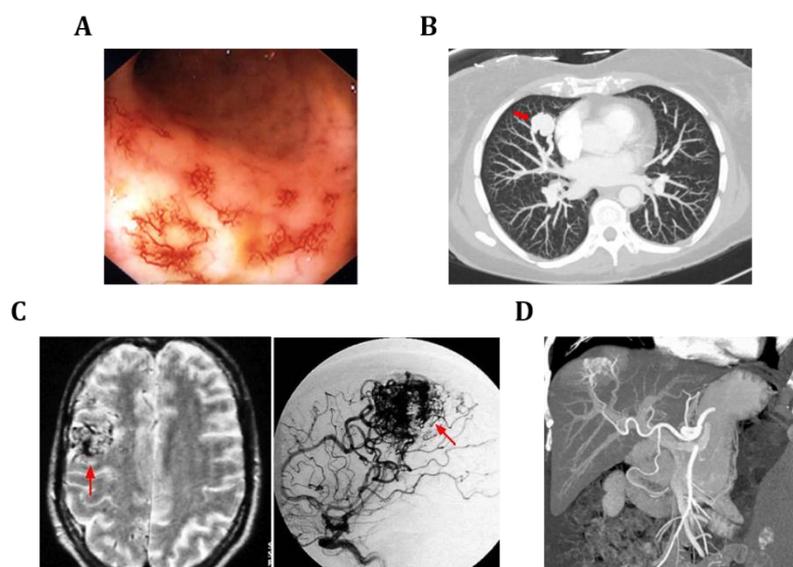


Figure 2: Différents types de malformations artério-veineuses. (A) AVMs gastro-intestinaux. (B) AVM pulmonaire. (C) AVM cérébral. (D) AVM hépatique.

1.2.3 L'espérance de vie

HHT est une maladie plus communément associée à une diminution de la qualité de vie (parfois très importante) plutôt qu'à des taux de mortalité élevés. Cependant l'espérance de vie des patients peut être diminuée comme le montre une étude récente de

deux hôpitaux canadiens et néerlandais. Dans cette dernière, 225 parents de patients diagnostiqués atteints de HHT ont été sondés et il en est ressorti que les parents malades présentent une espérance de vie plus faible que leurs partenaires sains. Néanmoins, cette étude souligne également le fait que l'espérance de vie des patients peut être normale s'ils sont diagnostiqués et si les AVMs pulmonaires et cérébraux sont traités à temps (De Gussem et al. 2016; Grigg et al. 2017). Cependant, l'apparition d'AVMs cérébraux et pulmonaires à un jeune âge ou chez les jeunes adultes augmenterait le taux de mortalité (Kjeldsen et al. 1999; Morgan et al. 2002).

Malgré que ce syndrome soit plus considéré comme handicapant, il continue à causer la mort de nombreux patients. Ces décès surviennent, pour la plupart, à cause de grosses hémorragies provoquées suite au développement de larges AVMs dans divers organes vitaux. Toutefois, l'avancée de la médecine et de la connaissance de la maladie permet de développer de nouveaux traitements qui, à l'heure actuelle, permettent de réduire ce taux de mortalité et d'améliorer la qualité de vie des patients. Ainsi, depuis quelques années, les traitements ont tendance à évoluer. Plutôt que de traiter les symptômes de la maladie, des nouvelles méthodes de screening des patients ont permis le développement de traitements préventifs. Par contre, ces nouvelles thérapies doivent encore faire leurs preuves (Grigg et al. 2017). Cet aspect sera développé dans un prochain paragraphe.

1.3 Les bases génétiques et moléculaires de la maladie

La télangiectasie hémorragique héréditaire est une maladie génétique hétérogène caractérisée par des mutations au sein de gènes codants pour des protéines de la superfamille du TGF- β (*Transforming Growth Factor- β*). La première mutation liée à l'apparition de la maladie a été découverte il y a plus de 20 ans. Il s'agit d'une mutation sur le gène de l'endogline (*ENG*). Rapidement, des mutations au niveau du gène *ACVRL1*, codant pour la protéine ALK1 (*Activin Like Receptor Kinase 1*), ont aussi été détectées ; suivies par la découverte de mutations dans le gène qui code pour SMAD4. C'est sur base du gène muté que l'on peut classer les malades atteints de HHT en trois principales catégories. On distingue HHT1 (OMIM 187300) dont le gène muté code pour l'endogline (*ENG*, chromosome 9q34) (Shovlin et al. 1994), HHT2 (OMIM 600376) dont le gène muté code pour ALK1 (*ACVRL1/ALK1*, chromosome 12q13) (Johnson et al. 1996) et le syndrome combiné HHT/JP (polypose juvénile) (OMIM 175050) dont le gène muté responsable code pour SMAD4 (*MADH4*, chromosome 18q21) (Gallione et al. 2004). Dans les deux premiers cas, les protéines impliquées sont des récepteurs de la voie du

TGF- β . Malgré le fait que le dernier type soit désormais considéré comme une cause d'HHT, c'est HHT1 et HHT2 qui sont le plus souvent observés chez les patients. En effet, les mutations *ENG* et *ACVRL1* sont détectées dans plus de 85% des cas et jusqu'à présent seulement 1 à 2% des patients sont atteints par une mutation dans le gène *MADH4*.

1.3.1 Les différents types d'HHT et leurs mutations

1.3.1.1 HHT1 et HHT2

Comme mentionné dans la partie ci-dessus, les deux types prédominants d'HHT sont causés par des mutations dans les gènes *ENG* et *ACVRL1*. Le screening génétique des patients suspectés et diagnostiqués HHT révèle plus de 750 mutations différentes pour l'ensemble de ces deux gènes. L'ensemble de ces mutations sont répertoriées au sein d'une base de données fournissant de précieuses informations aux cliniciens et chercheurs (<http://www.arup.utah.edu/database/HHT/>) (Govani & Shovlin 2009; McDonald et al. 2015). La plupart de ces mutations sont étudiées par différents groupes de chercheurs et il apparait, de manière assez évidente, que la majorité d'entre elles conduisent à une sous production des protéines qu'*ENG* et *ACVRL1* codent ou à la rétention de ces dernières dans les compartiments intracellulaires. Des études plus poussées, notamment par les groupes d'Abdalla et Letarte, ont montré que l'analyse du niveau protéique de l'endogline et d'ALK1 supporte ce mécanisme d'haploinsuffisance (Abdalla 2005).

Les différents types de mutations observés sont nombreux, allant d'un simple changement d'une paire de base à de larges délétions ou des délétions complètes de plusieurs exons voire du gène entier. La proportion des larges délétions d'exons est plus faible que celle des mutations ponctuelles. En effet, elle ne représente que 6 à 10 % des mutations connues. (Shoukier et al. 2008; McDonald et al. 2011). Parmi les mutations ponctuelles (insertions, délétions, faux-sens, non-sens et site de splicing), les mutations faux-sens sont les plus représentées et ont déjà été détectées dans tous les exons de ces deux gènes. Cependant certains exons sont plus atteints que d'autres. C'est notamment le cas des exons 3, 7 et 8 d'*ACVRL1* où l'on retrouve 65% des mutations causant HHT2. De manière similaire, il a été observé dans le gène *ENG*, que les exons 1, 10 et 14 semblent être moins sujets aux mutations (Abdalla 2005; Richards-Yutz et al. 2010). De récentes découvertes ont mis en évidence la présence de mutations au sein des régions non codantes du gène codant l'endogline (5' UTR et site de liaison de facteurs de transcription), augmentant encore le nombre de mutations impliquées dans la télangiectasie hémorragique

héréditaire et mettant en évidence l'importance d'analyser ces régions dans le diagnostic de la maladie (Damjanovich et al. 2011; Plumitallo et al. 2018).

1.3.1.2 Le syndrome combiné de la polypose juvénile et d'HHT

Un troisième type d'HHT a rapidement été découvert après les deux précédents. Ce dernier n'est présent que dans moins de 2% des cas relatés de HHT. Celui-ci est appelé le syndrome combiné d'HHT et de la polypose juvénile. En effet, les patients qui en souffrent sont atteints des deux maladies, la télangiectasie hémorragique héréditaire et la polypose juvénile. Cette dernière est une maladie autosomique dominante (causée par des mutations du gène *BMPRIA* (chromosome 10q22) ou *MADH4* (chromosome 18q21)) prédisposant les patients à l'apparition de cancers au niveau de l'épithélium gastro-intestinal. Elle est caractérisée par l'apparition, dès le jeune âge, de nombreux polypes au niveau des intestins (McDonald et al. 2015).

Les patients détectés comme atteints du syndrome JP/HHT présentent les symptômes des deux maladies. Ce syndrome est causé par des mutations au niveau du gène *MADH4* codant pour la protéine SMAD4. Dans un premier temps, médecins et chercheurs ont cru pouvoir séparer les patients, présentant une mutation dans *MADH4*, comme étant atteints simplement de la polypose juvénile ou du syndrome combiné JP/HHT. En effet, les données génétiques semblaient montrer que les mutations SMAD4 causant le syndrome JP/HHT étaient uniquement localisées dans le domaine MH2 de la protéine. Cependant une étude récente du groupe de Gallione a montré que des patients diagnostiqués JP/HHT présentent également des mutations de *MADH4* situées dans d'autres domaines que le domaine MH2. Il est dès lors très important de screener tous les patients diagnostiqués comme étant atteints de la polypose juvénile dû à une mutation de SMAD4, également pour la présence de symptômes caractéristiques d'HHT (Gallione et al. 2010; Wooderchak et al. 2010; Wain et al. 2014). Une des différences importante de ce troisième type HHT par rapport aux deux précédents, est que dans 25% des cas, la mutation dans le gène *MADH4* apparait de novo.

1.3.1.3 Les autres types d'HHT

Les trois types d'HHT présentés ci-dessus sont les plus connus et les plus observés. Cependant, dans un peu moins de 15% des cas les individus suspectés d'être atteints d'HHT ne présentent aucune mutation au niveau d'*ENG*, *ACVRL1* ou *MADH4*. Différentes études ont, dans un premier temps, découvert deux autres gènes non identifiés situés sur les

chromosomes 5q31 et 7p14 pouvant respectivement causer HHT de type 3 et de type 4 (Cole 2005). De plus, en 2008, un patient présentant les symptômes caractéristiques d'HHT a été diagnostiqué comme porteur d'une mutation au niveau du gène codant pour le BMPR2 (*Bone Morphogenic Protein receptor type II*) (un récepteur faisant partie de la famille des BMPs (*Bone Morphogenic Proteins*) et donc de la superfamille du TGF- β (Rigelsky et al. 2008). La découverte de ces nouvelles mutations pathogènes a soulevé de nombreuses interrogations comme l'importance de mutations dans d'autres gènes encore non identifiés comme potentielles causes de la télangiectasie hémorragique héréditaire. Ainsi, dans une étude récente, l'analyse de 38 échantillons provenant de patients diagnostiqués comme étant atteints de HHT, mais ne présentant aucune mutation dans les gènes *ENG*, *ACVRL1* et *MADH4*, a révélé pour deux d'entre eux, la présence de mutations faux-sens dans le gène codant la protéine BMP9 (*GDF-2*, chromosome 10q11). Un troisième individu porteur d'une telle mutation a également été découvert par la suite (Wooderchak-Donahue et al. 2013). La découverte de ces nouveaux variants confirme l'importance de la voie BMP9/BMPR2/ALK1/Endogline dans le développement de cette maladie (McDonald et al. 2015) et a d'ailleurs conduit à de nouvelles recherches concernant l'implication de cette voie dans HHT.

1.3.2 Les apports des modèles murins dans la compréhension d'HHT

Au début des années 2000, l'étude de souris homozygotes *Eng*^{-/-} et *Acvrl1*^{-/-} a permis d'acquérir une meilleure compréhension de la télangiectasie hémorragique héréditaire. Ces souris déficientes en endogline ou en ALK1 présentent un phénotype similaire caractérisé par des défauts cardiovasculaires avec une mort embryonnaire précoce au stade embryonnaire E9.5-E10.5. Le sac vitellin de ces animaux se compose des cellules endothéliales organisées en îlots, suggérant qu'il n'y a aucun défaut de vasculogénèse. Par contre, ces cellules sont incapables de former un plexus vasculaire indiquant un problème d'angiogénèse. De plus, au niveau des embryons, un retard de la maturation des vaisseaux est observé, accompagné d'une diminution du nombre de cellules musculaires lisses vasculaires (vSMCs) (Bourdeau et al. 1999; Arthur et al. 2000; Oh et al. 2000; Park et al. 2009). Ces premières observations ont été suivies par une autre étude chez les souris *Acvrl1*^{-/-} dans lesquelles les embryons dépourvus d'ALK1 développent de larges connections entre les artères et les veines. Une diminution de l'expression de gènes impliqués dans l'identité artérielle a également été observée (Urness et al. 2000). Cette première série d'études chez les souris déficientes en endogline et ALK1 montre que les

AVMs caractéristiques d'HHT se forment au cours du développement à cause d'une fusion entre les veines et les artères résultant d'une perte de leur identité moléculaire (Tual-chalot et al. 2015).

L'étude de souris hétérozygote $Eng^{+/-}$ et $Acvr11^{+/-}$ est le modèle qui se rapproche le plus, en terme de génotype, de ce qui se passe chez les personnes atteintes de la télangiectasie hémorragique héréditaire. Cependant, le phénotype présenté par ces animaux est relativement faible. En effet, les souris $Acvr11^{+/-}$ possèdent, dans seulement 40% des cas, des vaisseaux dilatés et/ou des lésions vasculaires au niveau de la peau, du foie et des intestins (Srinivasan et al. 2003). Il en est de même pour les souris $Eng^{+/-}$ (Torsney et al. 2003). Toutefois, ces études ne sont pas inutiles. En effet, il a été observé dans cette même étude que chez les souris ($Eng^{+/-}$) de souche 129/Ola, l'apparition des lésions vasculaires est augmentée. Ces résultats suggèrent la présence d'autres éléments déclencheurs permettant le développement des symptômes d'HHT. Ainsi, ces dernières années de plus en plus de gènes modificateurs ont été découverts et corroborent l'hypothèse selon laquelle un évènement déclencheur est indispensable au développement de la maladie (Benzinou et al. 2012; Kawasaki et al. 2014; Letteboer et al. 2015; Gkatzis et al. 2016; Pawlikowska et al. 2018). De surcroît, l'étude réalisée sur les souris $Eng^{+/-}$ a également mis en évidence la présence d'une diminution de la couverture des vaisseaux par les cellules musculaires lisses (Torsney et al. 2003). La maturation des vaisseaux est donc affectée. Il a par ailleurs été observé que l'utilisation de la thalidomide permet de restaurer la couverture des vaisseaux par les vSMCs et de diminuer la sévérité des saignements de nez (Lebrin et al. 2010; Lebrin 2015).

Comme mentionné dans le paragraphe précédent, les souris hétérozygotes ($Eng^{+/-}$ et $Acvr11^{+/-}$) développent des vaisseaux sanguins relativement normaux. C'est également ce qui peut être observé chez les patients atteints de HHT où le réseau vasculaire fonctionne normalement à l'exception des lésions locales. Plusieurs études utilisant des souris hétérozygotes ont mis en évidence l'importance d'un stimulus supplémentaire dans le développement de la maladie. L'inflammation et la stimulation de l'angiogenèse sont les deux seconds hits nécessaires à l'apparition des AVMs causés par HHT (Tual-chalot et al. 2015; Gkatzis et al. 2016).

Les modèles développés dans le cadre d' Eng et $Acvr11$ conduisent à l'apparition d'importants AVMs ressemblant à ceux observés chez les patients. En concordance avec les modèles précédents, ces AVMs sont généralement limités aux sites où l'on détecte une activité inflammatoire et pro-angiogène importante. Ainsi, Park et Choi ont montré qu'une

lésion au niveau du derme conduit au développement de malformations artério-veineuses chez les souris déficientes *Acvrl1* et *Eng*. Des phénotypes similaires ont également été observés lors de l'application locale de stimulateurs de l'angiogenèse et de l'inflammation (VEGF et LPS respectivement) (Park et al. 2009; Choi et al. 2014; Tual-chalot et al. 2015). Ces résultats obtenus au niveau de la peau et du cerveau supportent l'idée selon laquelle le développement d'AVM, chez les patients HHT, est provoqué suite à une série d'évènements (hypothèse du « trois évènements ») :

- Une première mutation au niveau d'*Acvrl1* ou d'*Eng* menant à l'hétérozygotie du gène
- Une perte des protéines codées par *Acvrl1* et *Eng* (suite à une seconde mutation génétique ou un évènement protéolytique) menant à l'apparition de cellules dites « null » pour endogline ou ALK1
- Un évènement secondaire comme un stimulus pro-angiogène ou inflammatoire

La délétion de ces gènes peut également se faire au niveau d'un type cellulaire spécifique. Cette technique génère des souris pour lesquelles *Eng* et *Acvrl1* sont déplétés uniquement dans le type cellulaire voulu. L'ensemble de ces études sont arrivées à la conclusion que le type cellulaire clé dans le développement des AVMs sont les cellules endothéliales (Garrido-martin et al. 2014; Tual-chalot et al. 2015). Ainsi, les modèles murins, dans lesquels la délétion homozygote d'*Acvrl1* ou d'*Eng* est réalisée, présentent un développement du réseau vasculaire de la rétine anormal. Ce développement est caractérisé par une augmentation de la prolifération des cellules endothéliales, par un élargissement des veines et la présence d'AVMs (Mahmoud et al. 2010; Tual-chalot et al. 2014).

En conclusion, les cellules endothéliales constituent le type cellulaire clé dans la télangiectasie hémorragique héréditaire. Une mutation hétérozygote dans ces cellules ne permet pas l'apparition de malformations artério-veineuses, d'autres éléments déclencheurs sont nécessaires. De telle manière les modèles murins soutiennent l'hypothèse des « trois évènements » pour le développement des AVMs. Cette hypothèse souligne la nécessité d'avoir à la fois une hétérozygotie d'*Acvrl1* ou d'*Eng* suivie d'une perte totale de la protéine (par une mutation somatique ou alternativement par une perte locale de la protéine) et enfin un élément déclencheur supplémentaire pro-angiogène (Tual-chalot et al. 2015) (**Figure 3a**).

Télangiectasie hémorragique héréditaire

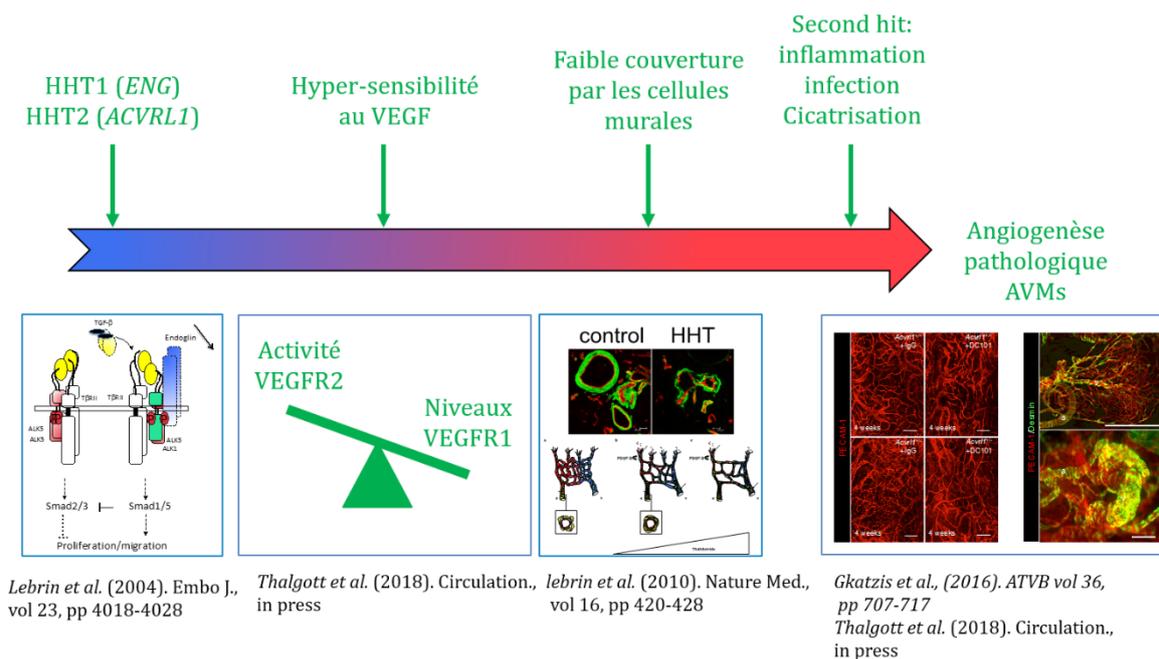


Figure 3a: Apport des modèles murins dans la compréhension du développement des AVMs causé par HHT1 et HHT2.

Les modèles murins les plus fréquemment observés dans l'étude de cette maladie se focalisent sur les mutations présentes dans les gènes *Eng* (HHT1) et *Acvrl1* (HHT2). Cependant, comme mentionné précédemment il existe d'autres types de la maladie caractérisés par des mutations au niveau d'autres gènes (codant *SMAD4*, *BMP9*,...). Récemment, un modèle murin a permis de mettre en évidence l'importance du couple *BMP9/10* dans l'apparition de symptômes caractéristiques d'HHT. Dans ce modèle, les souriceaux reçoivent une dose d'anticorps bloquant *BMP9/BM10* par l'intermédiaire de la lactation. Il a été observé, au niveau de leur rétine, une hyper-vascularisation, un défaut dans la spécification artérielle ainsi que des grosses AVMs (Ruiz et al. 2016). Un autre modèle a également été mis en place afin d'étudier l'impact des mutations dans le gène codant *SMAD4* sur le développement des AVMs chez les individus adultes. Celui-ci permet d'induire une délétion du gène spécifiquement dans les cellules endothéliales. L'analyse des rétines de ces souris indique une prolifération accrue des cellules endothéliales et un défaut dans la couverture des vaisseaux par les cellules murales (Crist et al. 2018). L'ensemble de ces modèles murins ont, jusqu'à présent, été indispensables afin de mieux comprendre le développement de la maladie chez les individus adultes. Ils permettent également de faire un lien et de nuancer ce qui est observé in vitro.

1.3.3 La variabilité phénotypique

1.3.3.1 La relation génotype/phénotype

La quantité impressionnante d'études cliniques a permis d'acquérir de nombreuses connaissances quant aux phénotypes développés par les patients et de les mettre en relation avec le gène muté responsable de la maladie. De cette manière, il apparaît que les symptômes tels que les épistaxis, les télangiectasies au niveau du visage, des lèvres, des mains et des intestins ainsi que les AVMs cérébraux, pulmonaires et hépatiques sont tous observés tant dans HHT1 que HHT2, mais également dans le syndrome combiné JP/HHT. Cependant, le taux d'AVMs observés varie d'un sous-type à un autre. En effet, les malformations artério-veineuses des poumons et du cerveau sont plus souvent observées dans les cas d'HHT1 ($\pm 50\%$ versus 5% pour les AVMs pulmonaires et 15% versus 1% pour les AVMs cérébraux) alors que celles engendrant des problèmes hépatiques le sont plus chez les patients atteints d'HHT de type 2 ($\pm 40\%$ versus 8%). En outre, il semblerait que les télangiectasies dermiques apparaîtraient plus tôt dans les cas d'HHT1 (Lacout et al. 2010). Concernant le syndrome combiné, le faible pourcentage de patients atteints ne permet pas d'être aussi catégorique que pour les deux principaux sous-types mais il semblerait que les AVMs dans les organes solides soient tout autant développées que pour HHT1 et 2 (Letteboer et al. 2006; Shovlin 2010; McDonald et al. 2015). Une autre caractéristique sous-jacente à la maladie, mais qui n'apparaît que rarement et exclusivement chez les patient HHT2, est l'hypertension artérielle pulmonaire (PAH). Les groupes de Soubrier et Harrison ont d'ailleurs montré que la PAH observée dans le contexte de la télangiectasie hémorragique héréditaire était liée exclusivement à des mutations dans *ACVRL1* (Harrison et al. 2003; Soubrier et al. 2013). Enfin, comme à l'heure actuelle, seulement trois individus présentent une mutation pathogène dans le gène codant BMP9, il est difficile de mettre en évidence des particularités phénotypiques de ce dernier sous-type d'HHT. Cependant, chez un de ces cas, les télangiectasies sont plus nombreuses et ne sont pas limitées aux zones habituelles ; un grand nombre est notamment observé sur les bras (Wooderchak-Donahue et al. 2013).

Comme il existe une certaine variabilité phénotypique entre les différents sous-types de la télangiectasie hémorragique héréditaire, il est logique de se demander si une telle variabilité existe également entre différentes mutations au sein d'un même sous-type. Jusqu'à maintenant, ceci n'a pas encore été observé et s'explique en partie par le fait que

toutes ces mutations dans les gènes *ENG*, *ACVRL1* ou encore *MADH4* sont présentes sur des allèles haplo-insuffisant.

Malgré le fait que le phénomène d'haplo-insuffisance soit maintenant largement accepté en ce qui concerne endogline et ALK1, ce mécanisme n'explique pas pourquoi les lésions vasculaires liées à HHT n'apparaissent qu'au sein de certains organes et ne sont pas présentes dans l'ensemble des organes et tissus des individus affectés. Ce paradoxe peut être expliqué par le besoin d'un second évènement (lésions ou blessures, inflammation, infection, ischémie, stimulus angiogène,...) qui, combiné à l'haploinsuffisance de la protéine, provoque le développement de la lésion (**Figure 3b**). Par conséquent, dans les conditions d'haploinsuffisance rencontrées dans les cas d'HHT, le niveau des protéines n'atteindrait pas le seuil minimum pour exercer leur fonction complète et réagir à l'élément déclencheur, ce qui génère alors les lésions vasculaires (Ruiz-Llorrente et al. 2017).

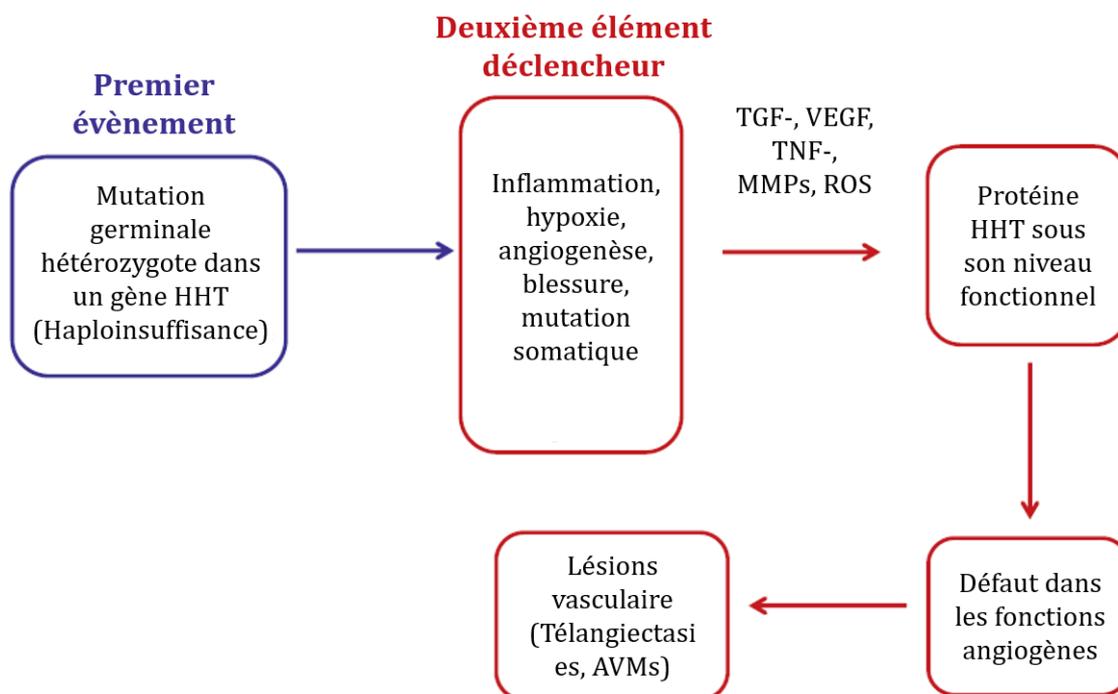


Figure 3b: Modèle du deuxième élément déclencheur dans HHT. Dans un premier temps, les mutations provoquant l'apparition d'HHT conduisent à l'haploinsuffisance de la protéine correspondante (premier évènement de la maladie). Dans un deuxième temps, possibilité de l'apparition d'un élément déclencheur impliquant l'inflammation, l'hypoxie, l'angiogenèse ou la présence d'une autre mutation somatique dans un gène HHT. L'ensemble de ces évènements peuvent conduire à un environnement cellulaire où les protéines impliquées dans la maladie se trouvent sous leur niveau fonctionnel. Ceci provoque un défaut dans les fonctions angiogènes et à l'apparition de télangiectasies et d'AVMs. Figure adaptée de Ruiz-Llorrente et al. 2017.

1.3.3.2 Les variabilités familiales

Les études du développement de la maladie au sein d'une même famille ont également mis en évidence une certaine variabilité dans la sévérité des symptômes observés entre les individus malades. En effet, en plus des mutations principales causant HHT, des gènes modificateurs ou l'intervention de l'environnement pourraient avoir un rôle dans la sévérité des lésions induites par la maladie. C'est à l'équipe de Bourdeau que l'on doit une des premières études murines mettant en évidence cette hétérogénéité grâce à l'utilisation de deux souches de souris différentes (129/Ola et C57BL6) mais toutes les deux mutées *Eng^{+/-}*. Ces souris présentent des symptômes caractéristiques d'HHT mais à des degrés divers, la souche 129/Ola étant la plus susceptible de développer les symptômes caractéristiques (Bourdeau et al. 2001). Récemment, deux variations de gènes ont été étudiées pour leurs effets modificateurs sur le phénotype HHT. Il s'agit des gènes *PTPN14*, codant pour une phosphatase du même nom, et *ADAM17*, codant pour une métalloprotéinase et une dysintégrine. Respectivement, *PTPN14* a un impact sur l'apparition de malformations artério-veineuses pulmonaires dans différents cas d'HHT et *ADAM17* influence la présence de PAVMs mais uniquement dans le cas d'HHT1 (Benzinou et al. 2012; Kawasaki et al. 2014). Ces récentes découvertes encouragent la recherche d'autres modificateurs génétiques encore inconnus qui permettront de mieux comprendre ces variations phénotypiques (McDonald et al. 2015). En conclusion, ces modificateurs génétiques sont des gènes mutés ou des polymorphismes, qui ne sont pas capable d'annuler complètement la fonction d'une protéine ou qui ne peuvent pas, par eux-mêmes, provoquer l'apparition de la maladie. Le développement du séquençage de génome à haut débit permettra d'aider à l'identification de ces divers candidats provoquant ces hétérogénéités familiales (Ruiz-Llorente et al. 2017).

1.4 Diagnostic et traitements

A l'heure actuelle, la principale méthode de diagnostic reste basée sur les critères de Curaçao (**Table I**) (Van Gent et al. 2010). Normalement, lorsque trois critères sont détectés chez un patient, les cliniciens considèrent le diagnostic comme définitif ; l'individu est alors atteint de la télangiectasie hémorragique héréditaire. Cependant, lorsque parmi ces trois critères on ne retrouve pas d'antécédents familiaux de présence d'AVMs viscéraux, il est préférable de classer ce cas en « suspecté » plutôt qu'en « définitif ». En effet, la maladie de Von Willebrand est aussi caractérisée par de nombreux saignements de nez et par l'apparition de télangiectasies. Il est alors important d'investiguer les antécédents

familiaux pour cette maladie afin de déterminer le bon diagnostic qui permettra une meilleure gestion du patient (Shovlin 2010).

1.4.1 Le diagnostic moléculaire

Le diagnostic moléculaire, par l'intermédiaire de test génétique est un outil précieux lorsqu'un individu est diagnostiqué ou est suspecté d'être atteint d'HHT. Ceci, principalement, pour deux raisons :

- Premièrement, il est important de déterminer si le patient n'est pas affecté par une mutation dans le gène codant SMAD4. En effet, comme mentionné plus haut, ces mutations sont à l'origine du syndrome combiné JP/HHT et le patient nécessitera donc une gestion clinique différente dû au risque de développement de polypes gastro-intestinaux et à leur potentiel cancéreux (Gallione et al. 2004; Faughnan et al. 2011).

- Deuxièmement, les symptômes évidents peuvent apparaître tard dans la vie d'un individu (épistaxis pas avant 12 ans et télangiectasies aux alentours de 30 ans (AAssar et al. 1991; Sharathkumar and Shapiro 2008; Faughnan et al. 2011) alors que les malformations artério-veineuses viscérales et particulièrement les pulmonaires ou cérébrales sont déjà présentes à la naissance. Ces AVMs peuvent causer, de manière inopinée, des complications sévères même à un très jeune âge. Il est dès lors indispensable de tester génétiquement les individus provenant d'une famille présentant une mutation ayant déjà causé des cas d'HHT. Si la présence d'une telle mutation est confirmée, les enfants seront alors pris en charge pour détecter la présence potentielle de lésions cérébrales et pulmonaires (Morgan et al. 2002; Mei-Zahav et al. 2006).

Depuis que les tests génétiques sont disponibles pour l'établissement de diagnostics, le protocole classique pour déterminer la présence de mutations pathogènes causant HHT implique l'utilisation de séquençage de type Sanger. Ceci principalement pour les mutations ponctuelles et de la MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplifications*) pour la détection de larges délétions et duplications. Début des années 2010, les laboratoires ARUP (Salt Lake City, UT, USA) et des groupes de recherche de l'université de l'Utah ont mis au point un algorithme dans lequel les deux gènes principaux (*ENG* et *ACVRL1*) sont séquencés simultanément et analysés. Ensuite, si les analyses sont négatives pour ces deux gènes, le même protocole est réalisé sur le gène *MADH4* (McDonald et al. 2011; McDonald et al. 2015). Les récentes découvertes sur la présence de mutations pathogènes au sein des régions non-codantes (introns et 5'UTR) ont permis d'améliorer ce protocole en incluant ces régions géniques dans les tests diagnostiques. Les données

concernant ces mutations sont encore pauvres mais les premières analyses révèlent qu'approximativement 3% des patients atteints d'HHT, selon les critères de Curaçao, mais ne présentant a priori pas de mutations dans *ENG*, *ACVRL1* ou *MADH4*, ont une mutation profonde dans une région intronique d'*ENG* ou *ACVRL1* (Damjanovich et al. 2011; McDonald et al. 2015; Plumitallo et al. 2018).

Les avancées technologiques dans le domaine du séquençage (*Whole exome/genome sequencing* et *Next Generation Sequencing*) ont permis d'améliorer les méthodes de diagnostic. Le NGS permet de séquencer de nombreux gènes en un seul test et présente une sensibilité plus importante que les techniques classiques de séquençage de Sanger. Cependant, leurs coûts restent encore élevés. C'est pourquoi ces techniques ne seront utilisées qu'en dernier recours, lorsque tous les autres tests sont négatifs (**Figure 4**).

Lorsqu'un diagnostic a pu être déterminé, les patients sont pris en charge afin de leur administrer les meilleurs traitements possibles.

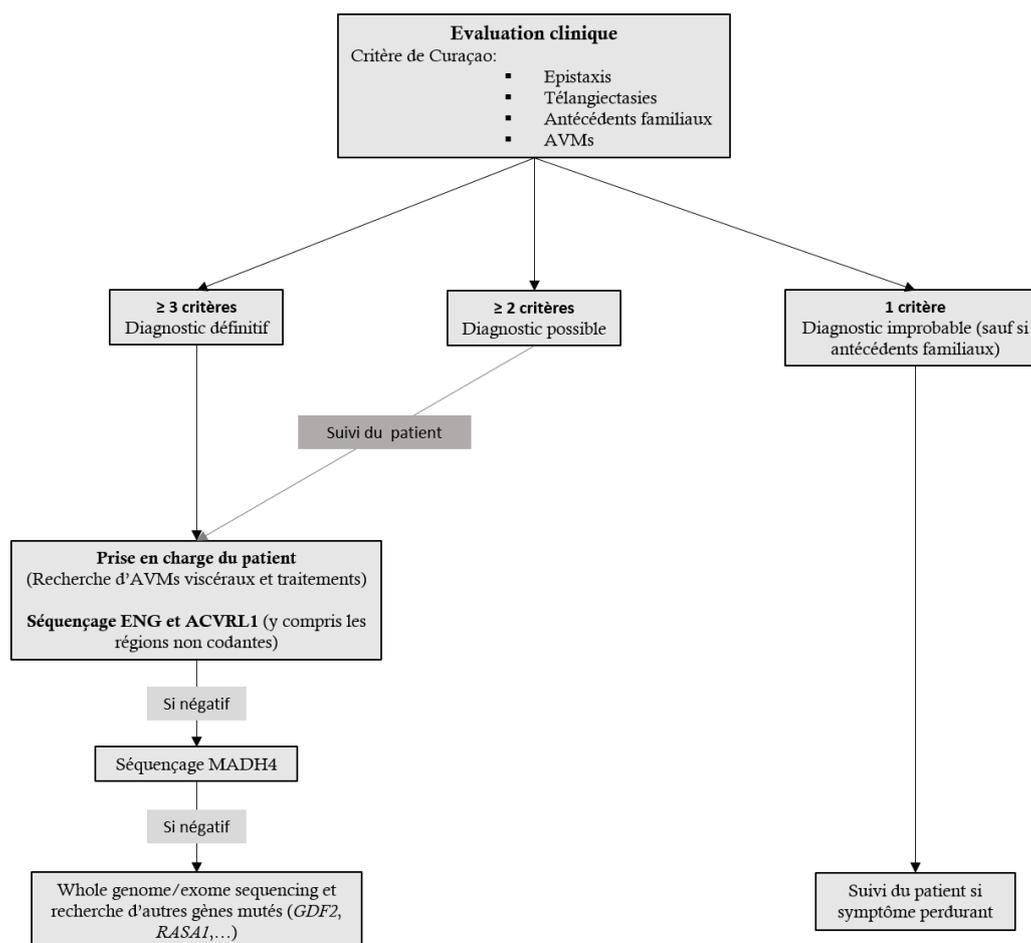


Figure 4: Diagnostic et gestion de la télangiectasie hémorragique héréditaire à l'aide de l'arbre à décision.
Figure adaptée de Dupuis-Girod et al. 2010, McDonald et al. 2015.

1.4.2 Les traitements

La télangiectasie hémorragique héréditaire est la cause de problèmes pouvant avoir un impact plus ou moins important sur la vie des patients ; jusqu'au décès pour les cas les plus extrêmes. Cependant, aucun traitement ne permet encore d'en guérir. C'est pourquoi, le management de cette maladie nécessite une approche multidisciplinaire variant entre des interventions chirurgicales et des traitements médicamenteux moins intrusifs mais parfois très lourds.

1.4.2.1 Les thérapies chirurgicales

Les techniques chirurgicales, dans le cadre de HHT, sont diverses et dépendent fortement du type de malformations artério-veineuses à traiter. L'embolisation, technique consistant à injecter un produit à l'intérieur d'une artère pour la boucher et ainsi éviter ou limiter un saignement, est souvent utilisée pour le traitement de petites AVMs pulmonaires. Lorsque la taille de l'AVM est plus conséquente, les chirurgiens auront plutôt recours à une embolisation via un cathéter d'occlusion dont le principe reste le même mais le produit d'embolisation est remplacé par un système artificielle (un ballonnet, généralement) qui vient alors obstruer complètement le vaisseau, fermant dès lors la malformation artério-veineuse (Trerotola & Pyeritz 2010). Le traitement des AVMs cérébraux est toujours controversé car très compliqué à atteindre sans mettre la vie du patient en danger. Cependant, lorsque ces malformations sont détectées et considérées comme accessibles, l'embolisation peut être réalisée (McDonald et al. 2011; Ruiz-Llorente et al. 2017). Les malformations artério-veineuses hépatiques sont assez fréquentes mais dans la plupart des cas restent asymptomatiques. Néanmoins, certains de ces AVMs peuvent conduire à une importante perte des fonctions hépatiques et cardiaques. Le traitement de ces malformations est compliqué car l'embolisation, contrairement aux PAVMs, n'est absolument pas efficace et conduit souvent à un infarctus hépatique léthal. La solution la plus adéquate à l'heure actuelle, lorsque les traitements médicamenteux n'ont pas eu l'effet escompté, est la transplantation. Les saignements gastro-intestinaux sont rarement traités par chirurgie mais chez certains patients, en cas de saignements abondants, une ablation endoscopique ou une résection des zones hémorragiques est nécessaire. Il en est de même pour les épistaxis. Toutefois, des petites interventions au laser peuvent être réalisées à proximité des télangiectasies nasales. Lorsque ces saignements de nez sont très

importants, des méthodes chirurgicales peuvent être exercées. Voici les deux méthodes les plus souvent utilisées: la dermoplastie septale et la technique modifiée de Young. La première est une technique qui consiste à remplacer la muqueuse mince du nez par une couche de peau épaisse. Cette méthode peut réduire considérablement la fréquence et la sévérité des saignements mais nécessite un soin particulier pour maintenir le nez hydraté et propre. La deuxième méthode est basée sur un traitement connu pour les individus souffrant de rhinites. Elle consiste à obstruer définitivement, par chirurgie, les narines. En effet, il semblerait que l'arrêt du flux d'air au travers des cavités nasales permettrait de réduire les traumatismes qui leur sont occasionnés et qui seraient la cause des épistaxis. Cependant, cette technique de base n'est pas très populaire auprès des patients de par son caractère définitif. C'est ainsi que la technique modifiée de Young a été mise en place lors de laquelle la fermeture chirurgicale des narines est réalisée grâce à un dispositif temporaire (SilasticTM obstruator) (Woolford et al. 2002; Fiorella et al. 2005; Ruiz-Llorente et al. 2017). Ces traitements permettent de réduire considérablement les saignements de nez, réduisent l'anémie qui en découle et améliorent la qualité de vie des patients.

1.4.2.2 Les thérapies pharmacologiques

Ce type de thérapie est particulièrement utile pour gérer les saignements gastro-intestinaux et de nez. En effet, ceux-ci peuvent conduire à des anémies sévères et de nombreuses déficiences, notamment en fer. Il est dès lors important de pouvoir réduire efficacement la fréquence et la gravité de ces hémorragies. Cependant, les techniques pharmacologiques sont très nombreuses, apportant chacune des avantages et des inconvénients. La suite de cette introduction permettra de mieux percevoir les molécules actuellement disponibles.

Les anti-fibrinolytiques

Ces molécules permettent de stabiliser le réseau de fibrine et par conséquent de réduire les saignements. Il s'agit donc d'un traitement de choix dans le cadre des épistaxis. L'antifibrinolytique le plus utilisé dans le cadre d'HHT est l'acide tranexamique (TA). En plus de son action inhibitrice de la fibrinolyse caractéristique de HHT, il possède aussi la capacité d'augmenter la quantité d'endogline et d'ALK1 permettant de légèrement contrebalancer l'haploinsuffisance observée chez les patients HHT1 et 2. L'utilisation de cette molécule a été étudiée sur les patients et permet de réduire les épistaxis dont ils sont

atteints (Geisthoff et al. 2014). Les effets secondaires sont assez faibles mais l'utilisation du TA sera évitée chez les patients susceptibles aux thromboses.

Les thérapies hormonales

Les œstrogènes et la progestérone ont été expérimentés, il y a quelques années et ont montré des effets intéressants sur la réduction des saignements chez des femmes atteintes de HHT (McDonald et al. 2011; Ruiz-Llorente et al. 2017). Néanmoins, les médecins se sont rapidement tournés vers une autre approche : l'utilisation des modulateurs spécifiques des récepteurs des œstrogènes (SERMs). Plusieurs études cliniques ont d'ailleurs montré l'efficacité du tamoxifène dans la réduction des saignements de nez chez les patients HHT. Le raloxifène, un autre SERM, a également été testé et a montré des effets réducteurs sur la fréquence et la quantité des épistaxis. De plus ce deuxième modulateur permet d'augmenter le niveau d'hémoglobine des patients. Enfin, une étude récente a mis en exergue l'efficacité d'un autre SERM dans la thérapie hormonale de HHT. Il s'agit du bazedoxifène. Ce dernier présente les mêmes résultats que le raloxifène mais présente au moins deux avantages : son effet est observé plus rapidement et le coût de son utilisation est plus rentable. En plus de leurs effets sur les épistaxis et sur l'hémoglobine, le raloxifène et le bazedoxifène sont capables d'augmenter l'expression de l'endogline et d'ALK1 en compensation de l'haploinsuffisance observée dans la télangiectasie hémorragique héréditaire (Yaniv et al. 2009; Albiñana et al. 2010; L.M. et al. 2015).

L'immunosuppresseur FK506

Le FK506, également connu sous le nom de tacrolimus, est un immunosuppresseur approuvé cliniquement pour son usage lors de transplantations d'organes. C'est d'ailleurs de par cet usage qu'il a également été étudié pour son rôle dans la télangiectasie hémorragique héréditaire. Il y a de nombreuses années, une femme atteinte d'HHT a reçu une transplantation du foie. Elle a ensuite été traitée avec l'agent immunosuppresseur, le FK506. C'est alors que ses symptômes caractéristiques d'HHT ont commencé à s'atténuer et même à disparaître, un mois après le début du traitement. De plus les symptômes n'étaient toujours pas réapparus un an après la transplantation et l'administration du tacrolimus. Basé sur ces résultats cliniques encourageants, des études *in vitro* ont été menées pour comprendre le mode de fonctionnement de cet immunosuppresseur sur HHT. Le groupe de Botella a pu montrer que le FK506 est capable d'augmenter le niveau de protéine et d'ARNm de l'endogline et d'ALK1. De plus ce composé semble accroître la voie de signalisation d'ALK1 et moduler la tubulogénèse et la migration des cellules endothéliales (Albiñana et al. 2011; Ruiz-Llorente et al. 2017). De part ces différentes

propriétés, le tacrolimus semble être un immunosuppresseur de choix lors des transplantations hépatiques de patients atteints d'HHT.

Les thérapies anti-angiogènes

Le fait que les épistaxis et les différents saignements dus aux télangiectasies gastro-intestinales soient causés par la formation d'un système vasculaire anormal a soulevé un intérêt pour les thérapies ciblant les vaisseaux sanguins. De telle manière, l'utilisation d'agents anti-angiogènes pour réduire la quantité de vaisseaux anormaux dans la muqueuse nasale est désormais courante.

Le fait que VEGF est le facteur principal de l'angiogenèse et l'observation que le taux de ce dernier étant plus élevé chez les patients HHT en fait une cible de choix dans ce genre de thérapie (Sadick 2005). L'existence d'agents bloquant le VEGF est connue depuis longtemps dans la lutte contre le cancer. L'une de ces molécules est le bevacizumab (ou Avastin) : un anticorps de type IgG1 qui se lie au VEGF et empêche ainsi sa liaison avec ses récepteurs membranaires. Son administration par intraveineuse chez les patients atteints de HHT a permis de mettre en évidence son efficacité. Plusieurs études ont d'ailleurs montré que suite à un tel traitement, les individus atteints de HHT voient leurs symptômes diminuer (Ou et al. 2016; Guilhem et al. 2017). Cependant, il est important de mentionner deux études qui ont montré que l'administration du bevacizumab par voie nasale ne réduit pas statistiquement les épistaxis. De plus, des effets secondaires importants ont été observés chez de nombreux patients ; ceux-ci allant de blessures ne cicatrisant pas correctement, de vomissements à des évènements plus graves comme la perforation des intestins (Whitehead et al. 2016; Dupuis-Girod et al. 2016; Guilhem et al. 2017). Des études plus approfondies seront nécessaires pour mieux évaluer le rapport bénéfices/risques du bevacizumab chez les patients HHT.

Les anticorps bloquant les récepteurs à tyrosine kinase (TKIs) ont également été étudiés comme traitement d'HHT (Sorafenib, Sunitinib, Erlotinib et Pazopanib). Ces cibles font partie d'une famille de protéines membranaires parmi laquelle on retrouve les différents récepteurs du VEGF mais aussi d'autres facteurs angiogènes comme le bFGF et l'EGF. Cependant, les résultats obtenus sur des modèles murins présentent de fortes variabilités. Certains inhibiteurs ont des impacts sur l'hémoglobine, les saignements gastro-intestinaux alors que d'autres ont des impacts sur l'anémie découlant des saignements. L'erlotinib, lui, empire les saignements gastro-intestinaux (Ruiz-Llorente et al. 2017).

La thalidomide, tristement célèbre depuis les années 1960, était utilisée pour réduire les nausées et les vomissements des femmes enceintes. Toutefois, elle a été retirée du marché car responsable de nombreuses malformations chez les nouveau-nés. Les chercheurs se sont rapidement rendu compte que ce médicament ciblait l'angiogenèse et provoquait un défaut dans l'approvisionnement sanguin nécessaire au bon développement des organes et tissus des fœtus. Cependant, ces dernières années la thalidomide a fait son retour dans le domaine médical. L'utilisation très contrôlée de cette dernière a permis de réduire des hémorragies dans diverses pathologies gastro-intestinales par exemple. Elle est également utilisée comme drogue anti-angiogène dans les cas de cancer. C'est ainsi qu'elle a également été testée dans la thérapie de la télangiectasie hémorragique héréditaire où elle permet de réduire les épistaxis en favorisant le recrutement des péricytes. Ces derniers sont importants pour la maturation et la stabilité des vaisseaux sanguins (Lebrin et al. 2010). Ce médicament est donc relativement efficace dans le cadre d'HHT, particulièrement dans la réduction de la fréquence des saignements de nez. Néanmoins, de nombreux effets secondaires (malformations infantiles, dépression, fatigue, faiblesse musculaire, perte de connaissance) sont également observés et n'encouragent pas les patients à continuer, voire même à débiter ce traitement (Hosman et al. 2015).

Enfin, un dernier type de drogue ciblant l'angiogenèse a montré des effets dans le cadre d'HHT. Il s'agit des bêtabloquants parmi lesquels on retrouve le propranolol et le timolol. Plusieurs études ont montré que l'utilisation de ces molécules permet de réduire la gravité et la fréquence des épistaxis chez les patients souffrant d'HHT (Ichimura et al. 2016; Mei-Zahav et al. 2017). Ces études sont encourageantes dans la recherche de nouvelles thérapies contre HHT. En effet, les patients traités avec ces médicaments, en plus d'améliorer leurs épistaxis, ne présentent pas d'effets indésirables. Par contre, des études plus approfondies sur un plus grand nombre de sujets seront nécessaires pour déterminer la véracité de ces premiers résultats (Ruiz-Llorente et al. 2017).

En conclusion, il existe de nombreuses possibilités de thérapies ciblant l'angiogenèse, toutes apportant de nouvelles avancées, tant dans la compréhension de la maladie que dans l'amélioration de la qualité de vie des patients. Cependant, de nombreux effets secondaires parfois très indésirables sont observés. La thérapie idéale n'a donc pas encore été trouvée. Il est nécessaire de continuer la recherche sur d'autres drogues. De plus, comme dans différentes autres maladies (telles que le cancer), l'utilisation de plusieurs molécules combinées pourrait également augmenter les effets encourageants observés avec les molécules seules.

II. La superfamille du TGF- β

La grande famille du TGF- β comprend de nombreux ligands et récepteurs différents qui régulent de nombreuses fonctions cellulaires parmi lesquelles la prolifération, la migration, l'apoptose ou encore la différenciation de divers types cellulaires. Elle est également essentielle au développement embryonnaire. Un dysfonctionnement d'un ou plusieurs de ses membres conduit à l'apparition de pathologies allant des cancers à diverses maladies héréditaires comme la télangiectasie hémorragique héréditaire. La signalisation intracellulaire des ligands de cette famille est bien conservée et peut paraître relativement simple. En effet le ligand se fixe à un récepteur transmembranaire, activant les SMADs intracellulaires et la régulation de l'expression de gènes. Toutefois, cette simplicité apparente contraste avec la complexité des réponses biologiques induites, faisant de cette famille une des plus complexes présente chez l'homme.

2.1 Les acteurs moléculaires et leur signalisation

2.1.1 Les facteurs solubles de la superfamille du TGF- β

Le premier membre de cette famille a été découvert au début des années 1980 pour sa capacité à induire la croissance des fibroblastes (Sporn 2006). Depuis lors, plus de 40 nouveaux membres participant à la régulation de nombreuses fonctions cellulaires y ont été ajoutés. Au sein de cette classe de protéines, on distingue plusieurs sous-familles comme celle des TGF- β s (*Transforming Growth Factors- β*), celle des BMPs (*Bone Morphogenetic Protein*), celle des GDFs (*Growth and Differentiation Factor*), celle de MIF (*Müllerian Inhibitory Factor*) et celle des activines/inhibines (**Figure 5**) (Schmierer & Hill 2007; Santibañez et al. 2011).

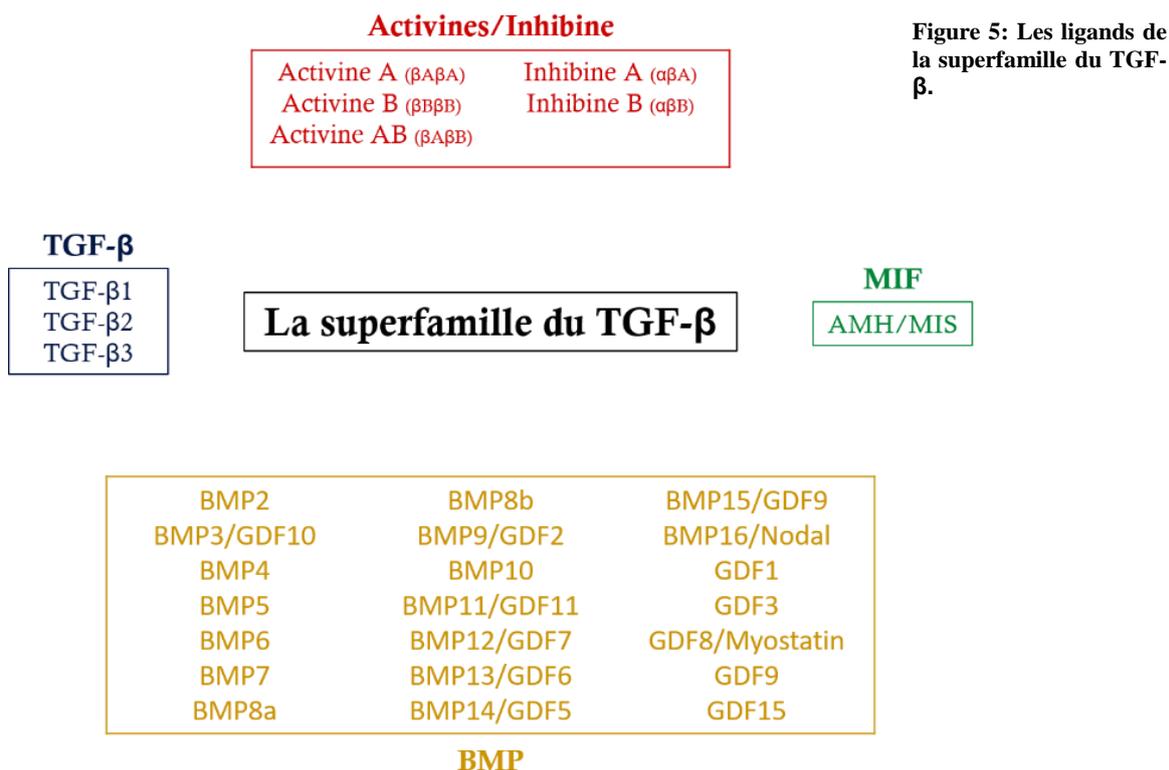


Figure 5: Les ligands de la superfamille du TGF- β .

Parmi la sous-famille des TGF- β , on distingue 3 isoformes exprimées chez l'humain, les TGF- β 1, 2 et 3. Parmi la famille des BMPs, dont les membres sont particulièrement connus pour leurs rôles dans l'ostéogenèse et la neurogenèse, on retrouve notamment les BMP2-15, les GDF1-3, GDF5-11 et GDF15 mais également un autre facteur, Nodal (aussi connu sous le nom de BMP16). Ce dernier joue un rôle essentiel dans les étapes précoces du développement (Schier 2009). La sous-famille MIF est exclusivement constituée de MIF, aussi connue sous le nom d'AMH (*Anti-Müllerian Hormone*) ou MIS (*Müllerian Inhibitory Substance*). Cette protéine joue un rôle dans la détermination du sexe masculin (di Clemente & Belville 2006). Enfin, la sous-famille des activines/inhibines est composée de 3 activines différentes (A, B et AB) et 2 inhibines (A et B). Les activines sont formées à partir d'homo- ou d'hétéro-dimères de sous-unités β (β A, β B, β C et β E) alors que les inhibines sont des hétérodimères d'une sous-unité α et d'une sous-unité β (β A ou β B) (**Figure 5**) (Xia & Schneyer 2009; Stenvers & Findlay 2010).

Les protéines faisant partie de cette famille sont des facteurs de croissance présentant une structure et un mode de fonctionnement similaires. En effet, la plupart d'entre-eux sont synthétisés sous la forme d'un dimère de pré-proprotéine. Un clivage est réalisé par des protéases de la famille des SPC (*Subtilisin-like Proprotein Convertase*) pour obtenir une forme mature qui est alors sécrétée dans le milieu extracellulaire. Il existe bien sûr des

exceptions comme pour le précurseur de Nodal qui est capable, dans certaines conditions, de se fixer sur son récepteur et d'induire une signalisation sans avoir été maturé (Ben-Haim et al. 2006). De plus, certaines protéines de cette famille nécessitent des modifications supplémentaires. C'est le cas des TGF- β s et de certains GDFs (8 et 11) qui sont sécrétés sous une forme non active et auront besoin de l'action d'une métalloprotéase afin de relarguer la forme complètement active (Ge et al. 2005).

Les membres de la superfamille du TGF- β partagent également une caractéristique structurale qui constitue l'empreinte d'appartenance à celle-ci. En plus de leur structure dimérique, on retrouve au sein de la forme mature un nœud de cystéines. Il s'agit de 6 cystéines strictement conservées formant 3 ponts disulfures intramoléculaires permettant l'établissement de la structure tridimensionnelle et par conséquent fonctionnelle de ces protéines (Schmierer & Hill 2007; Santibañez et al. 2011; Galat 2011).

2.1.2 Les récepteurs et leur signalisation

Les ligands de cette famille sont tous capables de se lier à 2 types de récepteurs, ceux de types I et II. Ces récepteurs partagent une même structure composée d'un domaine extracellulaire riche en cystéines (spécifique du ou des ligands avec le(s)quel(s) ils possèdent une affinité), un domaine transmembranaire et un domaine intracellulaire fortement conservé présentant une activité Sérine-Thréonine (Ser-Thr) kinase (Shi & Massagué 2003). On distingue 7 récepteurs de type I, également appelés les ALK ainsi que 5 récepteurs de type II. Les récepteurs de type I se distinguent structurellement de ceux de type II par la présence, à côté du domaine kinase, d'une région GS riche en glycines. Cette dernière joue un rôle important dans la régulation et la transduction du signal (Massagué & Gomis 2006; Santibañez et al. 2011).

L'interaction entre les ligands et les récepteurs se déroule comme suit : le ligand se lie d'abord à un dimère constitutivement actif de récepteurs de type II. Ensuite, cette liaison permet le recrutement d'un dimère de récepteurs de type I et la formation d'un hétérotétramère. Les récepteurs de types I (RI) et II (RII) n'interagissent pas directement entre eux mais via la liaison au ligand. Les RII phosphorylent alors les RI au niveau de sérines et thréonines du domaine GS. Avant la liaison du ligand et les événements de phosphorylation, le domaine GS sert de site de liaison à FKBP12, un inhibiteur de la voie. La phosphorylation du récepteur de type I permet le détachement de cette protéine inhibitrice, rendant le domaine GS disponible et servant alors de site d'attache aux protéines cytoplasmiques telles que les SMADs (Huse et al. 2001; Massagué & Gomis

2006). Ces effecteurs sont alors phosphorylés et peuvent jouer leur rôle dans la régulation de la transcription (**Figure 6**).

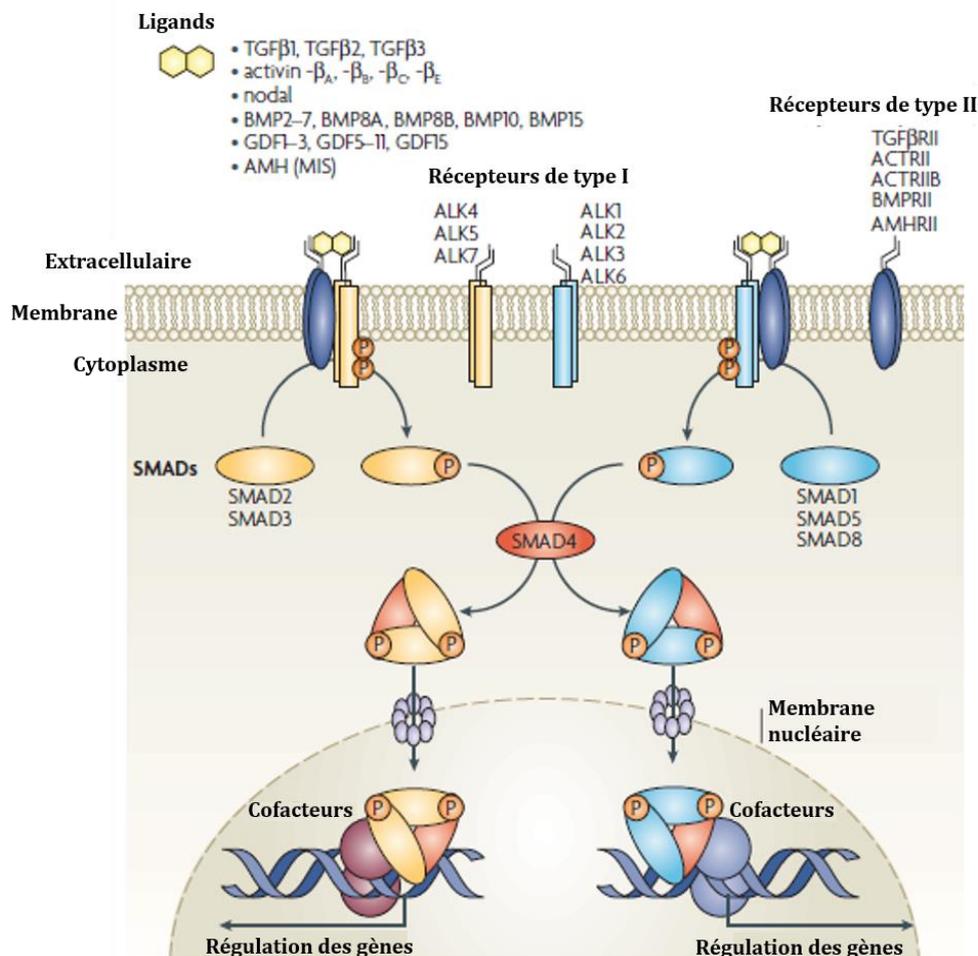


Figure 6: La signalisation de la superfamille du TGF-β. Les différents ligands de cette famille (voir Figure 5) sont capables de se fixer sur divers récepteurs membranaires. On distingue 7 récepteurs de type I (ALK) et 5 récepteurs de types II. Le ligand se fixe sur un dimère de récepteur de type II qui recrute alors un dimère de récepteur de type I. L'hétérotétramère ainsi formé subit des événements de phosphorylation au niveau de résidus sérine et thréonine permettant l'activation des SMADs cytoplasmiques. Ces derniers, une fois activés, se lient au Co-SMAD, SMAD4. Le complexe comprenant les SMADs régulateurs et SMAD4 se dirige vers le noyau. Dans le noyau, ces complexes permettent la régulation de l'expression de différents gènes cibles. Figure adaptée de Schmierer & Hill 2007.

2.1.3 Les SMADs, effecteurs intracellulaires

La signalisation intracellulaire de la famille du TGF-β est régulée par les protéines SMADs. On en distingue trois types :

- Les SMADs régulateurs ou R-SMAD (SMAD1, SMAD2, SMAD3, SMAD5 et SMAD8/9)
- Le SMADs coopérateur ou Co-SMAD (SMAD4)
- Les SMADs inhibiteurs ou I-SMAD (SMAD6 et SMAD7)

Lorsque ces protéines ne sont pas phosphorylées, elles sont inactives et généralement retenues dans le cytoplasme par une protéine nommée SARA (*SMAD Anchor for Receptor Activation*) ou encore par l'endofin (Shi & Massagué 2003). Comme mentionné ci-dessus, la phosphorylation du récepteur de type I permet le recrutement des R-SMADs et déstabilise l'interaction avec SARA. Ces SMADs sont alors phosphorylés, au niveau de deux résidus sérines, ce qui leur permet de former des complexes homomériques mais aussi hétéromériques et d'interagir avec SMAD4. Suite à la liaison du ligand à ses récepteurs s'ensuit l'activation des SMADs et la formation d'un complexe avec SMAD4. Ces complexes SMADs s'accumulent dans le noyau et une fois dans celui-ci, régulent l'expression de leurs gènes cibles (**Figure 6**).

Les Smads régulateurs et Smad4 possèdent tous deux domaines globulaires fortement conservés, MH1 et MH2. Le domaine MH1 est responsable de l'interaction avec l'ADN et possède un signal de localisation nucléaire. Le domaine MH2 est responsable des interactions des SMADs avec les récepteurs, des SMADs entre-eux mais également des Smads avec les facteurs de transcription, les coactivateurs et les corépresseurs. La région entre les domaines MH1 et MH2 est riche en proline et possède des résidus sérines et thréonines pouvant servir à la phosphorylation (Ross & Hill 2008).

Une fois dans le noyau, le complexe R-SMAD/Co-SMAD, par l'intermédiaire du domaine MH1 peut directement interagir avec des domaines SBEs (*SMAD-Binding Element*) présents dans l'ADN des gènes ciblés. Cette liaison est de faible affinité mais est essentielle pour l'activation de la transcription des gènes cibles des SMADs (Massagué & Wotton 2000) (**Figure 7**). Cependant, elle n'est pas toujours suffisante et l'interaction avec des facteurs de transcription est également nécessaire afin de former un complexe transcriptionnel de plus haute affinité pour l'ADN, permettant ainsi la régulation des gènes cibles (Shi & Massagué 2003; Santibañez et al. 2011). Chaque combinaison des SMADs avec un partenaire différent cible un certain nombre de gènes spécifiques dépendant de la spécificité de la liaison à l'ADN de cette combinaison. Parmi les gènes régulés par cette famille, il y en a deux très importants pour les cellules endothéliales. Premièrement, le TGF- β 1 est capable, par l'intermédiaire de SMAD2/3, d'activer l'expression de PAI-1 (*Plasminogen Activator Inhibitor-1*) qui contrôle la quiescence des CE. Deuxièmement, ce même ligand ainsi que plusieurs BMPs activent ID-1 (*Inhibitor of DNA binding 1*) par l'intermédiaire des SMAD1/5/8 et régule l'angiogenèse (Tabruyn et al. 2013).

Enfin, la voie des SMADs n'est pas toujours celle privilégiée par les ligands de cette famille. En effet, plusieurs études ont montré l'activation de voies telles que celles des

MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*), de NF- κ B (*Nuclear Factor κ B*), de PI3K (Phosphoinostide 3-kinase)/Akt ou encore de HIF-1 (*Hypoxia-Inducible Factor 1*) (Sánchez-Elsner et al. 2001; Massagué & Gomis 2006; Santibañez et al. 2011).

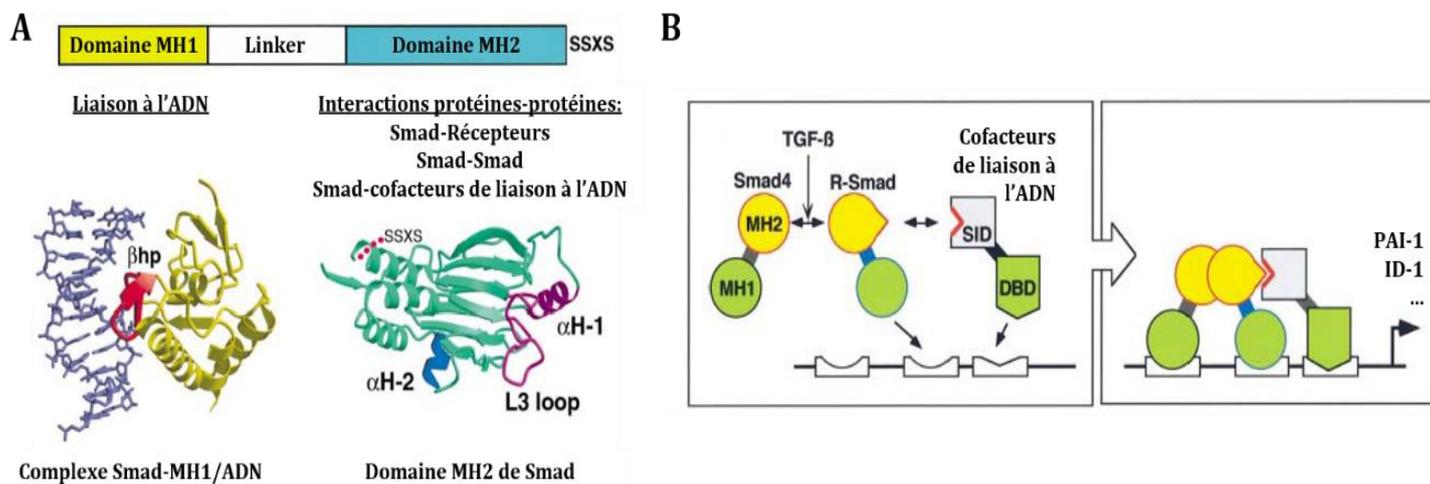


Figure 7: Les domaines responsables de la liaison des SMADs à leurs différents intermédiaires (récepteurs, SMADs, cofacteurs et ADN). (A) Représentation structurale du domaine MH1 de Smad3 lié à l'ADN (gauche) et du domaine MH2 de Smad2. Le domaine MH1 est responsable de la liaison à l'ADN et le domaine MH2 permet les interactions des SMADs entre eux mais également avec les récepteurs et les cofacteurs de liaison à l'ADN. (B) Modèle général de la régulation de l'expression de gènes cibles par les SMADs suite à la stimulation d'un ligand. La liaison à des cofacteurs de liaison à l'ADN permet notamment de renforcer l'interaction des SMADs avec l'ADN. Figure adaptée de Massagué & Wotton 2000.

2.1.3.1 La spécificité récepteurs/SMADs

Malgré le nombre de récepteurs de type I et II soit bien plus faible que le nombre de ligands, les possibilités d'hétérotétramères sont nombreuses. Cependant, chaque récepteur de type I ne pourra activer qu'un nombre restreint de R-SMADs :

- ALK4, ALK5 et ALK7 activent SMAD2 et SMAD3
- ALK1, ALK2, ALK3 et ALK6 activent SMAD1, SMAD5 et SMAD8

Ces interactions spécifiques ont permis de scinder la voie de signalisation en deux branches (**Figure 6**). Communément, on distingue d'une part la branche TGF- β -Activine-Nodal qui signale via ALK4, 5 et 7 et donc par l'intermédiaire des R-SMADs 2 et 3 et d'autre part la branche BMP-GDF qui, elle, signale via ALK1, 2, 3 et 6 et donc par l'intermédiaire des R-SMADs 1, 5 et 8.

Cependant, ce modèle est trop simple comparé à la réalité physiologique d'un organisme et par conséquent, il subsiste des exceptions avec certains GDFs. En effet, certains sont capables de signaler via les SMADs 2 et 3 ou encore les TGF- β s qui, dans les cellules endothéliales, sont capables d'activer à la fois ALK5 et ALK1 comme nous le verrons plus loin (Goumans et al. 2002; Goumans et al. 2003; Schmierer & Hill 2007).

2.1.4 Les régulations de ces voies de signalisation

Cette famille étant assez complexe, la régulation de ses voies de signalisation l'est également. En effet, elle s'opère sur plusieurs niveaux.

2.1.4.1 Les corécepteurs

L'activité des récepteurs de types I et II de la famille du TGF- β peut être régulée par les récepteurs de type III. Parmi ceux-ci, on distingue le betaglycan et l'endogline. Il s'agit de protéines transmembranaires qui possèdent un large domaine extracellulaire et un court domaine intracellulaire dépourvu d'activité kinase. Le betaglycan a une forte affinité pour les TGF- β 1, 2 et 3, pour l'activine A, ainsi que pour les BMP2, 4, 7 et GDF15 et permet d'augmenter l'affinité de ses ligands pour leurs RI et RII (Gatza et al. 2010). L'endogline est un récepteur préférentiellement exprimé à la surface des cellules endothéliales et présente une affinité importante pour le TGF- β 1, l'activine A, le BMP2 et le BMP7. De plus il est capable de lier le BMP9 et le TGF- β 3 sans l'intervention d'autres récepteurs de types I ou II. Cette protéine transmembranaire aura différents rôles en fonction du ligand impliqué. Par exemple, il a tendance à inhiber la voie du TGF- β /SMAD3 alors qu'il favorisera celle du BMP9/SMAD1/5 (Blanco et al. 2005)

L'expression de ces récepteurs de type III est souvent dépendante du type cellulaire, rendant cette régulation spécifique à certains tissus (Schmierer & Hill 2007; Santibañez et al. 2011).

2.1.4.2 Les Smads inhibiteurs

Lorsqu'une voie de signalisation est activée, il faut également qu'elle puisse être stoppée. Ceci nécessite des boucles de régulation négative. Dans le cas de cette voie de signalisation, elle peut être réalisée par l'intermédiaire des SMAD inhibiteurs (Smad6 et Smad7). Ils possèdent, comme les R-SMADs, un domaine MH2 mais le reste de leur structure diffère de manière assez importante. Les I-SMADs sont exprimés suite à la présence des TGF- β s et des BMPs d'une manière dépendante des R-SMADs. Lors de la découverte de ces SMADs inhibiteurs, il était admis qu'ils jouaient un rôle de compétiteurs avec les R-SMADs pour la fixation au niveau des récepteurs. Cependant, des études approfondies ont montré que SMAD7 recrute deux E3 ubiquitine ligases, SMURF1 et SMURF2, et les adresse au niveau du récepteur. Ceci permet l'initialisation de sa dégradation et la terminaison du signal. De plus, il a été observé que SMAD7 est également capable d'interagir avec la sous-unité GADD34 de la phosphatase PP1. De telle

manière, PP1 est amené au niveau des récepteurs et permet leur déphosphorylation (Schmierer & Hill 2007).

Comme les I-SMADs possèdent un domaine MH2 leur permettant d'interagir avec les récepteurs, ils sont également capables de se lier aux R-SMADs et Co-SMADs. Par conséquent, les ubiquitine ligases et les phosphatases peuvent aussi stopper la signalisation au niveau de ces deux types de SMADs. Un autre évènement se déroulant dans ce cas-ci est le complexe formé par les I-SMADs avec les R-SMADs qui empêche la formation du complexe R-SMAD-Co-SMAD et donc l'accumulation dans le noyau (Schmierer & Hill 2007; Smads et al. 2017).

Enfin, SMAD6 et SMAD7 sont également capables d'agir directement sur la régulation transcriptionnelle. Il a récemment été montré que SMAD7 est capable d'interférer avec la formation des complexes SMAD-ADN et de faire intervenir YY1 (Ying Yang 1) et HDAC-1 (Histone déacétylase-1) faisant de lui un véritable corépresseur transcriptionnel (Yan et al. 2014). En ce qui concerne SMAD6, l'interaction avec SMAD1 lui permet d'interagir directement avec le promoteur du gène ID-1 (un gène activé notamment par BMP9). De plus, la présence d'un motif particulier dans sa structure lui permet d'interagir avec un corépresseur transcriptionnel (CtBP). De la même manière que pour SMAD7, SMAD6 devient à son tour un véritable corépresseur transcriptionnel (Smads et al. 2017).

La liste de protéines avec lesquelles SMAD6 et 7 sont capable d'interagir est non exhaustive. Cependant, dans tous les cas les I-SMADs peuvent agir à plusieurs niveaux de la voie de signalisation : premièrement, par fixation au niveau des récepteurs de type I et par compétition négative pour les R-SMADs. Deuxièmement, par recrutement d'ubiquitines ligases et de phosphatases favorisant leur adressage aux récepteurs de types I. Troisièmement, ces deux mêmes mécanismes peuvent être appliqués directement en ciblant les complexes R-SMADs/Co-SMADs et donc jouer le rôle de corépresseur transcriptionnel.

2.1.4.3 Le cycle de recyclage

Lorsqu'une cellule n'est stimulée par aucun ligand de la famille du TGF- β , il existe un système lui permettant d'être prête à répondre rapidement à un futur stimulus. En effet, à l'état basal, les R-SMADs ont une localisation majoritairement cytoplasmique alors que SMAD4 est réparti de manière plus ou moins égale entre le cytoplasme et le noyau. Néanmoins, tout ceci n'est pas statique et il y a un échange continu entre le noyau et le

cytoplasme ; les R-SMADs étant plus rapidement exportés qu'importés du noyau. Lorsque la cellule est stimulée, les complexes SMADs sont importés dans le noyau et s'y accumulent. Une fois dans le noyau, il existe un équilibre entre les complexes SMADs activés et ceux étant impliqués dans la régulation de la transcription. Cependant, les phosphatases nucléaires interviennent constitutivement pour déphosphoryler ces complexes (R-SMADs-Co-SMADs) et les R-SMADs phosphorylés. Ainsi, une partie des SMADs sont exportés hors du noyau une fois déphosphorylés. Ceci permet de maintenir une quantité suffisante de SMADs dans le cytoplasme afin que la cellule puisse répondre à des modulations d'intensité du signal (Schmierer & Hill 2007) (**Figure 8**).

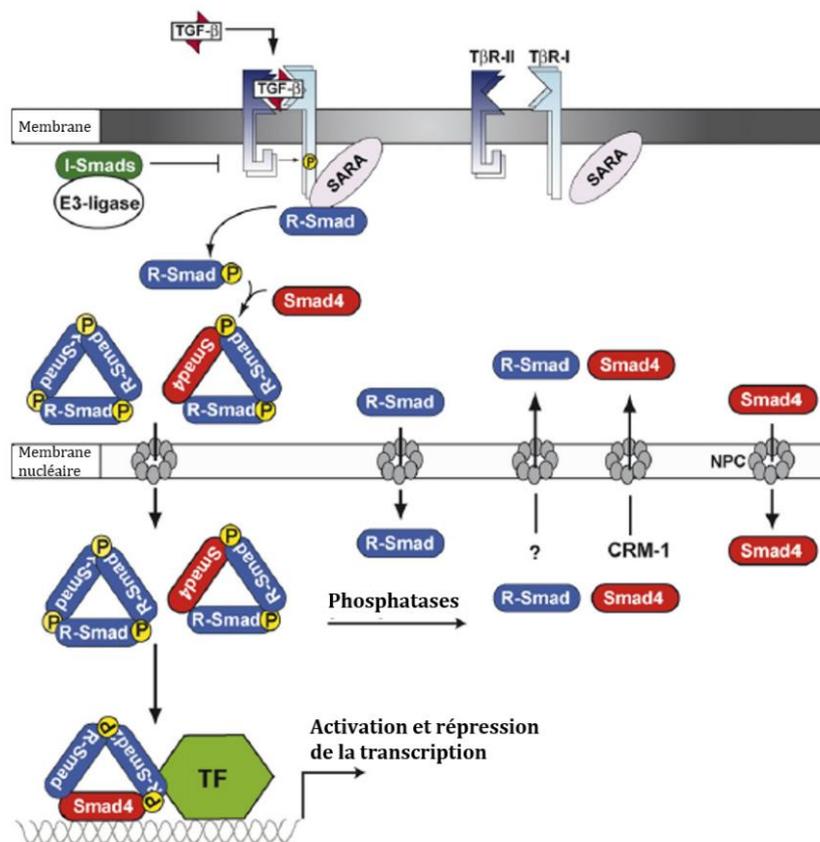


Figure 8: L'équilibre cytoplasme/noyau des SMADs. Les R-SMADs activés forment des complexes homomériques et tétramériques avec SMAD4. Ils s'accumulent dans le noyau et de concert avec des facteurs de transcription régulent positivement et négativement l'expression de certains gènes. La présence de phosphatases nucléaires permet le départ du groupement phosphate des R-SMADs. Smad4 et les R-SMADs non phosphorylés sont continuellement en équilibre entre le noyau et le cytoplasme. Les SMADs inhibiteurs, présents dans le cytoplasme, permettent une régulation négative de la voie et un retour à l'état basal. Figure adaptée de Ross & Hill

2.2 La signalisation du TGF-β dans les cellules endothéliales

Le système du TGF-β est impliqué dans un nombre très important de phénomènes physiologiques incluant la morphogenèse, le développement embryonnaire, la cicatrisation ou encore l'inflammation. Cette famille a donc un impact sur un très grand nombre de types cellulaires différents et le dysfonctionnement d'un ou de plusieurs de ses membres mène à l'apparition de maladies telles que des cancers, diverses maladies génétiques, des

problèmes inflammatoires ainsi que de nombreuses autres maladies affectant des organes comme les poumons, le système cardiovasculaire, les os et les muscles.

Il est dès lors difficile, dans le contexte de ce manuscrit, de pouvoir aborder tous les rôles et maladies dans lesquels cette voie de signalisation est impliquée. Le sujet principal de cette thèse portant sur une maladie vasculaire, je m'intéresserai principalement à l'impact de cette famille dans le développement vasculaire.

2.2.1 Les études génétiques

De nombreuses études génétiques chez la souris mais également chez l'humain ont montré l'importance de certains membres de la famille du TGF- β dans le développement vasculaire. En effet, une perte de cette signalisation conduit généralement à d'importants défauts dans la différenciation et la maturation du réseau vasculaire primaire. Ceci résultant en la formation de vaisseaux fragiles présentant une mauvaise intégrité de leurs parois.

C'est en 1992 que les premières souris déficientes en TGF- β 1 ont été étudiées. Ces dernières meurent *in utero* suite à d'importants défauts vasculaires (Dickson et al. 1995). Depuis lors, des souris déficientes pour la plupart des ligands et récepteurs de cette famille ont été étudiés. Ainsi, les Knock-Out (KO) pour TGF- β 1-3, ALK1, ALK5, endogline, BmprII montrent tous des anomalies vasculaires. Les symptômes observés chez ces souris sont repris, de manière non exhaustive, dans la **Table II**. Récemment, plusieurs études ont permis de comparer des KO constitutifs et des KO induits à l'âge adulte. Ces recherches ont mis en évidence que les effets les plus importants sont observés lors du processus angiogène et du développement vasculaire. Cependant, comme mentionné précédemment, l'induction de mutations à l'âge adulte, notamment au niveau d'ALK1 (Park et al. 2009), a montré l'apparition d'hémorragies et de malformations artérioveineuses pouvant rapidement conduire à la mort de ces souris. Ceci confirme l'importance d'une signalisation continue pour maintenir l'homéostasie et l'intégrité des vaisseaux (Jakobsson & van Meeteren 2013). D'autres études ont également montré que l'absence de SMAD5 et de l'endogline (corécepteur) provoque des problèmes vasculaires similaires chez les souris (Lebrin et al. 2004). Malgré que toutes ces mutations conduisent à des phénotypes relativement semblables, il existe certaines différences entre les différents KO mentionnés ci-dessus. En effet, alors que les déficiences en TGF- β et en TGF β RII ont un impact à la fois sur la formation du plexus vasculaire primaire (vasculogénèse) et sur l'extension et le remodelage de ce dernier en un réseau complexe (angiogénèse), les KO

ALK5, ALK1, endogline et SMAD5 semblent n'avoir d'effet que sur l'angiogenèse (Bertolino et al. 2005).

Les études génétiques de pertes de fonctions *in vivo*

Souris KO constitutives	Anormalités	Références
TGF- β 1	<ul style="list-style-type: none"> Défauts dans la vascularisation du sac vitellin Mauvaise différenciation des cellules endothéliales Problème dans l'hématopoïèse Létalité à E9,5-11,5 	Dickson 1995
ALK5	<ul style="list-style-type: none"> Défauts dans la vascularisation du sac vitellin Hémorragies et œdèmes (cerveau et cavité thoracique) Létalité à E10,5-13 	Carvalho 2007, Jakobsson and Van Meeteren 2013
TGF β R2	<ul style="list-style-type: none"> Défauts dans la vascularisation du sac vitellin Défauts dans le développement cardiaques Létalité à E10,5 Plus de problèmes lorsque la perte de fonction est induite à l'âge adulte 	Carvalho 2007, Jiao 2006
ALK1	<ul style="list-style-type: none"> Apparition de malformations artério-veineuses dans le sac vitellin Malformations vasculaires dans les poumons Perte de la différenciation artères-veines Létalité à E18,5 et jusqu'à 5 jours après la naissance 	Park 2009
Endogline	<ul style="list-style-type: none"> Similaire à ALK1 	Sorensen 2003

Table II : Récapitulatif des études génétiques de pertes de fonction des acteurs de la superfamille du TGF- β .

2.2.2 La balance du TGF- β dans les cellules endothéliales

L'ensemble des études *in vivo*, menées ces dernières années, ont donc démontré l'importance de la voie du TGF- β et en particulier des ligands TGF- β 1, BMP9 et des récepteurs ALK1, ALK5, TGF β R2 et endogline, à la fois dans l'angiogenèse et dans le maintien de l'intégrité des vaisseaux sanguins adultes.

La partie sur l'angiogenèse présentée dans ce manuscrit explique que ce phénomène peut être divisé en une phase d'activation et en une phase de maturation. Lors de conditions normales, les vaisseaux sont quiescents et couverts de cellules musculaires lisses (SMCs) et péricytes les stabilisant. La phase d'activation est caractérisée par un détachement de ces cellules murales et par la prolifération et la migration des cellules endothéliales. Il s'ensuit alors la phase de maturation où les SMCs et péricytes sont recrutés et où le nouveau vaisseau est stabilisé. Les nombreuses recherches menées ces dernières décennies ont mis en évidence les rôles multiples du TGF- β dans la régulation de

ces processus : il est capable d'à la fois stimuler et inhiber la prolifération des cellules endothéliales. De plus, plusieurs études ont également montré que les fonctions du TGF- β dans cette balance angiogène sont fortement dépendantes du contexte. En effet, de faibles doses de ce ligand stimulent la prolifération et la migration alors que des concentrations plus importantes ont l'effet inverse (Pepper et al. 1993; Goumans et al. 2002; Serrati et al. 2009). Le TGF- β est également responsable de la dégradation de la matrice extracellulaire (événement caractéristique de la phase d'activation) par l'intermédiaire de l'expression et de l'activation de métallo-protéases (MMP2 et 9). Ce ligand est donc capable de réguler directement l'angiogenèse (Bertolino et al. 2005).

Le point de vue selon lequel la signalisation de la famille du TGF- β est une simple cascade linéaire où les ligands TGF- β /Activin/Nodal activent la phosphorylation des SMAD2/3 et les BMP/GDFs celle des SMAD1/5/8 a été remis en questions il y a plusieurs années dans le cadre de l'effet de cette famille sur les cellules endothéliales. En effet, certaines études ont montré qu'au niveau de ce type cellulaire, ALK5 et ALK1 sont tous les deux exprimés et que le TGF- β est capable de lier les deux et ainsi d'activer respectivement la voie des SMAD2/3 et des SMAD1/5/8 (Ota et al. 2002; Goumans et al. 2002; Goumans et al. 2003). La signalisation via ALK1/SMAD1, 5, 8 induit l'activation de l'angiogenèse alors que la signalisation par l'intermédiaire d'ALK5/SMAD2,3 induit la phase de maturation. Par conséquent, TGF- β /ALK5/SMAD2,3 joue un rôle antagoniste dans la signalisation TGF- β /ALK1/SMAD1,5,8. En plus d'induire l'expression de gènes différents régulant les 2 phases de l'angiogenèse, ALK1 et ALK5 interagissent également à différents niveaux (Goumans et al. 2002; Goumans et al. 2003; Bertolino et al. 2005) **(Figure 9)**:

- Premièrement la signalisation impliquant ALK5 est essentielle pour l'activation d'ALK1. En effet, des études ont montrés chez des souris KO pour ALK5 que la voie TGF- β /ALK1 n'était pas correctement activée. Un modèle a alors été proposé selon lequel la formation d'un complexe entre le TGF β RII et ALK5 permettrait le recrutement et l'activation d'ALK1 et de sa signalisation en présence du TGF- β (Goumans et al. 2003).

- Deuxièmement, la simple activation d'ALK1 a montré un effet antagoniste via la signalisation par l'intermédiaire d'ALK5. Ainsi, l'activation d'ALK1 et la phosphorylation des SMAD1/5/8 inhibe la voie activée d'ALK5. Ce mécanisme de régulation semble avoir lieu en aval des R-SMADs.

- Enfin, le récepteur de type III connu sous le nom de l'endogline est également capable de réguler ces deux voies parallèles dans les cellules endothéliales. Le recrutement

de l'endogline dans le complexe formé avec ALK1 et son ligand, mène à la favorisation de cette voie et par ce qui a été expliqué ci-dessus à l'inhibition indirect de la voie ALK5 (Lebrin et al. 2004; Pardali et al. 2010).

Le TGF- β n'est pas le seul ligand de cette famille à avoir un impact sur la formation des vaisseaux sanguins. De nombreux membres de la sous-famille des BMPs sont également connus pour participer à la régulation de l'angiogenèse. C'est d'ailleurs dans les années 2010 que le ligand nous intéressant le plus dans le cadre de ce manuscrit, le BMP9, a été découvert comme un ligand d'ALK1 et dès lors comme régulateur de l'angiogenèse (David et al. 2007; David et al. 2008).

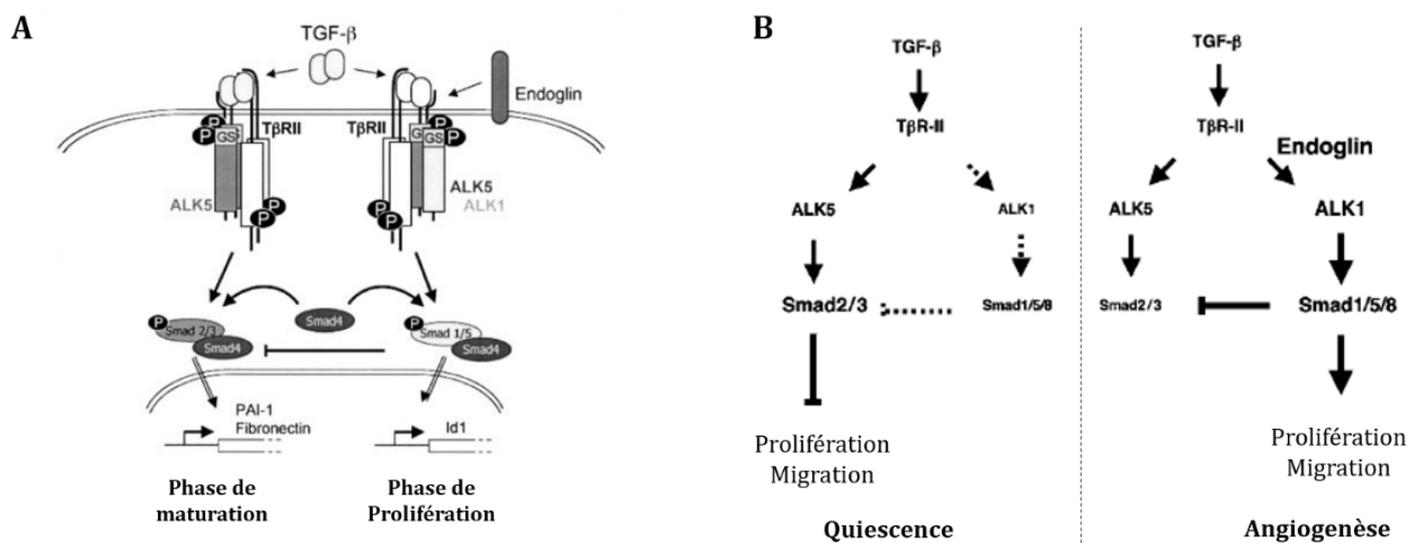


Figure 9: Modèle schématique via lequel le TGF- β régule la phase de maturation et d'activation de l'angiogenèse. (A) TGF- β se fixe d'abord sur le T β RII et active le recrutement d'ALK5 et d'ALK1. L'endogline est nécessaire pour permettre l'activation de la voie impliquant ALK1. L'activation de ces deux voies engendre la phosphorylation des Smad2/3 d'une part et des Smad1/5/8 d'autre part. Ces activations conduisent à des réponses physiologiques opposées. Les Smad1/5/8 sont capables de directement réprimer la voie ALK5. (B) Récapitulatif simplifié de la régulation des deux voies. La voie dans laquelle ALK1 est activé permet l'activation de la prolifération et de la migration des cellules endothéliales. L'endogline est fortement exprimée lors de l'angiogenèse et favorise la prolifération et la migration des cellules endothéliales. De plus, de manière indirecte, il réprime la voie impliquant ALK5. En l'absence de ce corécepteur, la voie TGF- β /ALK5 est prédominante conduisant à l'établissement de la quiescence des CE. Figure adaptée de Lebrin et al. 2004 et Bertolino et al. 2005.

2.3 La sous-famille des BMPs

Les *Bone Morphogenic Proteins* (BMPs) ont premièrement été découvertes sur base de leur capacité à réguler la formation des os et du cartilage. Comme mentionné ci-dessus, ce groupe de protéines constitue une sous-famille de la superfamille du TGF- β . Cette sous-famille est constituée d'environ 20 ligands pouvant être divisés en plusieurs sous-groupes en fonction de la similarité de leur séquence : le sous-groupe BMP2/BMP4, le sous-groupe

BMP5-8, le sous-groupe BMP9/10 et le sous-groupe BMP3/11-16. Les membres de cette famille ont une multitude de rôles différents au travers de l'ensemble du corps humain et sont d'une importance capitale lors du développement embryonnaire. Cette famille est également connue pour son importance dans le développement vasculaire. Parmi les différents membres, BMP2, BMP4, BMP6 et BMP7 sont connus pour leurs fonctions dans la biologie vasculaire. De plus, ces dernières années, il a été mis en évidence que BMP9 et BMP10 possèdent également un rôle indéniable dans la physiologie des cellules endothéliales. Comme vous pourrez le lire dans la partie concernant l'angiogenèse, la formation de vaisseaux sanguins est un procédé extrêmement contrôlé faisant intervenir de nombreux facteurs et voies de signalisation parmi lesquels la famille des BMPs participe au maintien de l'homéostasie vasculaire. En effet, un dérèglement dans la signalisation de cette famille est à l'origine de nombreuses maladies vasculaires dont les deux plus connues sont la télangiectasie hémorragique héréditaire et l'hypertension artérielle pulmonaire (Dyer et al. 2014; García de Vinuesa et al. 2016; Goumans et al. 2017).

2.3.1 La signalisation des BMPs dans les cellules endothéliales

Les BMPs, faisant partie de la superfamille du TGF- β , signalent, comme expliqué précédemment, par l'intermédiaire de récepteurs de type I, de type II, des R-SMADs et du Co-SMADs. Cependant, la plupart des BMPs ne sont capables que d'activer les SMAD1/5/8. Il existe toutefois une exception avec BMP9 qui a la capacité, uniquement dans les cellules endothéliales pulmonaires, d'activer SMAD2 (Upton et al. 2009). Il est bien sûr évident que tous les BMPs ne présentent pas la même spécificité pour tous les récepteurs (**Table III**). En effet, le sous-groupe comprenant BMP2 et 4 lie préférentiellement les récepteurs ALK3 et ALK6, BMPRII et ActRIIA/B alors que le sous-groupe constitué de BMP6 et 7 présente aussi une affinité pour ALK2 et ActRIIA. Enfin, BMP9 et BMP10 possèdent une affinité exceptionnelle en termes de spécificité de liaison pour ALK1 et sont capables de se fixer à BMPRII et ActRIIA/B.

De plus, la liaison d'un BMP à son/ses récepteur(s) peut être modulée par la présence de co-récepteurs qui ont déjà été mentionnés dans la partie précédente : le betaglycan et l'endogline. Ces deux récepteurs de type III jouent un rôle dans le processus de vascularisation. Parmi ces corécepteurs, le betaglycan augmente la liaison des BMP2, 4 et 7 pour leurs récepteurs ALK3 et 6. Ces 3 ligands sont connus pour leurs importances dans le développement vasculaire (Kirkbride et al. 2008). L'endogline, quant à elle, possède un rôle moins bien défini, permettant d'augmenter ou de réprimer la signalisation par

différents mécanismes dépendants de la concentration en récepteurs et ligands présents (**Figure 10**). Néanmoins, il est admis que ce récepteur est impliqué dans la régulation de la voie du BMP9 et d'ALK1 (Blanco et al. 2005; ten Dijke et al. 2008).

Les ligands et récepteurs des BMP (*Bone Morphogenetic Protein*)

BMP	Récepteurs type II	Récepteur type I	R-Smad	Corécepteur
BMP-2 BMP-4	BMPRII ACTRIIA/B	ALK-3 ALK-6 ALK-3 ALK-6	Smad1/5/8 Smad1/5/8	Bétaglycan
BMP-6 BMP-7	BMPRII ACTRIIA/B	ALK-3 ALK-6 ALK-2 ALK-3 ALK-6	Smad1/5/8 Smad1/5/8	Bétaglycan
BMP-9 BMP-10	BMPRII ACTRIIA/B	ALK-1 ALK-2 ALK-1 ALK-3	Smad1/5/8 Smad-2 Smad1/5/8	Endogline

Table III : Les BMPs se lient à un hétérotétramère de récepteurs de type I et II menant une phosphorylation de leur domaine carboxy-terminal et à l'activation des Smads régulateurs (R-Smads). La translocation dans le noyau conduit à la régulation de l'expression génique. Malgré une certaine redondance, les ligands ont une préférence quant aux complexes de récepteurs auxquels ils se fixent. La présence d'un corécepteur, ou récepteur de type III, module la liaison des ligands et leurs réponses cellulaires. Figure adaptée de Goumans et al. 2017.

2.3.2 Le sous-groupe des BMP9/10 et leur importance dans la physiologie des cellules endothéliales

Les sources principales de BMP9 et BMP10 sont respectivement le foie et le cœur (Bidart et al. 2012). Des études *in vivo* ont permis de mettre en évidence que l'expression de BMP10 précède celle de BMP9 mais qu'ils sont tous deux présents dans la circulation à des concentrations variant entre 0,5 et 15 ng/ml. Cependant, l'utilisation d'anticorps bloquant l'activité de BMP9 chez les souris a permis de démontrer que BMP9 est la forme biologiquement active dans la circulation des individus adultes (Ricard et al. 2012). L'étude, par délétions génétiques, de différents acteurs de ce sous-groupe a mis en évidence son rôle essentiel dans le développement vasculaire et l'homéostasie des vaisseaux. Les connaissances actuelles à propos de ce sous-groupe suggèrent que ces deux protéines constituent les BMPs les plus importants dans la régulation de la biologie vasculaire. Ceci est également supporté par le fait que BMP9 et BMP10 se lient avec une affinité élevée à ALK1 et à l'endogline, deux récepteurs fortement exprimés à la surface des cellules endothéliales et des cellules murales (Chen et al. 2013; García de Vinuesa et al. 2016; Goumans et al. 2017).

La signalisation de ce sous-groupe passe par l'interaction du BMP9/10 avec son récepteur de haute affinité, ALK1. Ces deux ligands présentent des particularités. En effet, en présence d'un récepteur de type II, BMP9 est également capable de se lier à ALK2 et BMP10 à ALK3 (David et al. 2007; Scharpfenecker et al. 2007). Même si ces deux ligands présentent de nombreuses similitudes et sont souvent considérés comme des facteurs interchangeables durant le développement embryonnaire, il existe des différences d'affinité entre les deux ligands pour les récepteurs de type II. En effet, BMP9 possède une affinité plus importante pour ActRIIB et se fixe de manière plus faible aux deux autres alors que BMP10 ne présente pas une préférence aussi marquée (Townson et al. 2012; Chen et al. 2013). Une autre particularité de ces deux BMPs est qu'ils sont capables de se lier directement à leur récepteur de type III (endoglin) ce qui n'est pas le cas des autres ligands de cette sous-famille. Le modèle actuel explique que l'endoglin et ALK1, présents à la surface des cellules endothéliales en quantité importante, agissent de concert pour lier BMP9. Cette liaison engendre une modification de conformation permettant de former un pont entre le récepteur de type I et celui de type II et engendrant une activation rapide de la voie de signalisation (Castonguay et al. 2011; Goumans et al. 2017). Une fois les récepteurs activés, les acteurs intracellulaires entrent en jeu. La voie canoniquement activée par le BMP9 est celle des SMAD1/5/8 qui s'associent alors avec SMAD4 pour aller moduler l'expression de nombreux gènes (**Figure 10**). De telle manière, il augmente l'expression d'ID1, d'ID2, d'endogline, d'ALK1, de BMPRII, de SMAD6 et 7 et réduit la synthèse de l'APLN (Apelin) (David et al. 2007; Upton et al. 2009; Poirier et al. 2012; Dyer et al. 2014). Le BMP9 est également capable d'activer l'expression de facteurs de transcription (HEY1, HEY2, HES1), du ligand JAG1 appartenant à la famille Notch mais aussi du FGFR1 et 2, d'EphrinB2 et du VEGFR1 (Larrivée et al. 2012; Ricard et al. 2012; Kim et al. 2012). Ceci supporte la capacité de cette voie à établir des croisements avec d'autres familles et voies de signalisation impliquées dans l'angiogenèse. Enfin, un autre gène dont l'expression est également augmentée par le BMP9 est celui codant pour la protéine BMPER. Cette protéine régule négativement l'activité de nombreux BMPs en se fixant à eux et en rompant la formation du complexe entre le ligand et son récepteur. Parmi ses cibles, on retrouve BMP4 et BMP9. BMPER possédant une plus grande affinité pour ce dernier (Yao et al. 2013). Ce mécanisme permet la mise en place d'une boucle d'auto-régulation afin d'empêcher un excès de signalisation (García de Vinuesa et al. 2016). Il existe également d'autres processus de régulation négative de la voie des BMPs et par conséquent, de celle du BMP9. Il s'agit des SMADs inhibiteurs 6 et 7. Dans le cas de la

sous-famille des BMPs, ils fonctionnent de la même façon qu'expliqué précédemment dans le cadre du TGF- β . Cependant, SMAD6 cible plus spécifiquement la signalisation des BMPs ; SMAD7 inhibant à la fois la voie du TGF- β et des BMPs (Goumans et al. 2017). Un autre partenaire peut également jouer un rôle dans la régulation des BMPs et, par conséquent, de BMP9. En effet, suite à un stimulus (réaction à une blessure, certaines conditions pathologiques) l'endogline peut être clivée de la surface de la cellule par des métallo-protéases de la matrice relargant une forme soluble de cette protéine. Celle-ci sert alors de piège pour fixer les BMPs avec qui elle présente une affinité, les empêchant d'être disponibles pour se fixer à leurs récepteurs membranaires. Ce mécanisme permet notamment d'affiner le remodelage vasculaire (Hawinkels et al. 2010; Gallardo-Vara et al. 2016).

L'ensemble de ces régulations fait intervenir la voie canonique activée par les BMPs. Toutefois, la liaison d'un ligand de cette famille à ses récepteurs engendre aussi l'activation de voies de signalisation indépendantes des SMADs mais tout aussi importantes pour l'établissement du système vasculaire. Parmi ces voies alternatives, on distingue celle des MAPKs (*Mitogen-activated Protein Kinases*) avec p38, Erk et JNK, celle de PI3K (phosphatidylinositol-3-kinase)-Akt et celle des GTPases Rho-like (Zhang 2016). Il a notamment été montré récemment, dans une étude concernant l'implication de la voie BMP9/ALK1/BMPRII dans l'hypertension pulmonaire artérielle, qu'un prétraitement au BMP9 est capable d'inhiber l'activation JNK par le TNF- α (Long et al. 2015). D'autres groupes ont également observé la phosphorylation de p38 suite à un traitement au BMP9 (Alsina-Sanchís et al. 2018). Ces voies de signalisation parallèles sont désormais de plus en plus étudiées et pourraient rapidement constituer un critère important dans la compréhension des maladies découlant de la famille des BMPs.

Bien que les données *in vivo* obtenues ces dernières années montrent clairement un rôle essentiel de BMP9 dans la modulation vasculaire, les mécanismes cellulaires sous-jacents ne sont pas encore complètement compris. Certaines études ont observé un effet pro-angiogène du BMP9 sur les cellules endothéliales alors que d'autres ont observé l'effet inverse. Il est dès lors encore assez difficile de définir le rôle précis de ce facteur dans la physiologie des cellules endothéliales. Ceci pourrait s'expliquer par les différents types cellulaires utilisés dans les différentes études ainsi que par un effet du BMP9 dépendant fortement du contexte, des doses et des modèles utilisés (Scharpfenecker et al. 2007; David et al. 2009; Park et al. 2012; Kim et al. 2012; Nolan-Stevaux et al. 2012; Alsina-Sanchís et al. 2018).

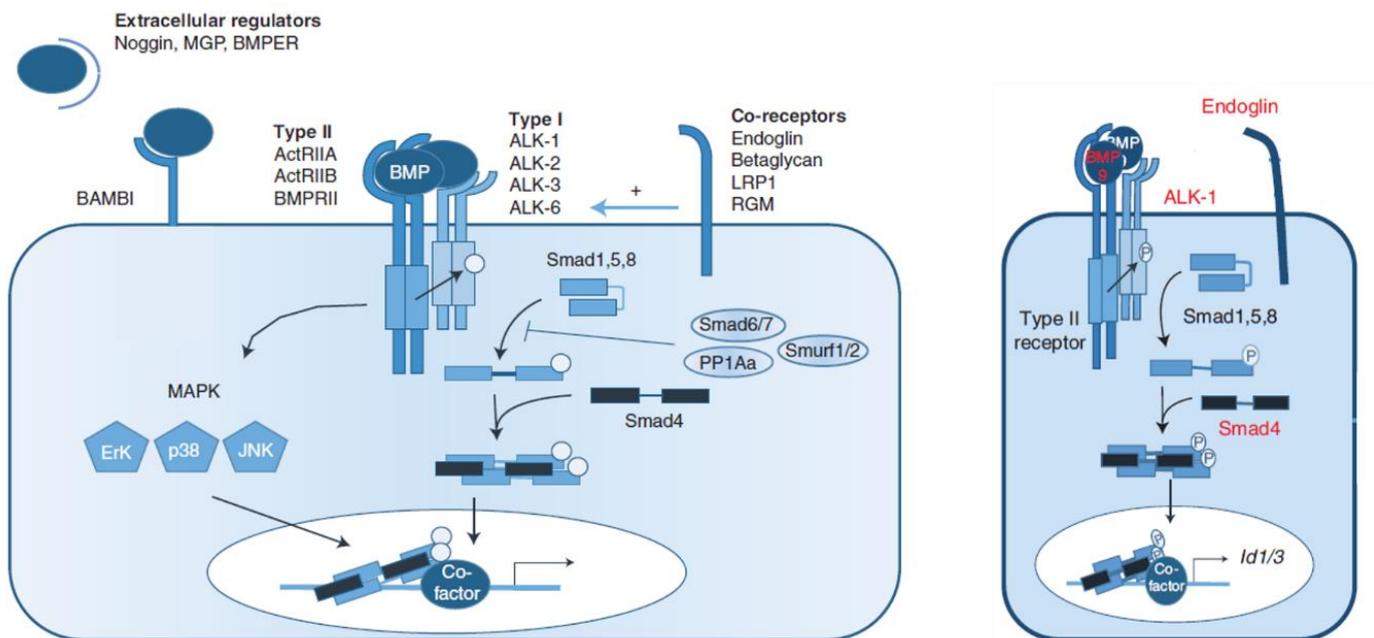


Figure 10 : Représentation schématique de la signalisation des BMPs. Comme pour les autres membres de la superfamille, les BMPs signalent par l'intermédiaire de récepteurs de type II et de type I. La liaison du ligand stimule l'activation des R-Smads et leur entrée, en compagnie de Smad4, dans le noyau afin de réguler la transcription de gènes cibles. Cette voie est la voie canonique des BMPs. Cependant, les récepteurs activés peuvent également induire la phosphorylation et l'activation d'autres voies indépendantes des Smads comme celle des MAPKs. La présence de corécepteurs permet de renforcer la signalisation des ligands. Afin d'éviter une prolongation du signal et une suractivation de la voie, des mécanismes de terminaison du signal sont mis en place (Smad6/7, phosphatase, E3 ubiquitine ligases). Enfin, des protéines membranaires (BMPER, Noggin, BAMBI,...) sont également présentes pour piéger les ligands et les rendre indisponibles à leurs récepteurs permettant une modulation du signal. Figure adaptée de Goumans et al. 2017.

III. L'angiogenèse

3.1 Généralités

Chez les animaux primitifs, tels que la mouche *Drosophila melanogaster* ou le vers *Caenorhabditis elegans*, l'oxygène est capable de diffuser au travers de tout l'organisme. Cette diffusion n'est plus possible pour les espèces de plus grandes tailles comme les mammifères. L'évolution de ces animaux s'est manifestée par l'apparition d'un réseau de vaisseaux permettant de transporter les gaz et molécules indispensables au développement et à la vie. Ce système est appelé le réseau vasculaire. Chez les mammifères, lors du développement embryonnaire c'est le système cardiovasculaire, composé du cœur, du sang et des vaisseaux sanguins, qui est le premier à se former. Dès lors, il permet au sang d'acheminer l'oxygène et les nutriments aux organes distants et contribue au bon développement de l'embryon. De plus, ce système permet d'évacuer les déchets métaboliques produits par les cellules (Carmeliet 2000; Chung & Ferrara 2011).

3.2 Initiation du réseau vasculaire

Durant l'embryogenèse, un premier réseau vasculaire, dit primitif, se développe au cours de la vasculogenèse. Lors de ce processus, des cellules souches mésodermiques, les angioblastes (précurseurs indifférenciés des cellules endothéliales) commencent à migrer, à proliférer et à se différencier en cellules endothéliales. Elles s'agrègent les unes avec les autres permettant la formation de tubes qui donneront le premier réseau vasculaire de l'organisme. Suite à cette première étape, les vaisseaux sanguins subissent un remodelage profond résultant en la complexification du réseau primitif. Ce processus est appelé l'angiogenèse. Dans un premier temps, l'angiogenèse était uniquement considérée comme un mécanisme où de nouveaux vaisseaux sanguins se forment à partir de ceux préexistants. Cependant, à l'heure actuelle, ce processus est plus largement considéré comme celui par lequel un plexus vasculaire s'étend et se modifie pour donner naissance à un réseau très organisé avec une hiérarchie typique où les gros vaisseaux se ramifient progressivement en plus petit vaisseaux. Enfin, ces nouveaux vaisseaux nécessitent d'être stabilisés et maturés. Ceci se déroule par le recrutement de péricytes et de vSMC (*vascular Smooth Muscle Cell*) (**Figure 11**). Après la naissance, l'angiogenèse contribue toujours à la croissance des organes. Néanmoins, à l'âge adulte, ce processus est quiescent mais est réactivé lors du cycle ovarien, dans le placenta pendant la grossesse et lors de la cicatrisation (Carmeliet 2000; Chung & Ferrara 2011). De plus, il arrive que cette réactivation ponctuelle se fasse

de manière anormale, menant à diverses pathologies telles que les maladies inflammatoires, les rétinopathies et les plus connues, les cancers.

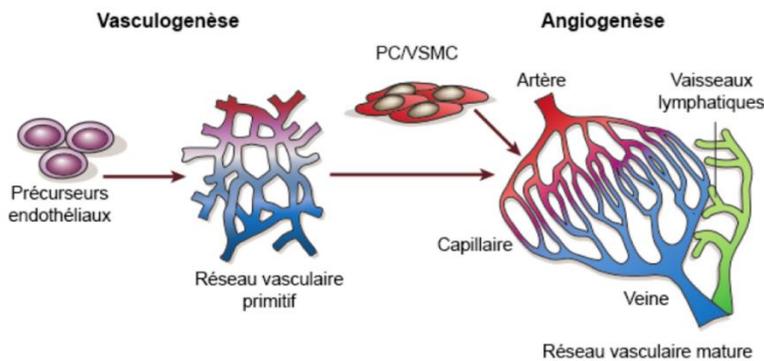


Figure 11 : Développement du système vasculaire. Lors de la vasculogénèse, les progéniteurs endothéliaux donnent naissance à un réseau vasculaire primitif fait d'artères et de veines. Durant l'angiogenèse qui suit ce premier processus, le réseau s'étend, les cellules murales (péricytes (PC) et vSMC) viennent couvrir et stabiliser les vaisseaux nouvellement formés. Tout ceci permettant la mise en place d'un réseau mature extrêmement bien organisé. Parallèlement le réseau lymphatique se met en place par différenciation des veines. Adapté de Carmeliet 2005.

3.3 Le mécanisme et les différentes étapes de l'angiogenèse

L'angiogenèse peut se dérouler suivant 3 mécanismes différents. Premièrement, la formation des nouveaux vaisseaux peut se dérouler par bourgeonnement (aussi connu sous « sprouting »). Les cellules endothéliales prolifèrent et migrent suite à la détection de facteurs de croissance angiogènes tels que le VEGF ou le bFGF (*basic Fibroblast Growth Factor*). Deuxièmement, le mécanisme d'intussusception conduit à l'élargissement et à la séparation d'un vaisseau déjà formé afin d'en créer de nouveaux. Enfin, troisièmement le bridging est caractérisé par une croissance des cellules endothéliales à l'intérieur du vaisseau conduisant à la sceptation de ce dernier (Carmeliet 2000; Carmeliet & Jain 2011).

Lors de la croissance de l'organisme, la quantité de vaisseaux sanguins existants devient rapidement insuffisante pour permettre l'apport de l'oxygène et des nutriments adéquats à la survie des cellules. Cet état de transition provoque un manque d'oxygène dans les tissus en croissance et par conséquent des zones en hypoxie. Les cellules présentes dans cette zone expriment alors un facteur en réponse à cette hypoxie, HIF-1 α (*Hypoxia Inducible Factor*). En concert avec son homologue HIF-1 β , le dimère se fixe sur les éléments de réponses à l'hypoxie (HRE) présents au niveau du promoteur de divers gènes. HIF-1 α /HIF-1 β induit ainsi leur transcription. Parmi les gènes ciblés par ce facteur, on retrouve celui du VEGF et ceux de ses récepteurs. Malgré le nombre très élevé de facteurs impliqués dans la régulation de l'angiogenèse (VEGF, bFGF, PDGF-BB, TGF- β , Aniopeïétine,...), le VEGF est la molécule clé régulant la plupart des événements morphogénétiques de l'angiogenèse et contrôle à la fois la perméabilité, la prolifération, la

migration ou encore la survie des cellules endothéliales (Milkiewicz et al. 2006; Carmeliet & Jain 2011).

Comme il a été discuté précédemment, l'angiogenèse peut se produire par trois mécanismes différents (sprouting, bridging et intussusception) (Korpisalo & Yla-Herttuala 2010) (**Figure 12**). L'angiogenèse par bourgeonnement est de loin la plus étudiée à l'heure actuelle. Elle est caractérisée par plusieurs étapes (**Figure 13**).

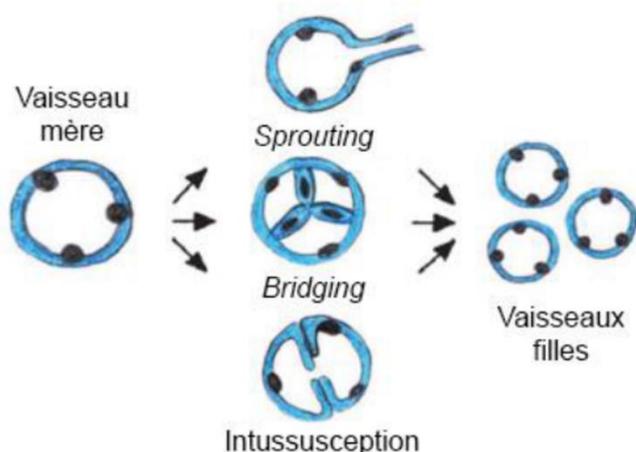


Figure 12 : Les trois mécanismes de l'angiogenèse. La formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de préexistants peut se dérouler suivant trois mécanismes. (1) Le *sprouting*. (2) Intussusception (élargissement des vaisseaux sanguins). (3) La sception ou *bridging*. Adapté de Korpisalo & Yla-Herttuala 2010 et de Carmeliet 2000.

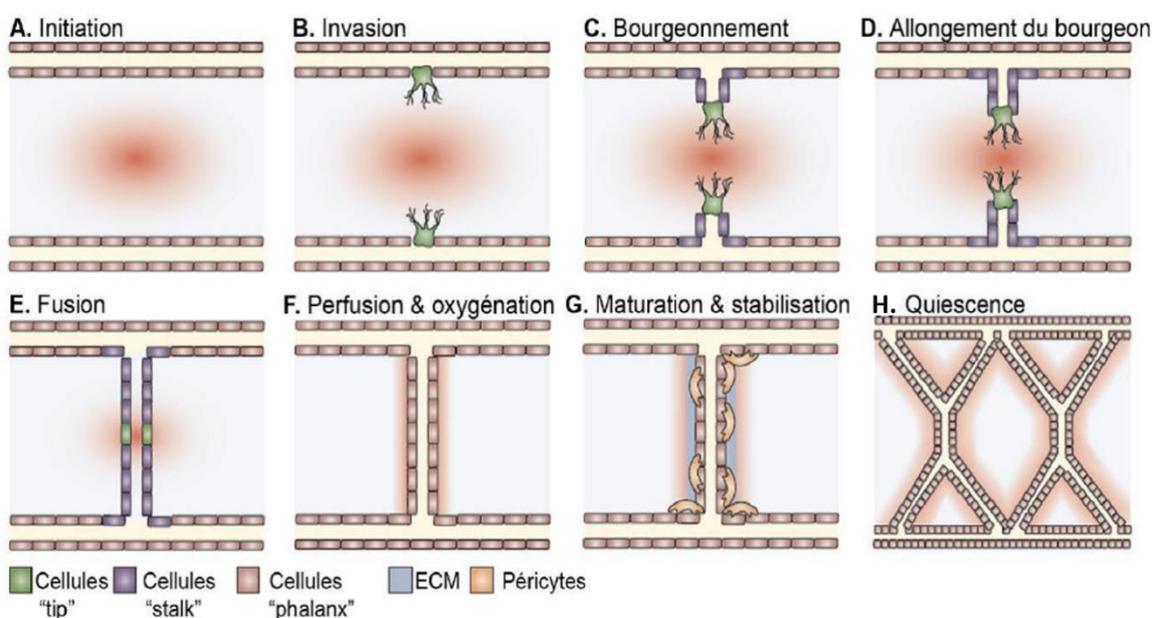


Figure 13 : La formation de nouveaux vaisseaux. (A) Réponse à l'hypoxie; les cellules environnantes produisent et déposent des facteurs pro-angiogènes en gradient. (B) La cellule endothéliale exposée à la plus haute concentration en VEGF est sélectionnée pour devenir une cellule « tip ». (C) La cellule « tip » acquiert une capacité migratoire importante lui permettant d'envahir le tissu environnant et de guider le bourgeonnement grâce à ses nombreux filopodes. (D) Le bourgeon s'allonge grâce à la prolifération des cellules dites « stalk ». (E) Le nouveau vaisseau se connecte avec les autres par fusion des cellules « tip ». (F) La lumière des nouveaux vaisseaux est initiée et permet le rétablissement du flux sanguin, entraînant alors l'oxygénation du tissu. Il s'ensuit une diminution du niveau de VEGF. (G) La sécrétion d'autres facteurs permet le recrutement des cellules murales et le rétablissement de la matrice extracellulaire. (H) Les cellules endothéliales adoptent un phénotype quiescent et le réseau est ainsi établi. Figure adapté de Carmeliet al. 2009.

3.3.1 La vasodilatation et la perméabilité vasculaire

Le processus d'angiogenèse s'initie avec la vasodilatation des vaisseaux qui dépend fortement de la production d'oxyde nitrique (NO). Il a par ailleurs été montré que le VEGF induit l'expression de l'oxyde nitrique synthase (NOS) générant la production de NO et la vasodilatation des vaisseaux (Shen et al. 1999; Hood et al. 2018). Cette dernière engendre une augmentation de la perméabilité vasculaire en réponse au VEGF par la formation de fenestrations, d'organelles vésiculo-vacuolaires et par la redistribution des molécules d'adhésions intercellulaires telles que PECAM-1 (*Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule*) et VE (*Vascular Endothelial*)-cadhérine. Lorsque les cellules endothéliales sont en état de quiescence, l'angiopoïétine 1, par l'intermédiaire de récepteur Tie2, joue le rôle d'inhibiteur de la perméabilité vasculaire et maintient la cohésion des vaisseaux sanguins. Lors de la phase d'angiogenèse, les cellules endothéliales doivent pouvoir migrer ce qui nécessite une perte des contacts intercellulaires. ANG2, l'inhibiteur de la voie ANG1/TIE2, est capable d'augmenter à la fois la perméabilité cellulaire mais également d'initier le détachement des cellules murales et la dégradation de la matrice extracellulaire. Ce facteur est donc essentiel pour initier la migration des cellules endothéliales (Maisonpierre et al. 1997; Carmeliet 2000; Milkiewicz et al. 2006).

3.3.2 La dégradation de la matrice extracellulaire

Les cellules endothéliales et murales partagent une membrane basale comprenant des protéines de la matrice extracellulaire. Cet environnement forme un manchon autour des vaisseaux permettant de les stabiliser en empêchant les cellules endothéliales de quitter leur position. Afin de pouvoir poursuivre le sprouting, cette membrane doit être dégradée pour permettre aux cellules endothéliales de migrer. La rupture protéolytique de la membrane basale est régulée par l'activité de métallo-protéases de matrice (MMP) telle que la MT1-MMP qui est particulièrement exprimée par les cellules « tip ». Cette étape est très importante mais doit également être finement contrôlée afin d'empêcher une dégradation trop importante qui ne laisserait pas suffisamment de matrice pour l'accrochage du vaisseau naissant (Blasi & Carmeliet 2002; Eble & Niland 2009). En plus de permettre la libération des CEs, cette activité protéolytique permet également la libération de facteurs de croissance qui étaient jusque-là piégés dans la matrice extracellulaire (Carmeliet 2000; Potente et al. 2011).

Un autre acteur impliqué dans cette étape est le système plasminogène/plasmine. La plasmine est une protéase issue du clivage du plasminogène par l'uPA (*urokinase Plasminogen Activator*). De surcroît, le groupe de Prager a montré que le VEGF induit une activation rapide de l'uPA (à la surface des cellules endothéliales). La plasmine, une fois produite, permet la dégradation de la matrice extracellulaire, soit directement, soit par l'intermédiaire de l'activation de MMPs (Tkachuk et al. 2009; Herkenne et al. 2015).

3.3.3 L'élongation des vaisseaux

La barrière physique étant désormais éliminée, les cellules peuvent proliférer et migrer vers des sites plus éloignés nécessitant le développement de nouveaux vaisseaux sanguins. Les fonctions prolifératives et migratoires de cellules endothéliales permettront, ensemble, l'élongation de bourgeon vasculaire.

Dans un premier temps, une sous-population de cellules endothéliales acquiert une capacité migratoire plus importante que les autres cellules. Il s'agit des cellules « tip ». Celles-ci sont présentes à l'extrémité du vaisseau. Ce sous-type cellulaire est fortement sensible au gradient de VEGF mis en place dans la zone d'élongation. Le VEGF à haute concentration, via le VEGFR2 (*Vascular Endothelial Growth Factor 2*), stimule la différenciation en cellule « tip » et la formation de filopodes. Ce sont ces structures qui permettront de sonder l'environnement et d'être sensible au gradient de VEGF initiant ainsi la migration du bourgeon vers le gradient de facteur de croissance (Phng & Gerhardt 2009; Adams & Eichmann 2010). A la base de ces cellules, un autre sous-type cellulaire se différencie. Ce sont les cellules « stalk ». Ces dernières possèdent des caractéristiques différentes des cellules « tip ». Elles produisent peu de filopodes et ne migrent pas mais sont capables de proliférer en réponse au VEGF-A (Potente et al. 2011).

Le bourgeonnement des vaisseaux nécessite donc une coordination entre les cellules « tip », qui guident le vaisseau naissant, et les cellules « stalk », qui permettent son élongation. La spécification des cellules endothéliales en l'un ou l'autre type cellulaire est régulée par la voie Notch. Les cellules exprimant un haut niveau de VEGFR2, activé par le VEGF, entrent en compétition pour la position « tip ». Ceci engendre l'expression d'un ligand de la voie Notch, le Dll4 (*Delta-like ligand 4*). Ainsi, les cellules « tip » expriment une grande quantité de cette protéine et de VEGFR2. Dll4, présent à la surface des cellules, permet leur communication avec les cellules adjacentes (qui deviendront les cellules « stalk ») par l'intermédiaire de son récepteur Notch1. La liaison de Dll4 à son récepteur Notch engendre son clivage et la libération de NICD (*Notch Intracellular Domain*). Ce

fragment agit comme un régulateur transcriptionnel diminuant l'expression de VEGFR2 et NRP1 alors qu'il augmente l'expression de VEGFR1 (Krueger et al. 2011). Ce dernier fixe le VEGF pour l'empêcher d'activer le VEGFR2. De telle manière, cette régulation rend la cellule « stalk » moins sensible au VEGF et par conséquent diminue sa capacité migratoire (**Figure 14**) (Potente et al. 2011; Welte et al. 2013). En plus de la régulation par les voies du VEGF et de Notch dans la spécification des cellules « tip » et « stalk », d'autres voies sont également impliquées. C'est le cas des BMPs. L'activation des récepteurs engendre la formation d'un complexe avec les SMAD1, SMAD5 et le NICD. Cette interaction favorise l'expression des gènes HES1 (*Hairy and Enhancer of Split*) et HEY1 (*Hairy/Enhancer-of-split-related with YRPW motif*). HES1 est ensuite capable de réguler négativement l'expression de Dll4. Cette régulation par l'intermédiaire des BMPs conduit à la perte du phénotype « tip » dans les cellules « stalk » (Welte et al. 2013; Beets et al. 2013; Rostama et al. 2015).

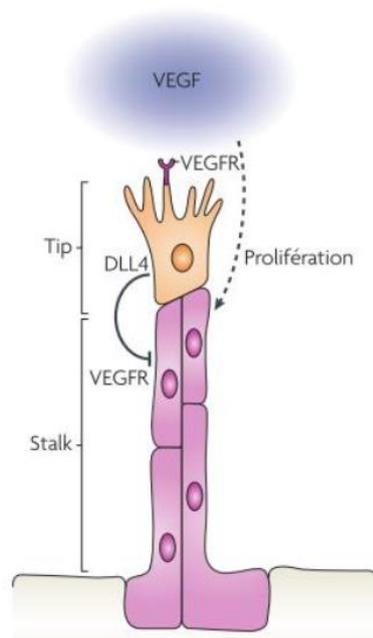


Figure 14 : Spécification cellules « tip » et cellules « stalk ». Au cours de l'angiogenèse, la voie de signalisation du VEGF coopère avec celle de Delta/Notch pour déterminer le phénotype des cellules « tip » (orange) et des cellules « stalk » (rose). Figure adaptée de Affolter 2009

3.3.4 La formation de la lumière

Afin de rétablir une circulation sanguine au sein du vaisseau en formation, les cellules endothéliales doivent former un lumen. Celui-ci peut être formé suivant deux mécanismes en parallèle de la phase d'élongation. Premièrement, il peut se former par coalescence de vacuoles intracellulaires qui s'interconnectent avec les vacuoles d'une cellule adjacente. Deuxièmement, les CEs réarrangent leur forme et leurs jonctions

intercellulaires pour ouvrir un espace entre elles. Dans le cas du deuxième modèle, les cellules définissent d'abord une polarité apico-basale qui initie l'ouverture du lumen et ensuite la stimulation par le VEGF provoque une modification de leur forme qui étend l'espace en formation (Iruela-Arispe & Davis 2009; Zeeb et al. 2010; Potente et al. 2011) (**Figure 15**).

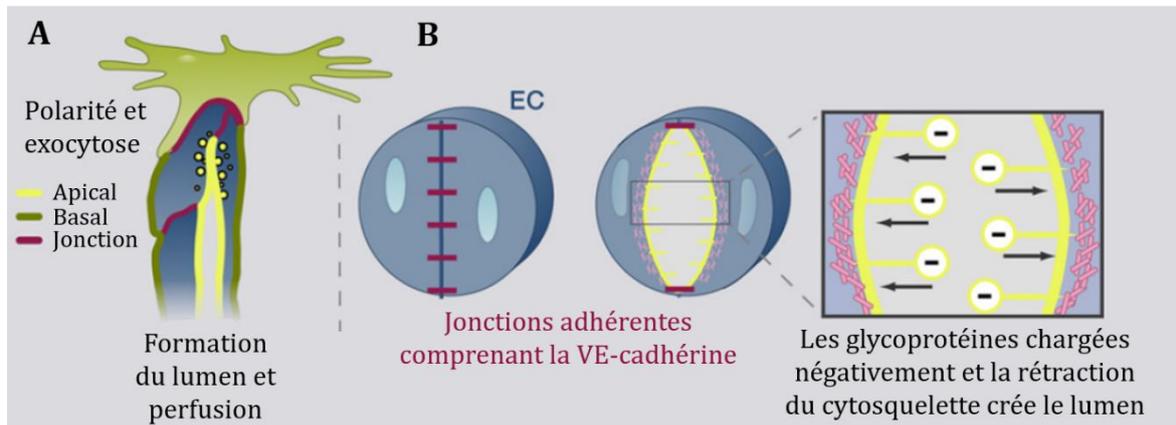


Figure 15 : Modèles de formation du lumen. (A) Coalescence de vacuoles intracellulaires (vésicules de pinocytose). (B) Les CE modifient la forme et réarrangent leurs jonctions. Contraction du cytosquelette suite à la répulsion de glycoprotéines négativement chargées à la surface du lumen. Figure adaptée de Potente et al. 2011.

3.3.5 La fusion des vaisseaux naissants et perfusion

Lors de l'angiogenèse, les cellules « tip » de plusieurs branchement peuvent entrer en contact par l'intermédiaire de leur filopodes et anastomosent. Cette étape permet de créer de nouveaux circuits à un réseau déjà existant. Au niveau de ces zones d'anastomoses, les macrophages s'accumulent et sécrètent des facteurs de croissance favorisant ce mécanisme (Potente et al. 2011).

3.3.6 La maturation des nouveaux vaisseaux

Lorsque la formation du/des vaisseaux(x) est terminée, ils doivent devenir fonctionnels. Pour ce faire une phase de maturation se met en place au niveau de l'endothélium, de la paroi des vaisseaux et du réseau vasculaire en lui-même. La maturation de ce réseau nouvellement formé nécessite le recrutement des cellules murales (péricytes et VSMC) ainsi que le dépôt de la matrice extracellulaire. Cette phase de maturation est donc une étape essentielle à l'obtention d'un réseau vasculaire fonctionnel. Une mauvaise régulation de cette dernière provoque l'apparition de nombreuses anomalies notamment avec le développement de vaisseaux tortueux et perméables.

Le recrutement des cellules murales est une étape fondamentale dans la stabilisation des vaisseaux. Les cellules endothéliales établissent un lien direct avec les péricytes alors qu'elles seront séparées des cellules musculaires lisses vasculaires par une matrice. Des études plus approfondies ont montré que les péricytes et les CEs partagent tout de même une membrane basale commune qui est interrompue à certains endroits afin d'établir un contact étroit entre les deux types cellulaires (Gaengel et al. 2009; Caporali et al. 2017). De part cette proximité, les cellules murales et endothéliales sont capables de se réguler mutuellement. Les cellules endothéliales du vaisseau en formation sécrètent du PDGF-BB (*Platelet-Derived Growth Factor-BB*). Ce facteur interagit avec son récepteur PDGFR- β (*Platelet-Derived Growth Factor Receptor- β*) présent à la surface des péricytes permettant l'augmentation de leur prolifération, de leur migration et par conséquent leur recrutement au niveau des EC. Malgré le fait que cette voie soit privilégiée dans le recrutement des cellules murales, d'autres intervenants coopèrent au bon déroulement de cette étape. La sphingosine-1-phosphate est une molécule sécrétée par les péricytes capable de se fixer sur un récepteur de type protéine G, le S1P1-5, présent sur la surface des cellules endothéliales. La signalisation de cette voie facilite les changements d'adhésion, de jonction et du cytosquelette et module la prolifération, la survie et la migration permettant aux cellules murales et aux EC de se stabiliser (Allende & Proia 2002).

La stabilisation des vaisseaux est également dépendante de la balance entre ANG1 et ANG2. Comme il a été mentionné précédemment, l'interaction d'ANG2 à son récepteur TIE2 engendre l'initiation de la dégradation de la matrice extracellulaire. Cette protéine est l'antagoniste d'ANG1. Les cellules murales ont la capacité de sécréter ANG1. Celle-ci agit alors de manière paracrine sur les cellules endothéliales contribuant au recrutement des péricytes par sécrétion de PDGF-BB (Ribatti et al. 2011; Caporali et al. 2017). Enfin, une autre famille de protéines régule en partie cette phase de maturation. Il s'agit de la superfamille du TGF- β . Ses membres stimulent la différenciation, la prolifération mais aussi la migration des cellules murales. De plus ils jouent un rôle très important dans le dépôt de la nouvelle matrice extracellulaire (Potente et al. 2011). Cette famille, par l'intermédiaire du TGF- β 1, agit également directement sur les cellules endothéliales. En effet, à forte concentration, il diminue à la fois l'expression du VEGFR2 et de Notch1. De telle manière il supprime les phénotypes « tip » et « stalk » et contribue au retour de la quiescence vasculaire (Jarad et al. 2017). L'ensemble de ces voies permet donc le recrutement des péricytes, la production de la nouvelle matrice extracellulaire et donc la stabilisation du nouveau réseau vasculaire.

3.4 La régulation de l'angiogenèse

L'angiogenèse est un processus très actif durant l'embryogenèse mais devenant quiescent lorsque l'âge adulte est atteint. Toutefois, les cellules endothéliales, dont la survie est maintenue par les facteurs de croissance comme le VEGF, restent capables de répondre aux différents stimuli qui permettront leur réactivation. Bien que l'angiogenèse soit un mécanisme peu actif chez l'adulte, elle peut être de nouveau stimulée dans certaines conditions comme lors de la réparation tissulaire, du cycle menstruel ou encore de l'inflammation. Un dérèglement dans sa régulation caractérise de nombreuses maladies telles que les maladies rhumatoïdes et ophtalmiques, le psoriasis ou encore le développement tumoral (Carmeliet 2005; Rohlenova et al. 2017). Ainsi, afin de s'assurer que l'angiogenèse ne sera que ponctuellement activée, une balance entre facteurs pro- et anti-angiogènes est finement régulée. Un excès d'anti-angiogènes conduit au maintien de la quiescence vasculaire alors qu'un niveau élevé provoque une activation du processus. Le switch angiogène est le terme utilisé pour caractériser ce passage d'une angiogenèse quiescente à une angiogenèse active (Hanahan & Folkman 1996; Bergers & Benjamin 2003) (**Figure 16**).

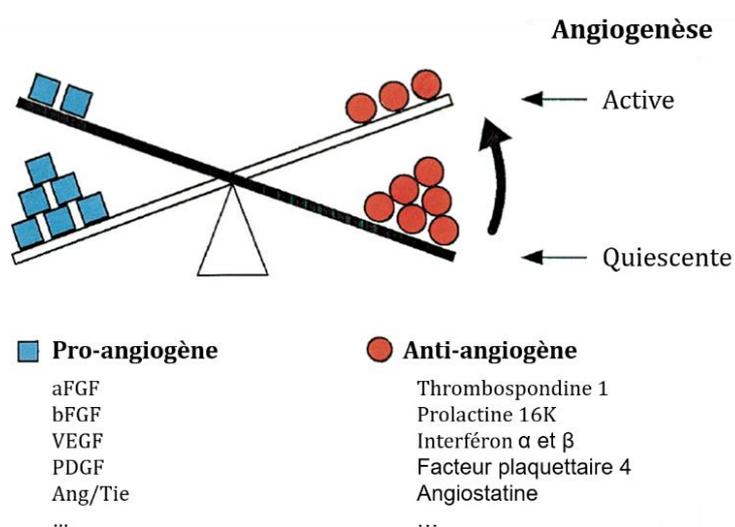


Figure 16 : Le switch angiogène. L'angiogenèse quiescente à l'âge adulte peut être stimulée suite à un déséquilibre dans la balance entre les facteurs pro- et anti-angiogènes. Figure adaptée de Hanahan 1996

Parmi les facteurs pro-angiogènes, l'on retrouve la famille du VEGF (qui sera détaillé dans chapitre IV de cette thèse), le bFGF, le PDGF, le système angiopoïétine/Tie-2 mais également la superfamille du TGF-, HIF-1, les MMP,... (Carmeliet & Jain 2011).

Une grande partie des facteurs inhibant l'angiogenèse sont des fragments de protéines piégées dans la matrice extracellulaire. L'action protéolytique d'enzymes comme les MMP, les cathepsines ou les élastases permet leur libération de la matrice extracellulaire. La thrombospondine-1 (TSP-1) est le premier facteur à avoir été découvert.

Cette protéine est capable d'inhiber la prolifération des cellules endothéliales et de fragiliser les contacts entre les cellules. La trombospondine-2 quant à elle inhibe la migration et la tubulogénèse des EC et favorise leur apoptose (Noh et al. 2003; Ribatti 2009). L'endostatine est également un fragment protéique (collagène de type 18) issu de la dégradation de la matrice extracellulaire. Elle inhibe directement l'angiogénèse en interférant avec les voies de signalisation du VEGF et du bFGF. Elle exerce aussi une action moins directe sur l'angiogénèse en inhibant l'activité de deux métalloprotéases, la MMP2 et 9 (O'Reilly et al. 1997; Ribatti 2009). Il existe beaucoup d'autres inhibiteurs issus de la matrice extracellulaire comme la fibulline, la tumstatine ou encore un fragment issu de la fibronectine.

En parallèle de ces inhibiteurs provenant de la dégradation des protéines de la matrice extracellulaire, il existe des cytokines et des facteurs de croissance capables également de jouer un rôle inhibiteur dans l'angiogénèse. Ainsi, les interférons (IFN) et les interleukines (IL) font partie de cette classe d'inhibiteurs. IFN- α inhibe la prolifération et la migration des cellules endothéliales de capillaires et empêche la surproduction de FGF-2 par les cellules tumorales (Slaton et al. 1999). Les interleukines quant à elle sont produites par les leucocytes. IL-1 β et IL-4 inhibent l'angiogénèse induite par le FGF alors que IL-12 et IL-18 stimulent la production d'interférons inhibiteurs de l'angiogénèse (Ribatti 2009).

De la même manière que les fragments de matrice extracellulaire, des fragments de facteurs coagulant du sang peuvent avoir un effet anti-angiogène. Parmi ceux-ci, l'angiostatine est le plus connu. Il s'agit d'un fragment provenant du plasminogène qui est capable d'inhiber la prolifération et la migration des cellules endothéliales. Un autre facteur bien connu dans l'inhibition de ce processus est le fragment N-terminal de 16 kDa de la prolactine (PRL 16 K). Ce dernier peut bloquer la prolifération mais également la migration des cellules endothéliales (Ferrara et al. 1991; Bajou et al. 2014).

Les différents exemples de régulation de l'angiogénèse présentés ci-dessus ne tirent une liste que très peu représentative du nombre de molécules capables de moduler positivement ou négativement la formation des vaisseaux sanguins. Ce processus est donc sous un étroit contrôle afin de permettre à l'organisme de pouvoir fournir tout le matériel dont il a besoin à son développement, son fonctionnement et à sa survie.

IV. La famille du VEGF

4.1 Les ligands

La famille du VEGF a été initiée par la découverte d'un facteur régulant la perméabilité vasculaire, le VPF (*vascular permeability factor*) qui sera renommé par la suite VEGF-A (Senger et al. 1983). Actuellement, chez les mammifères, cette famille est constituée de cinq facteurs structurellement reliés : VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D et le facteur de croissance placentaire (PlGF). En plus de ceux-ci, les parapoxvirus produisent une molécule similaire, le VEGF-E. De surcroît, des protéines proches du VEGF ont été découvertes dans le venin de serpent et ont dès lors été dénommées VEGF-F. Tous ces acteurs sont des polypeptides présents, *in vivo*, sous la forme d'homodimères. Ils participent à la formation, la fonction et la maintenance du système vasculaire mais possèdent également de nombreux rôles dans le développement et le fonctionnement de divers organes comme le système nerveux central, le foie, les poumons ou encore les reins. La régulation de toutes ces fonctions passe par la liaison au niveau de trois récepteurs membranaires : VEGFR1, 2 et 3 (**Figure 17**). Malgré le fait que les formes homodimériques prédominent, il a été montré que des hétérodimères peuvent se former entre VEGF-A et PlGF mais aussi entre VEGF-A et VEGF-B (Cao et al. 1996). La complexité de cette famille est encore augmentée par des phénomènes d'épissage alternatif et de processing. De telle manière, pour un même type de VEGF (A, B, C,...) il peut exister une série d'isoformes. Ces derniers se fixent sur leurs récepteurs avec des affinités parfois très différentes et par conséquent induisent des réponses biologiques divergentes. Ainsi, le VEGF-A₁₆₅ module des réponses favorisant l'angiogenèse alors que l'isoforme 121 de ce même VEGF-A semble induire une modulation anti-angiogène (Nowak et al. 2008; Tugues et al. 2011; Koch et al. 2011).

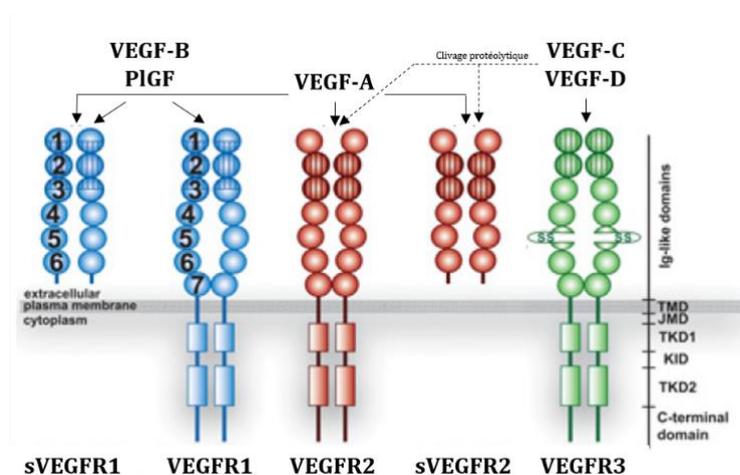


Figure 17 : Spécificité de liaison des ligands VEGF et les complexes de signalisation avec les VEGFR. Représentation schématique des 5 VEGF (-A, -B, -C, -D et PlGF) initiant l'homodimérisation des 3 récepteurs (VEGFR1, 2, 3) lors de leur interaction. Le clivage protéolytique du VEGF-C et -D permet leur interaction avec le VEGFR2. TMD, domaine transmembranaire; JMD, domaine juxtamembranaire; TKD1, domaine tyrosine kinase 1; KID, domaine insert; TKD2, domaine tyrosine kinase 2. Figure adaptée de Koch et al. 2011.

Le VEGF-A est le plus connu et des études génétiques sur souris ont démontré son rôle critique dans les fonctions des vaisseaux. En effet, la délétion d'un seul des allèles du gène conduit à la létalité embryonnaire des souris porteuses des mutations (Ferrara et al. 1996.; Carmeliet et al. 1996). Ce facteur est produit par de nombreuses cellules telles que les cellules endothéliales, les kératinocytes, les cellules musculaires lisses, les fibroblastes, les plaquettes, les neutrophiles et les macrophages (Barrientos et al. 2008). Le gène codant le VEGF-A est localisé sur le bras court du chromosome 6 et est composé de 8 exons. Il existe sous plusieurs isoformes (VEGF 121, 165, 189 et 206) (**Figure 18**). En plus de ces variantes classiques, une série d'isoformes du VEGF-A nommées VEGF-A(xxx)b sont capables de se fixer sur les récepteurs mais incapables de les activer. C'est pourquoi ils ont été décrits comme des molécules anti-angiogènes (Hua et al. 2010). C'est l'isoforme 165 qui est la forme la plus étudiée pour son activité tant au niveau physiologique que pathologique. Ce facteur joue un rôle prépondérant dans les événements précoces de l'angiogenèse et dans l'organisation du système vasculaire participant à la migration, à la prolifération, et à la perméabilité des cellules endothéliales. La plupart du temps, ce facteur agit de manière paracrine, stimulant les cellules adjacentes. Cependant, dans le cadre de la survie cellulaire, il peut agir de façon autocrine (Lee et al. 2007). L'expression du VEGF est notamment contrôlée par l'hypoxie de l'environnement cellulaire. En effet, lorsque l'oxygène vient à manquer, l'HIF est produit et celui-ci peut se fixer sur des régions du promoteur du gène du VEGF et induire une augmentation de son expression (Koch & Claesson-Welsh 2012; Simons et al. 2016).

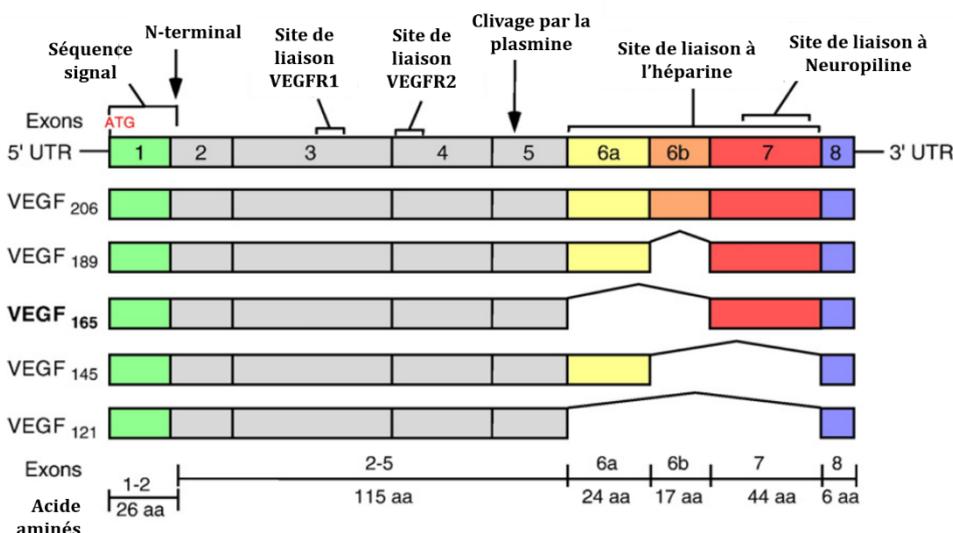


Figure 18 : Séquence en exons des différentes isoformes résultant de l'épissage alternatif du VEGF-A humain. L'ARN messager résultant de la transcription du gène du VEGF-A comprend 8 exons codant pour différents éléments structuraux. L'épissage alternatif conduit à la formation de plusieurs isoformes. Chez l'homme, le VEGF-A₁₆₅ est la forme prédominante. Figure adaptée de Holmes et al. 2007.

4.2 Les récepteurs

Le VEGF agit par l'intermédiaire de ses récepteurs VEGFR1, VEGFR2 et VEGFR3 (*Vascular Endothelial Growth Factor Receptor*) (**Figure 17**). Ils n'ont pas tous la même expression et ne sont pas impliqués dans les mêmes phénomènes. En plus de ces trois récepteurs, les VEGFs peuvent se lier avec de hautes affinités aux deux membres de la famille des neuropilines (NRP), NRP1 et 2 ainsi qu'aux protéoglycans de type héparan sulfate. Cet ensemble de protéines est considéré comme les co-récepteurs de la famille du VEGF. La structure des récepteurs est relativement similaire bien que leurs fonctions soient différentes. Ils font partie du groupe des récepteurs à tyrosine kinase. Leur domaine extracellulaire est composé de 7 boucles immunoglobuline-like (*Ig-like*). Ils possèdent un simple segment transmembranaire et un domaine intracellulaire présentant un domaine kinase, un domaine de dimérisation et un domaine de liaison à l'ATP (Shibuya 2013; Simons et al. 2016).

Le mécanisme d'activation des récepteurs et des voies de signalisation associées est sensiblement le même pour les 3 récepteurs. Le ligand vient se fixer sur le domaine extracellulaire du récepteur permettant l'homodimérisation de celui-ci. Cette dimérisation est possible grâce à la fixation du ligand sur les domaines *Ig-like* 2 et 3 alors que les dimères sont stabilisés par l'interaction des deux récepteurs via les domaines *Ig-like* 4 et 7. Suite à ces interactions, des changements de conformation au sein du domaine intracellulaire surviennent, ce qui permet d'exposer le site de liaison à l'ATP et d'engendrer différentes phosphorylations sur des résidus tyrosines (auto- et transphosphorylation). Ces sites de phosphorylation constituent alors des sites d'accrochage pour différents adaptateurs et enzymes possédant un domaine SH2 ou PTB. Ceci permet de transmettre le signal jusqu'à la régulation de gènes et la réponse physiologique (Grünewald et al. 2010; Koch & Claesson-Welsh 2012).

Ce schéma de signalisation est cependant plus complexe car des co-récepteurs, comme mentionné ci-dessus, peuvent intervenir et moduler la transduction du signal. C'est notamment le cas de NRP-1 (Neuropilin-1) qui est impliqué dans le trafficking et du protéoglycan héparan sulfate qui permet la concentration et la capture du VEGF circulant au sein de la matrice extracellulaire. Les intégrines et l'ephrinB2 jouent également un rôle prépondérant dans la transduction du signal (Grünewald et al. 2010; Simons et al. 2016). Malgré le fait que les 3 récepteurs principaux présentent une structure fortement similaire, leurs rôles et leurs localisations sont très différents.

4.2.1 Le VEGFR1

Le VEGFR1, aussi connu sous le nom de FLT-1 (*fms-like tyrosine kinase-1*) est un récepteur transmembranaire de type tyrosine kinase. VEGFR1 et 2 lient le VEGF-A mais VEGFR1 est le seul des trois récepteurs à pouvoir fixer le VEGF-B et le PlGF. Il est fortement exprimé à la surface des cellules endothéliales mais est également exprimé par d'autres types cellulaires comme les monocytes, les macrophages, les vSMC ou encore les cellules neuronales et tumorales (Selvaraj et al. 2015).

Ce récepteur existe sous deux formes. Une forme membranaire complète d'une part et d'autre part, une forme clivée donnant naissance à la forme soluble du VEGFR1 (sVEGFR1). Les deux variants fixent le VEGF-A avec une meilleure affinité que le fait le VEGFR2. Néanmoins, malgré la haute affinité de VEGFR1 pour le VEGF-A ainsi que son haut niveau d'expression par les cellules endothéliales, son activité kinase est relativement faible. Le VEGFR1 et sa forme soluble jouent donc un rôle important dans la régulation négative de la biologie du VEGFR2 en fixant les VEGF, les rendant indisponibles pour le récepteur de type 2. Ceci permet de contrôler l'activation de l'angiogenèse dans l'espace (Fong et al. 1995; Kappas et al. 2008; Simons et al. 2016).

Contrairement à la fixation du VEGF-A, celle du VEGF-B et du PlGF sont superflues dans le développement vasculaire. Cependant, le PlGF est indispensable dans l'angiogenèse associée à l'inflammation (Fischer et al. 2007). Le VEGF-B joue, quant à lui, un rôle important dans la prise des acides gras dans les cellules endothéliales particulièrement au niveau du cœur. Les animaux déficients en VEGF-B ne présentent aucun défaut vasculaire mais possèdent un cœur de taille plus petite (Aase et al. 2001; Tugues et al. 2011; Simons et al. 2016).

4.2.2 Le VEGFR3

Le VEGFR3, aussi connu sous le nom de FLT-4 (*fms-like tyrosine kinase-4*), est bien connu pour son rôle indiscutable dans la régulation de la lymphangiogenèse. Cependant il participe également au développement des vaisseaux sanguins lors de l'embryogenèse. Il est activé par le VEGF-C et le VEGF-D. De plus, ces deux ligands peuvent subir un clivage protéolytique leur permettant, en plus de se fixer sur VEGFR3, de se lier au VEGFR2. Ce récepteur est exprimé par de nombreuses cellules endothéliales (particulièrement au niveau des capillaires, des veines et de l'endothélium lymphatique), par les macrophages, les ostéoblastes et les progéniteurs neuronaux (Koch et al. 2011; Simons et al. 2016).

Lors du développement de l'embryon, le VEGFR3 est premièrement exprimé au niveau du plexus vasculaire avant d'être restreint aux cellules endothéliales veineuses et aux cellules endothéliales lymphatiques. Les souris déficientes en VEGFR3 meurent de problèmes cardiovasculaires à E10.5 avant le développement du système lymphatique. Ceci montre l'importance du VEGFR3 dans le développement vasculaire embryonnaire (Kaipainen et al. 1995; Alitalo 2011). Après la naissance, le VEGFR3 est essentiellement exprimé par les cellules endothéliales lymphatiques. Cependant, lors de la réactivation de l'angiogenèse, certaines cellules endothéliales peuvent l'exprimer transitoirement. C'est notamment le cas au niveau des vaisseaux tumoraux et des cellules « tip » (Tammela et al. 2008; Tugues et al. 2011; Koch et al. 2011).

4.2.3 Le VEGFR2

La partie qui suit développera plus en profondeur le rôle du récepteur 2 du VEGF, considéré comme le récepteur principal du VEGF dans les cellules endothéliales.

Le VEGFR2 mature est un récepteur de 200-230 kDa liant le VEGF-A, -C, -D et -E, également connu sous l'appellation FLK-1 (*Fetal Liver Kinase-1*) ou KDR (*Kinase insert Domain-containing Receptor*). Le gène codant cette protéine produit d'abord un polypeptide de 150 kDa qui est ensuite mûri par l'intermédiaire de plusieurs glycosylations permettant la production du récepteur complet à la surface des cellules. Au niveau structural, comme les autres récepteurs, le VEGFR2 présente un domaine extracellulaire composé de 7 domaines immunoglobulines, une partie transmembranaire et un domaine cytoplasmique possédant une activité tyrosine kinase. Ce dernier est scindé en deux parties par un insert de 70 acides aminés (**Figure 19**). Le VEGFR2 lie préférentiellement le VEGF-A mais avec une affinité dix fois moins importante que le VEGFR1. Cependant, le récepteur 2 est également capable de lier les formes processées du VEGF-C et -D (McColl et al. 2003). De plus, comme le VEGFR1, le VEGFR2 peut être épissé de manière alternative afin de produire sa forme soluble. Le rôle du sVEGFR2 est de lier le VEGF-C et d'empêcher son interaction avec le VEGFR3, inhibant ainsi la prolifération des cellules lymphatiques. Cette forme soluble est particulièrement exprimée au niveau de la peau, du cœur, des reins, des ovaires et se retrouve assez abondamment dans le plasma sanguin (Albuquerque et al. 2009; Koch et al. 2011; Koch & Claesson-Welsh 2012).

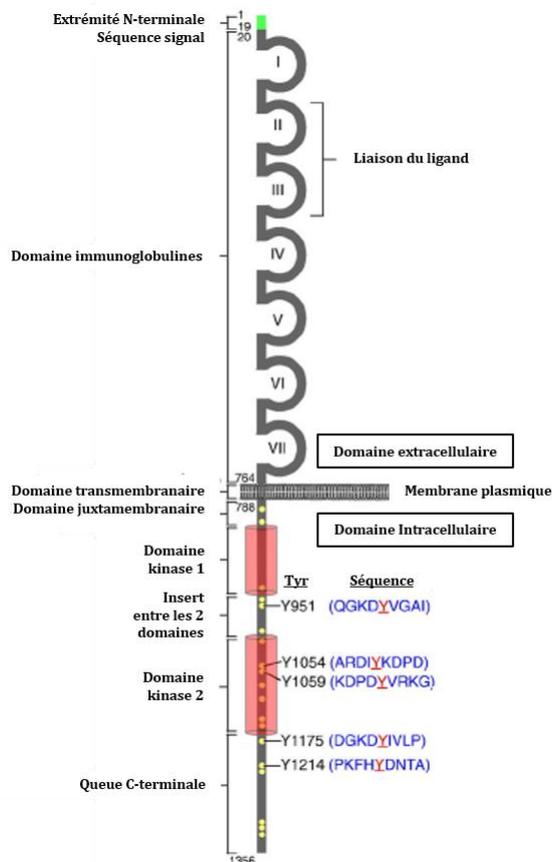


Figure 19 : Structure du VEGFR2 (KDR) humain. Le VEGFR2 est un récepteur transmembranaire de type III à tyrosine kinase. Son domaine extracellulaire est composé de 7 domaines immunoglobulines (I-VII) dont le 2e et le 3e sont responsables de la liaison du VEGF-A. Le domaine intracellulaire est composé de 2 domaines kinases séparés un domaine insert de 70 acides aminés. Parmi les deux domaines kinases, des tyrosines ont été mises en évidence comme étant les sites majeurs de phosphorylation (Y951, Y1054, Y1059, Y1175 et Y1214). La phosphorylation de ces sites constitue une zone d'ancrage pour les domaines SH2 des nombreuses molécules de signalisation. Figure adaptée de Holmes et al. 2007.

Durant l'embryogenèse murine, l'expression du VEGFR2 est détectée dès le 7ème jour du développement embryonnaire au niveau des progéniteurs sanguins mésodermiques. Par la suite, il est exprimé au niveau des progéniteurs endothéliaux et des cellules endothéliales différenciées. Les souris déficientes en ce récepteur meurent au neuvième jour de l'embryogenèse suite à un défaut dans le développement des cellules hématopoïétiques et endothéliales. Le phénotype ainsi observé est similaire à celui des souris *vegfa*^{-/-}. Ceci corrobore donc l'importance capitale du VEGFR2 dans la vasculogenèse et l'angiogenèse durant l'embryogenèse (Shalaby et al. 1995). Durant la vie adulte, ce récepteur est exprimé par une grande majorité des cellules endothéliales ainsi que par les cellules progénitrices endothéliales circulantes. De surcroît, la présence du VEGFR2 est également observée à la surface des cellules lymphatiques, de certaines cellules du pancréas, des mégacaryocytes,... Dans l'organisme adulte, l'expression du VEGFR2 au niveau des cellules endothéliales est d'autant plus élevée que les cellules sont impliquées dans un processus d'angiogenèse active. C'est notamment ce qui est observé

dans l'utérus mais également lors de phénomènes pathologiques liés à la néo vascularisation tumorale (Quinn et al. 1993; Koch & Claesson-Welsh 2012).

4.2.3.1 L'activité du VEGFR2

De nombreuses études ont montré que le VEGFR2 est le principal instigateur des effets physiologiques et pathologiques du VEGF-A dans les cellules endothéliales. La liaison du ligand est bien connue pour induire une dimérisation du récepteur. Cependant, des études récentes ont également montré la présence de pré-dimère de VEGFR2 avec une certaine activité kinase (Sarabipour et al. 2016). La liaison du VEGF-A sur le VEGFR2 induit non seulement la dimérisation mais stabilise également les dimères de VEGFR2 déjà formés. Les dimères sont stabilisés par des interactions faibles entre les différents domaines des immunoglobulines. Un changement de conformation du domaine transmembranaire, accompagné de la rotation des dimères survient. Ces événements permettent la trans ou autophosphorylation des résidus tyrosines des domaines kinases. Il existe de nombreuses tyrosines pouvant être phosphorylées dans les domaines kinases. Les cinq sites majeurs de phosphorylation sont les résidus Y951, présent dans le domaine insert, Y1054 et Y1059, localisés dans le domaine kinase, ainsi que Y1175 et Y1214 situés au niveau de la queue C-terminale. Il existe également d'autres sites de phosphorylation (Y1305, 1309, 1319 et 801) mais leur fonction n'est pas encore bien comprise (Matsumoto et al. 2005).

Le groupe de Murray a montré que la tyrosine juxtamembranaire 801 peut également être phosphorylée sur un domaine extracellulaire isolé. Cependant, la phosphorylation de ce résidu sur un VEGFR2 complet n'est pas certaine (Solowiej et al. 2009). Ce résidu pourrait également servir de site d'autophosphorylation précédant celles des Y1054 et Y1059. Ces deux résidus sont des régulateurs positifs de l'activité kinase du récepteur (Kendall et al. 1999).

Il a été démontré que la phosphorylation d'Y951 permet le recrutement de TSA_d (*T cell-specific adapter molecule*), aussi connu comme VRAP (*VEGF receptor associated protein*). Ces protéines régulent la réorganisation de l'actine et, par conséquent, impactent sur la migration des cellules endothéliales suite à une stimulation au VEGF-A (Wu et al. 2000; Matsumoto et al. 2005).

La phosphorylation de la tyrosine 1175 est essentielle pour les fonctions du VEGFR2. En effet T1175 constitue le site de liaison de nombreuses protéines (PLC γ , SHB, SCK, GRB2,...). Toutes ces protéines sont impliquées dans les diverses voies de

signalisation activées par le VEGFR2. Le remplacement de cette tyrosine par une phénylalanine engendre la mort des embryons de souris entre le 8ème et 9ème jour de l'embryogenèse. Ces souris sont caractérisées par un réseau vasculaire déficient, un phénotype similaire à celui observé chez les souris *Flk1^{-/-}* (Shalaby et al. 1995; Sakurai et al. 2005).

De manière intéressante, le même remplacement au niveau de la tyrosine 1212 (correspondant à Y1214 chez l'humain) conduit à des animaux viables et fertiles. Cependant, une étude *in vitro* a montré que la tyrosine Y1214 constitue le site d'accrochage d'une protéine adaptatrice Nck, qui en activant PAK-2 (*P21-activated protein kinase-2*) induit la migration des cellules endothéliales (Lamalice et al. 2004). De plus, une autre étude *in vitro* réalisée sur des récepteurs mutés indique que ce site de phosphorylation est important pour l'activation du VEGFR2 par le VEGF-A. Une étude plus récente a montré que Y1214 et Y1175 sont rapidement phosphorylées par les contraintes de cisaillement (Dela Paz et al. 2013). L'importance de cette tyrosine 1214 est donc encore floue et controversée.

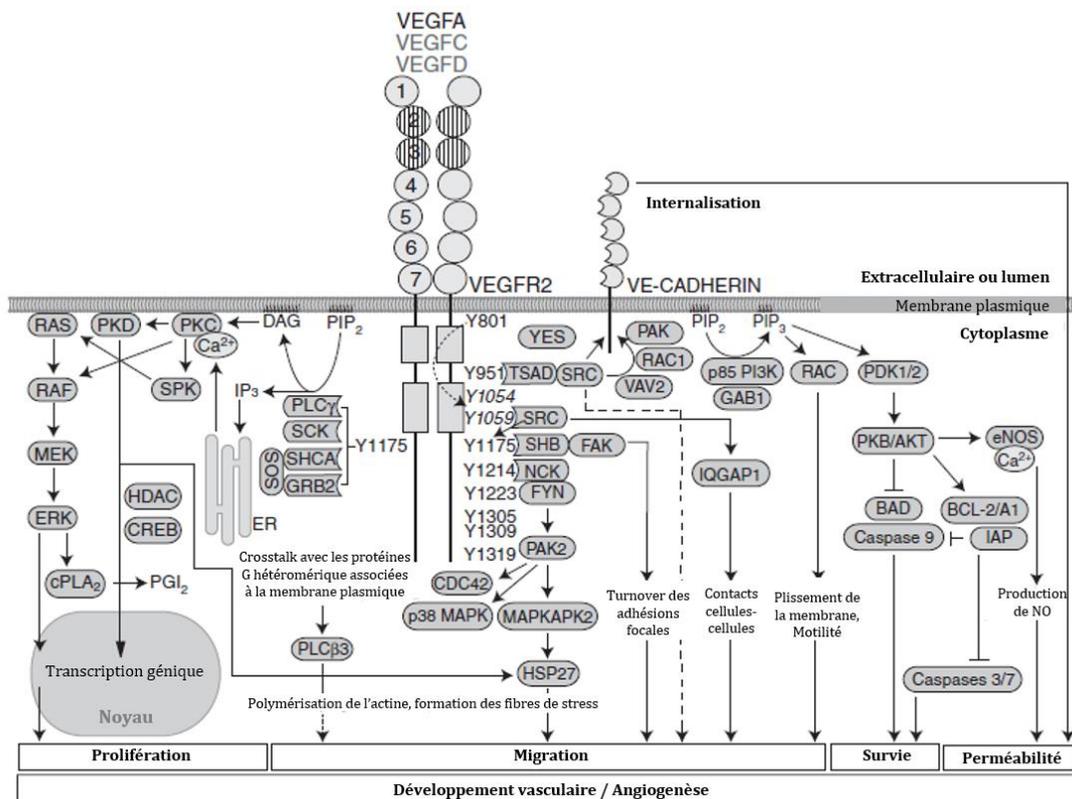


Figure 20 : Transduction du signal du VEGF-A par le VEGFR2. La liaison du VEGF-A initie la formation du dimère de VEGFR2 et le stabilise. Des événements de trans- et d'autophosphorylation sur divers résidus tyrosine permettent le recrutement de protéines adaptatrices. Le réseau complexe des voies de signalisation intracellulaires entraîne diverses réponses biologiques telles que la prolifération, la migration, la survie et la perméabilité des cellules endothéliales. Tous ces événements physiologiques permettent le développement vasculaire, l'angiogenèse mais également le maintien du réseau sanguin. Figure adaptée de Koch & Claesson-Welsh 2012.

L'ensemble de ces sites de phosphorylation permettent au VEGFR2 d'activer un grand nombre de voies de signalisation différentes. Ceci permet au couple VEGF-A/VEGFR2 d'induire les diverses fonctions régulant l'angiogenèse et le développement vasculaire telles que la perméabilité, la prolifération, la migration et la survie cellulaire (**Figure 20**).

4.3 Les voies de signalisation induites par le couple VEGF-A/VEGFR2

Afin de réguler la biologie des cellules endothéliales, le VEGFR2 suite à son activation par le VEGF-A, induit l'activation de plusieurs voies de signalisation intracellulaires. Celles-ci comprennent la voie d'ERK1/2-phospholipase C γ qui joue un rôle central durant le développement vasculaire et l'artériogenèse ; la voie PI3K-AKT-mTOR, cruciale pour la survie cellulaire, la régulation de la vasomotion et de la fonction de barrière ; la voie SRC et celle des small GTPases, impliquée dans la forme cellulaire, la migration et la polarisation. Cette dernière est également importante dans la modulation des jonctions endothéliales et de la fonction de barrière. En plus de toutes ces voies bien connues du VEGFR2, ce récepteur peut également en activer d'autres beaucoup moins comprises comme les MAPK p38, les STAT, les kinases de stress et la signalisation dépendante des récepteurs couplés aux protéines G (GPCR) (Simons et al. 2016).

4.3.1 La voie PLC γ -ERK1/2 et la signalisation du Ca²⁺

L'induction d'ERK1/2 par le VEGF régule la prolifération, la migration, la spécification du destin artériel et l'homéostasie des cellules endothéliales (Hong 2006, Simons and Eichmann 2015). L'activation de cette voie nécessite la phosphorylation de la tyrosine 1175. Contrairement à la plupart des RTK qui induisent la voie ERK1/2 via GRB2-SOS-RAS, le VEGFR2 l'induit plutôt par la voie de la phospholipase C γ . Y1175 phosphorylée permet l'activation de la PLC γ résultant en la génération d'inositol 1,4,5-triphosphate (IP3) et de diacylglycérol (DAG). IP3 libère le Ca²⁺ du réticulum endoplasmique qui vient alors agir avec le DAG pour activer les *Ca²⁺-dependent protein kinase C β 2* (PKC β 2). Ceci permet alors l'activation de la cascade RAF1-MEK-ERK1/2 (Takahashi et al. 1999; Simons et al. 2016). Cette voie active ensuite les facteurs de transcription de la famille des ETS (*E26 transformation-specific*) permettant la régulation de gènes importants pour les fonctions des cellules endothéliales (Wei et al. 2009; Van Bueren & Black 2012). De plus, le couple PLC γ -PKC induit la phosphorylation de

l'histone déacétylase 7 (HDAC7) qui à son tour active des gènes impliqués dans la prolifération et la migration des CEs (Wang et al. 2008).

Une autre composante de cette voie très importante pour les cellules endothéliales est le Ca²⁺. En plus d'être impliqué dans l'activation de la voie RAF1-MEK-ERK1/2, cet ion est impliqué dans l'activation des facteurs de transcription de la famille de NFAT (*Nuclear Factor of Activated T cell*). Ces derniers diminuent l'expression du VEGFR1, favorisant par conséquent la disponibilité du VEGF-A et donc la signalisation du VEGFR2 (Jinnin et al. 2009). Un autre groupe a également mis en évidence qu'une sur-activation de la signalisation NFAT peut conduire à l'initiation de l'apoptose des cellules endothéliales (Ryeom et al. 2008).

En conclusion, l'induction des voies de signalisation impliquant la PLC γ , ERK1/2 et le Ca²⁺ par la liaison du VEGF-A sur le VEGFR2 module la migration, la prolifération des cellules endothéliales et l'homéostasie des vaisseaux sanguins.

4.3.2 La voie PI3K/AKT et les small GTPases

Les kinases de type sérine-thréonine AKT 1-3 influencent de nombreux processus biologiques comme la survie cellulaire, la prolifération ou encore l'apoptose. AKT1 est la forme prédominante impliquée dans la régulation de l'angiogenèse adulte et pathologique. Le VEGFR2 ne présente pas de site de liaison pour les domaines SH2 de la sous-unité p85 de la phosphoinositide 3-kinase (PI3K). Il ne peut donc pas lier directement cet effecteur. Des protéines adaptatrices telles que SRC et SHB sont nécessaires à l'induction de cette voie (Simons et al. 2016).

Au sein des cellules endothéliales, cette voie peut être activée de plusieurs façons différentes. Premièrement, la phosphorylation de la tyrosine 1175 permet le recrutement de la protéine adaptatrice SHB. L'utilisation de siRNA ciblant SHB a mis en évidence son rôle dans l'activation de PI3K et FAK. L'activation de PI3K et FAK mène alors à la régulation de la migration cellulaire. Deuxièmement, la pY951 est capable de fixer TSAd qui forme ensuite un complexe avec SRC pour réguler également la migration des CEs. Cependant cette voie n'est pas activée dans toutes les cellules endothéliales et est, par conséquent, considérée comme une voie secondaire (Matsumoto et al. 2005). Troisièmement, certaines small GTPases peuvent également être activées suite à la liaison du VEGF-A sur le VEGFR2. C'est la phosphorylation d'Y1214 qui en est responsable. Parmi ces GTPases on distingue CDC42, RAC1 et les protéines RHO. L'activation de ces

voies régulent la réorganisation du cytosquelette, l'adhésion, la migration ainsi que la morphologie cellulaire (Tan et al. 2008; Abraham et al. 2015).

La survie des cellules endothéliales est un processus un peu différent des autres fonctions endothéliales. Contrairement à la migration, la perméabilité et la prolifération qui sont la plupart du temps induites par la sécrétion de VEGF de manière paracrine, la survie cellulaire peut être induite par une production de VEGF de manière autocrine. La régulation de cette fonction implique l'activation d'AKT1. Ceci est possible par la fixation de ce dernier sur le phosphatidylinositol-3, 4, 5-trisphosphate (PIP3) généré par le PI3K activé par le VEGFR2. La voie ainsi activée par phosphorylation permet d'inactiver deux protéines apoptotiques BAD (*Bcl-2 associated death promoter*) et la caspase 9. En parallèle, AKT par l'intermédiaire de FOXO1 induit l'expression des gènes codant pour des facteurs anti-apoptotiques tels que BCL-2, l'IAP (*Inhibitor Apoptosis Protein*) et la survivine. Ces protéines inhibent à leur tour les caspase 3 et 7 (Cardone et al. 1998; Gerber et al. 1998; Koch et al. 2011).

Le VEGF-A a premièrement été découvert comme étant un facteur régulant la perméabilité des vaisseaux sanguins. Cette fonction est aussi importante lors de l'angiogenèse physiologique que pathologique. L'induction de la perméabilité par le VEGF implique les deux voies présentées précédemment. Elle nécessite l'oxyde nitrique synthase endothéliale (eNOS) dont l'activité peut être stimulée d'une part par l'influx de calcium sous-jacent à la PLC et d'autre part par l'activation d'AKT qui phosphoryle la sérine 1179 de l'eNOS (Fukumura et al. 2001). La voie de signalisation des SRC est également impliquée dans la régulation de la perméabilité des cellules endothéliales et est discuté dans le point suivant.

4.3.3 La voie SRC

La famille des SRC endothéliales est une famille de tyrosine kinase cytoplasmique regroupant SRC, YES et FYN. L'activation de cette voie, par le VEGFR2, est dépendante de la phosphorylation de la tyrosine 951 qui lie le domaine SH2 de TSA, qui à son tour lie le domaine SH3 de SRC (Sun et al. 2012). La phosphorylation des VE-Cadhérines, induite par la famille des SRC suite à la stimulation au VEGF-A, conduit à leur internalisation. Ceci engendre une rupture des jonctions adhérentes des CE et une augmentation de la perméabilité vasculaire. SRC peut également phosphoryler la protéine FAK, localisée au niveau des adhésions focales. Son activation conduit à la dissociation des complexes VE-Cadhérines/ β -caténines (Chen et al. 2010). Par conséquent, l'activation de FAK par le

VEGF conduit à l'augmentation de la perméabilité des cellules endothéliales (Simons et al. 2016).

4.3.4 Les kinases de stress et la voie STAT

En plus des différentes voies expliquées ci-dessus, le VEGFR2 est également capable d'activer la MAPK p38. Cet effecteur cytoplasmique régule différents événements tels que l'angiogenèse induite par les forces de cisaillement, la migration, la perméabilité et la survie des CEs. Le mécanisme d'action de la voie VEGFR2/p38 n'est pas encore complètement compris mais nécessiterait l'intervention de NRP1, du Ca²⁺ et de SRC afin d'induire la phosphorylation de p38 (Simons et al. 2016).

Enfin, la stimulation du VEGFR2 permet également d'activer la voie de signalisation des STAT. Il s'agit d'une famille de protéines incluant STAT1 et STAT3. Elles sont caractérisées par la présence d'un domaine SH2. La phosphorylation de ces protéines par le VEGFR2 conduit à leur translocation dans le noyau et à la régulation de la transcription des gènes. Cette voie est impliquée dans la régulation du cycle cellulaire, de l'apoptose et joue un rôle dans l'inflammation vasculaire (Bromberg & Darnell 2000).

4.4 Les co-récepteurs du VEGFR2

Les co-récepteurs du VEGF sont très importants dans la modulation de la signalisation du VEGFR2, tant au niveau qualitatif que quantitatif. Ils sont nombreux mais les plus connus et étudiés sont les neuropilines, l'héparan sulfate, les intégrines et les VE-cadhérines.

4.4.1 Les neuropilines

Les neuropilines (NRP1 et NRP2) ont premièrement été décrites comme les récepteurs transmembranaires de 130 kDa capables de fixer les sémaphorines de classe 3 (molécules solubles possédant une fonction dans la guidance axonale) (Kolodkin et al. 1997). Actuellement, cette famille est connue pour son implication dans le développement du système nerveux et vasculaire. Une preuve supplémentaire de l'importance de ces récepteurs dans la biologie vasculaire est leur capacité à lier les ligands de la famille du VEGF.

NRP1 et NRP2 sont capables de lier les VEGF et en particulier le VEGF-A mais avec une affinité 50 fois plus forte pour NRP1 que pour NRP2 (Soker et al. 2002; Parker et al. 2012). Cette interaction est réalisée grâce à des motifs particuliers présents dans les

exons 7 et 8 du ligand. L'exon 8 code pour la partie C-terminale de VEGF-A. Cette partie est essentielle pour la fixation sur NRP-1. Il a été montré que l'isoforme 121 du VEGF-A (dépourvue de l'exon 7) est capable de se fixer sur NRP1 mais ne permet pas la formation d'un complexe entre le VEGFR2 et NRP1 (Pan et al. 2007). Cet exon 7 code pour un domaine de liaison à l'héparan sulfate. De telle manière l'établissement du complexe entre le VEGFR2 et les NRP suite à une induction du VEGF-A165 nécessite d'abord une interaction du ligand avec l'héparan sulfate (Vander Kooi et al. 2007). Alors que NRP1 est un co-récepteur pour le VEGFR2, NRP2 l'est pour le VEGFR3 (Tugues et al. 2011).

VEGF-A se fixe donc à la fois sur le VEGFR2 et sur NRP1 et induit la formation d'un complexe VEGFR2/NRP1 en présence d'héparan sulfate. La présence du co-récepteur contribue à l'augmentation de la migration, de la survie et de la perméabilité (induite par le couple VEGF-A/VEGFR2) des cellules endothéliales (Becker et al. 2005; Vander Kooi et al. 2007).

L'impact de ce complexe sur l'angiogenèse et en particulier lors du bourgeonnement et du branchement des vaisseaux sanguins est indéniable. Cependant, la configuration du complexe NRP1/VEGF-A/VEGFR2 n'est pas encore connue et la possibilité de la présence d'un complexe d'ordre plus élevé n'est pas à exclure. Un des mécanismes proposés pour expliquer l'impact de NRP1 dans la signalisation du VEGF-A/VEGFR2 est sa capacité à moduler le trafic intracellulaire du VEGFR2. Le recrutement des protéines synectine-myosine VI par NRP-1 contribue à l'internalisation du complexe comprenant le VEGFR2. Cette internalisation induite par NRP1 est d'ailleurs essentielle pour l'activation d'ERK1/2 induite par le VEGF-A (Lanahan et al. 2013; Koch et al. 2014; Simons et al. 2016) (**Figure 21**). De surcroît, une étude du groupe de Ballmer-Hofer a mis en évidence l'importance de la neuropiline 1 dans la perpétuation du signal induit par le VEGF-A. Ceci favorise le recyclage membranaire du VEGFR2 (Ballmer-Hofer et al. 2011).

La capacité de NRP1 de lier le VEGF-A sans l'intermédiaire du VEGFR2 lui confère la capacité de séquestrer ce ligand. C'est notamment le cas au niveau de certains neurones (Cariboni et al. 2011).

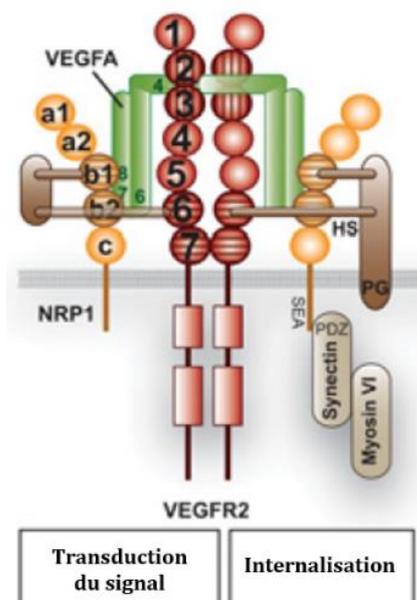


Figure 21 : Structure du complexe de signalisation VEGFR2-NRP1-HS. La liaison du VEGF-A (vert) au VEGFR2 (rouge) et à NRP1 (jaune) via la région codée par l'exon 8. Le VEGF-A interagit également avec l'héparane sulfaté (brun) pour former un complexe avec VEGFR2 et NRP1. Le complexe ainsi formé recrute (par l'intermédiaire de NRP1) les protéines syndectine et myosine VI. Ces interactions entraînent l'internalisation du complexe via la myosine VI. Figure adaptée de Simons et al. 2016.

4.4.2 L'héparane sulfaté (HS)

L'héparane sulfaté, ainsi que sa forme sulfatée plus abondante, l'héparine, modulent la biologie du VEGF. HS est non seulement capable de fixer directement le VEGF mais également les récepteurs et corécepteurs tels que NRP1. Comme mentionné précédemment, ces protéoglycans sont notamment essentiels pour la formation du complexe NRP-1/VEGF-A/VEGFR2 (**Figure 21**).

L'héparane sulfaté constitue également un réservoir très important de facteurs de croissance. La fixation de ces facteurs sur les HS permet la concentration de ces derniers. Leur libération permet alors la formation des gradients de facteurs de croissance. La migration des cellules « tip » est un bon exemple de la formation du gradient de VEGF-A par l'héparane sulfaté (Gerhardt & Betsholtz 2005).

L'héparane sulfaté permet également de maintenir la signalisation de VEGF-A à la surface d'une cellule endothéliale. En effet, même lié au VEGFR2, le VEGF-A peut interagir avec les protéoglycans présents à la membrane des cellules adjacentes. Ceci pourrait empêcher l'internalisation du récepteur, augmentant par conséquent le temps de transduction du signal (Jakobsson et al. 2006).

4.4.3 Les intégrines

Les intégrines sont des glycoprotéines transmembranaires existant sous forme d'hétérodimères. Ces protéines sont parmi les récepteurs membranaires les plus abondants et sont exprimées par presque tous les types cellulaires excepté les érythrocytes. Chez les

vertébrés, il existe 24 hétérodimères différents possédant une spécificité de ligand et une expression tissulaire différente. Ces dimères sont constitués par l'association non covalente d'une sous-unité α et d'une β . Il existe 8 sous-unités β et 18 α qui, associées les unes avec les autres forment les 24 intégrines (De Franceschi et al. 2015).

La famille des intégrines régule les interactions cellules-cellules et cellules-matrice extracellulaire. Ceci est possible grâce à la liaison spécifique des intégrines avec des composants de la matrice tels que le collagène, la fibronectine, la vinculine ou encore la laminine. De plus, les intégrines sont capables d'interagir avec divers récepteurs comme les récepteurs à tyrosine kinase comme le VEGFR2 (Koch & Claesson-Welsh 2012).

La sous-unité $\beta 3$ est capable de se fixer au VEGFR2 par l'intermédiaire de son domaine extracellulaire. Ce complexe est stabilisé par la sous-unité αV (Borges et al. 2000; Liu et al. 2009). Cette association et les événements de phosphorylation qui en découlent sont essentiels pour l'activation complète du VEGFR2 et pour ses fonctions vasculaires (Mahabeleshwar et al. 2007; Mahabeleshwar & Byzova 2008; West et al. 2012).

De manière assez inattendue, suite à la présence de VEGF-A, ces intégrines $\alpha V \beta 3$ sont également capables de se lier à NRP1. Elles contribuent ainsi à la régulation négative de la signalisation du VEGF par séquestration de NRP1 (Robinson et al. 2009).

En plus d'être capable de fixer la sous-unité $\beta 3$, le VEGFR2 peut également s'associer à la sous-unité $\beta 1$ suite à la liaison du VEGF. Ce complexe favorise l'internalisation et la prolongation de la phosphorylation de la tyrosine 1214 et de MAPK P38. De surcroît, cette association induit une redistribution des intégrines $\beta 1$ au niveau des adhésions focales, favorisant la migration cellulaire (Chen et al. 2010).

D'autres intégrines ($\alpha 5 \beta 1$ et $\alpha 9 \beta 1$) en association avec des protéines de la matrice comme la fibronectine sont également capables de moduler les fonctions du VEGF telles que la migration et la prolifération en favorisant la phosphorylation de son récepteur et des voies de signalisation sous-jacentes (Vlahakis et al. 2007). Les intégrines sont donc des composants très importants dans la régulation du système vasculaire et en particulier dans celle de la voie VEGF-A/VEGFR2 (Koch & Claesson-Welsh 2012; Simons et al. 2016).

Il existe d'autres co-récepteurs comme par exemple l'ephrin B2 dont le rôle sera détaillé dans la partie suivante. Quoiqu'il en soit, tous ces co-récepteurs sont essentiels pour l'activation et la régulation de la signalisation et des fonctions angiogènes du VEGF-A/VEGFR2.

4.5 Le trafficking du VEGFR2

La membrane plasmique est le premier élément indispensable pour l'activation du VEGFR2. Cependant, la capacité du récepteur à transduire son signal dépend notamment de ses partenaires d'interaction et du temps de résidence à la membrane, mais aussi de la vitesse d'internalisation, de son trafficking intracellulaire et de son taux de dégradation. Au sein d'une cellule endothéliale non stimulée, le VEGFR2 est localisé à la fois au sein de la membrane plasmique et de ses différents domaines (lipid raft, jonctions cellulaires, adhésions focales,...) mais aussi dans les différents compartiments intracellulaires. Ces différents pools de VEGFR2 sont importants pour pouvoir répondre rapidement à une stimulation au VEGF (Gampel et al. 2006; Simons et al. 2016).

Le trafficking du VEGFR2 est un sujet complexe. De nombreuses zones d'ombres subsistent. Il est généralement admis que la liaison du VEGF à son récepteur provoque son internalisation. Ce dernier se retrouve alors au sein des endosomes le conduisant, soit vers les lysosomes pour être dégradé, soit vers d'autres endosomes (Rab4 et Rab11) permettant son recyclage à la membrane plasmique. Ce recyclage fait également intervenir la fraction de VEGFR2 nouvellement synthétisée, présente dans le Golgi.

Le niveau de base de VEGFR2 présent à la surface des cellules est maintenu grâce aux processus d'internalisation, de recyclage, de synthèse, et bien entendu d'adressage à la membrane. Cependant, une grande quantité de ce récepteur est présent au sein des endosomes précoces (Jopling et al. 2014). La stimulation par le VEGF favorise la mobilisation du VEGFR2, présent dans le Golgi et les endosomes, et son transport vers la membrane plasmique. Ce transport est nécessaire pour l'activation et la signalisation du récepteur. Il a été montré qu'une protéine faisant partie de la famille des myosines, Myo1c, ainsi que la syntaxine-6, sont indispensables pour ce transport (Tiwari et al. 2013). De plus, le passage du récepteur par l'appareil de Golgi semble important pour son adressage à la membrane suite à la stimulation par le VEGF. L'utilisation de Brefeldin A, inhibant le transport du reticulum endoplasmique au Golgi, perturbe profondément les mouvements intracellulaires du VEGFR2 vers la membrane plasmique (Manickam et al. 2011).

Le VEGFR2 est un récepteur qui est également localisé dans les caveolae des CEs. La cavéoline-1, composante des caveolae, se lie au VEGFR2 et régule son activité. Les lipid rafts, domaines membranaires riches en cavéoline et en cholestérols sont considérés comme des hotspots de signalisation au sein de la membrane. Bien que leur mode de fonctionnement ne soit pas encore bien compris, les preuves de leur importance dans la transduction du signal du VEGFR2 sont de plus en plus nombreuses. En effet, Labrecque

et ses collègues ont montré que la localisation du VEGFR2 dans les rafts est nécessaire pour la phosphorylation des ERK et pour la migration des CEs. Notre laboratoire a notamment montré que la stimulation des cellules par le VEGF-A modifie la localisation du récepteur (présent de manière diffuse dans la membrane) vers ces lipid rafts. De plus, la perturbation de ces derniers par la cyclodextrine diminue la signalisation du VEGFR2 induite par le VEGF-A. Il y a quelques années, un autre groupe a également observé que lorsqu'on empêche le récepteur du VEGF d'atteindre ces domaines, l'angiogenèse induite par ce ligand est diminuée (Noghero et al. 2012). Les lipid rafts sont donc des plateformes membranaires nécessaires à la signalisation du VEGF et peuvent jouer de nombreux rôles dans la régulation du VEGFR2 et de l'angiogenèse. Cependant, leurs rôles exacts sont encore controversés et pourraient dépendre de la voie de signalisation étudiée. En effet, la destruction des radeaux lipidiques engendre une inhibition de la voie des ERK et de la migration des CEs alors qu'elle conduit à une augmentation de la phosphorylation de la PLC γ (Labrecque 2003; Ikeda et al. 2005; Jopling et al. 2014).

Le VEGFR2 est donc activé à la membrane. Ceci provoque des mouvements intracellulaires pour permettre d'augmenter le niveau de VEGFR2 à la surface cellulaire. Cette activation engendre également des mouvements du récepteur activé vers les domaines de signalisation de la membrane. Il s'ensuit alors un évènement commun à de nombreux RTKs, l'internalisation du complexe ligand/récepteur permettant de prolonger mais également d'atténuer le signal. C'est un processus finement contrôlé dont la régulation est encore controversée en ce qui concerne le VEGFR2.

4.5.1 L'internalisation du VEGFR2

La signalisation du VEGFR2 est fortement régulée par sa localisation intracellulaire. A la surface cellulaire, le VEGFR2 activé est rapidement déphosphorylé et inactivé par de nombreuses phosphatases. A côté de ceci, l'internalisation du VEGFR2, tout comme celle d'EGFR ou des récepteurs du TGF- β , permet sa signalisation au sein des compartiments endosomaux. Cette internalisation est principalement dépendante de la clathrine et indispensable pour la signalisation du VEGFR2. En effet, un traitement des cellules avec de la dynasore, drogue inhibitrice des voies endocytiques, réduit le niveau de phosphorylation du VEGFR2 activé par le VEGF (Sawamiphak et al. 2010). Une fois à l'intérieur de la cellule, les vésicules d'endocytose conduisent le récepteur au sein des endosomes précoces caractérisés par la présence du marqueur EEA-1 (*Early Endosomal Antigen-1*). Lanahan et al. ont découvert que le trafficking du VEGFR2 vers les endosomes

précoces nécessite l'intervention du complexe synectine-myosine-6. Un élément perturbant ce transport engendre une déphosphorylation d'Y1175. En effet, les vésicules d'endocytose sont alors localisées pour une période plus longue dans l'espace sous-membranaire exposant ainsi les tyrosines du VEGFR2 à de nombreuses phosphatases telles que PTP1b (*Protein Tyrosine Phosphatase 1b*) (Lanahan et al. 2013). Ceci diminue sa signalisation. Par conséquent, la localisation au sein des endosomes précoces protège le récepteur des événements de déphosphorylation. Elle est donc essentielle au VEGFR2 pour certaines de ses fonctions comme l'activation de la voie des ERK (Lampugnani et al. 2006).

Enfin, après le passage dans les endosomes précoces, le VEGFR2 est adressé dans divers autres compartiments. D'une part, la signalisation peut être stoppée par adressage aux endosomes tardifs (Rab7) et puis aux lysosomes. Ceci conduit à la dégradation du récepteur. A côté de ce premier destin, le VEGFR2 peut être conduit des endosomes précoces aux endosomes de recyclage (Rab4 et Rab11). Rab4 induit un recyclage rapide alors que Rab11 un recyclage lent. De nombreuses phosphatases y déphosphorylent les diverses tyrosines du récepteur. Cette voie est favorisée par la stimulation par le VEGF et permet d'amener le VEGFR2 inactif à la surface de la cellule (Gampel et al. 2006; Lanahan et al. 2013) (**Figure 22**).

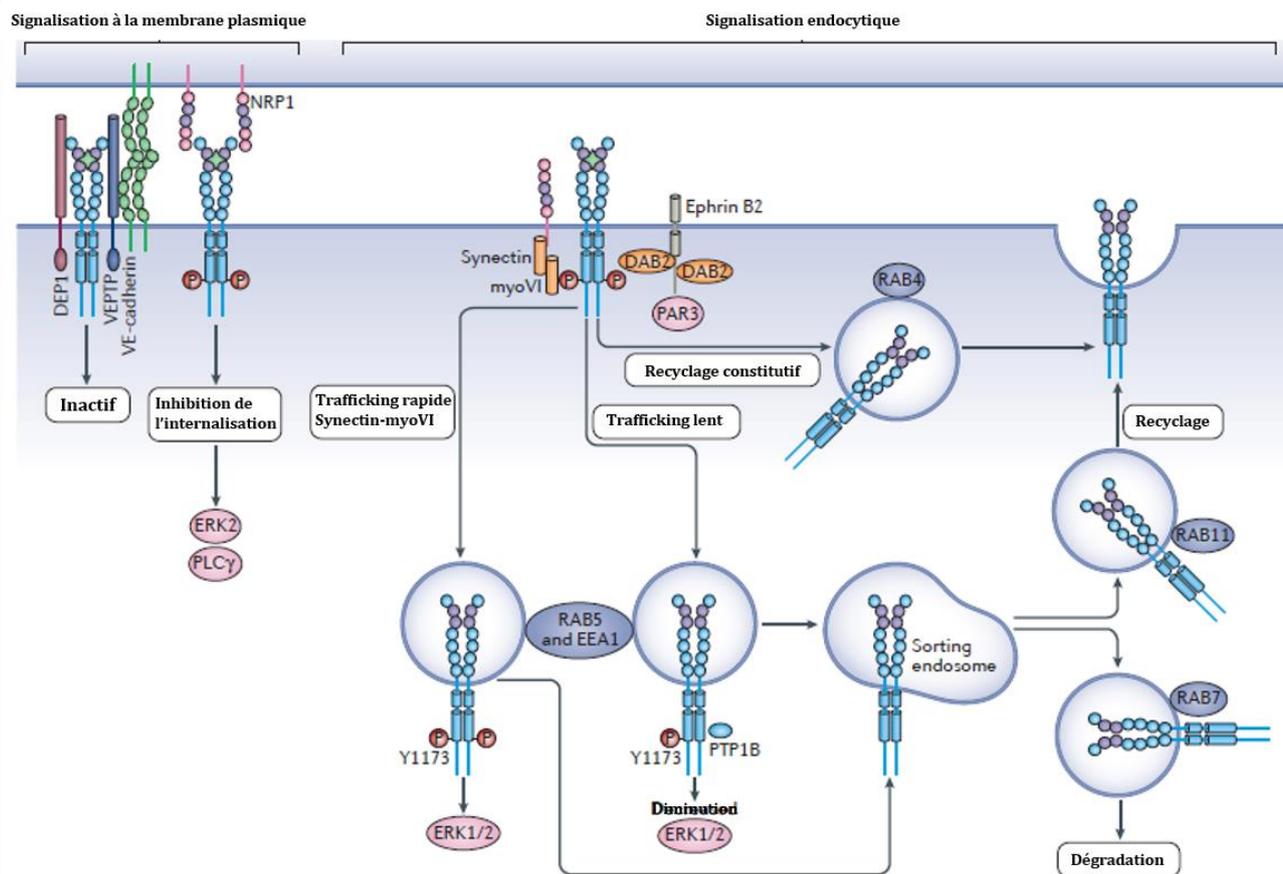


Figure 22 : Représentation schématique du trafficking intracellulaire du VEGFR2. A l'état inactif, le VEGFR2 est principalement séquestré à la membrane où il est en contact avec les VE-cadhérines soumettant le VEGFR2 à l'action de phosphatases comme DEP1 et VE-PTP. Suite à la liaison du VEGF, le VEGFR2 est internalisé par l'intermédiaire des vésicules riches en clathrine qui fusionnent avec les endosomes précoces. Après le passage dans les endosomes précoces, le VEGFR2 est adressé dans divers autres compartiments. D'une part, la signalisation peut être stoppée par adressage aux endosomes tardifs (Rab7) et puis aux lysosomes. En parallèle, le VEGFR2 peut également être adressé aux endosomes de recyclage (Rab4 et Rab11) pour permettre le retour du récepteur à la surface de la cellule. L'ensemble de ces événements est finement régulés par l'intervention de différentes protéines comme les VE-Cadhérines, l'Ephrin B2. Figure adaptée de Simons et al. 2016.

Malgré le fait que les modes d'internalisation du VEGFR2 commencent à être mieux compris, il subsiste des zones d'ombres. De telle manière, en plus de l'endocytose induite par le ligand, le VEGFR2 peut également être internalisé de manière constitutive. Ce processus est encore très peu compris mais il semble que suite à cette internalisation, le VEGFR2 est rapidement recyclé à la membrane via les endosomes riche en Rab4 (Zhang & Simons 2014). Récemment, Basagiannis a montré que l'internalisation du VEGFR2 via un mécanisme dépendant de la clathrine ne serait valable que pour l'endocytose constitutive du récepteur alors que l'internalisation induite par le VEGF-A se déroulerait par macropinocytose (Basagiannis & Christoforidis 2016).

4.5.2 La régulation de l'internalisation du VEGFR2

La régulation de l'internalisation du VEGFR2 se passe à différents niveaux. Premièrement de manière intrinsèque suite aux événements de phosphorylation et deuxièmement par l'intervention de protéines et récepteurs interagissant avec le VEGFR2.

Le domaine C-terminal du récepteur, contenant des sérines et des tyrosines, peut également être phosphorylé suite à la stimulation par le VEGF-A. Plusieurs groupes ont montré que la phosphorylation des sérines 1188 et 1191 de ce domaine est importante pour l'endocytose du récepteur. La mutation de ces deux sites conduit à l'altération de l'internalisation et à l'atténuation du signal induit par le récepteur (Meyer et al. 2004; Bruns et al. 2010). En plus de la phosphorylation de ces sérines, deux tyrosines (Y1054 et Y1059) semblent être importantes pour l'ubiquitinylation du VEGFR2 qui entraîne alors son internalisation et sa dégradation dans les lysosomes (Meyer et al. 2004). Ces deux tyrosines ne sont pas localisées dans le domaine carboxy-terminal comme les sérines 1188 et 1191. Cependant, ce domaine semble également important pour la protéolyse du récepteur (Manni et al. 2014).

En plus d'être régulée de manière intrinsèque, l'internalisation du récepteur est influencée par différentes protéines.

L'ephrinB2 contrôle les mouvements du VEGFR2 de la membrane plasmique vers l'intérieur des cellules endothéliales. Une étude récente sur les rétines de souris a montré que la délétion de cette protéine mène à la perte totale de l'endocytose du VEGFR2 (Sawamiphak et al. 2010). Le contrôle de l'internalisation du VEGF-A/VEGFR2 par l'ephrinB2 passe par le recrutement de DAB2 (*disabled homologue 2*) et de PAR3 (*cell polarity regulator partitioning defective 3*). Une étude a notamment montré que le knockdown de ces protéines dans les cellules endothéliales inhibe l'internalisation du VEGFR2 et réduit l'angiogenèse induite par le VEGF-A (Nakayama & Berger 2013).

La VE-cadhérine est une autre protéine interagissant avec le VEGFR2 et régulant son internalisation. Cette interaction se déroule au niveau des jonctions cellules-cellules et maintient le récepteur du VEGF-A sous une forme inactive. Ceci est rendu possible par l'exposition du VEGFR2 à des complexes formés entre les VE-cadhérines et des phosphatases telles que les VE-PTP (*Vascular Endothelial-Phosphotyrosine Phosphatase*) et les DEP1 (*density-enhanced phosphatase 1*) (**Figure 22**). La délétion du gène codant la VE-cadhérine provoque une augmentation de l'endocytose et du temps passé au sein des endosomes précoces conduisant à une élévation de l'activation de la voie de signalisation des ERK (Lampugnani et al. 2006).

Récemment, d'autres protéines de la famille des CLASPs (*clathrin-associated sorting proteins*) ont été découvertes dans la régulation de l'internalisation et du trafficking du VEGFR2. Les epsins semblent affecter l'endocytose du VEGFR2. Une délétion de ces molécules dans les cellules endothéliales conduit à une augmentation de la signalisation du

VEGFR2 (Pasula et al. 2012). NUMB et NUMB-like, deux autres protéines de cette famille, interagissent avec le VEGFR2 et prolongent sa signalisation intracellulaire en empêchant sa dégradation. Une délétion combinée de ces deux investigateurs conduit à diminution du recyclage du récepteur à la membrane plasmique et provoque une diminution de la phosphorylation des ERK1/2 et d'AKT (Van Lessen et al. 2015).

L'endocytose du VEGFR2 est donc un processus extrêmement contrôlé dont on ne connaît pas encore toutes les régulations. Une meilleure compréhension de celle-ci pourrait permettre de développer de nouvelles stratégies dans le cadre du traitement des maladies vasculaires et des cancers.

Objectifs du travail

La télangiectasie hémorragique héréditaire est une maladie dont les conséquences sont bien connues mais dont le mécanisme est encore loin d'être élucidé. La cause principale de ce syndrome est la formation incomplète du réseau de capillaires suite à la présence de mutations dans les gènes de la famille du TGF- β . A la place d'un réseau de fins capillaires, des gros vaisseaux tortueux, fragiles et perméables font la liaison entre les artères et les veines, provoquant notamment de nombreuses hémorragies. Même si le mécanisme par lequel ces malformations apparaissent n'est pas encore bien compris, un excès d'angiogenèse semble être la clé.

Chez les patients souffrant d'HHT, un taux élevé de VEGF, tant au niveau du plasma que du sérum, a été observé en comparaison au niveau présent chez les personnes saines (Cirulli et al. 2003; Sadick et al. 2005; Botella et al. 2015). Cette hyper-activation de l'angiogenèse induite par ce niveau anormal de VEGF provoque un déséquilibre et participe au développement anormal de gros vaisseaux sanguins caractéristiques de la télangiectasie hémorragique héréditaire. Une preuve supplémentaire de l'importance du VEGF est l'efficacité des traitements ciblant ce facteur de croissance dans la lutte contre cette maladie (Guilhem et al. 2017).

Un autre élément clé dans la compréhension d'HHT est le BMP9, un membre de la famille du TGF- β . En effet, ces dernières années, ce facteur est apparu comme un élément extrêmement important dans la régulation de l'angiogenèse et de la maladie. Ceci pour plusieurs raisons. Premièrement, le groupe de Bailly et Feige a montré que ALK1, dont le véritable ligand n'était pas encore connu à l'époque, lie préférentiellement le BMP9 afin d'activer la voie dépendante des SMAD1/5/8 (David et al. 2007). A partir de ce moment-là, il est devenu clair que BMP9 et ALK1 étaient liés et par conséquent que BMP9 pourrait jouer un rôle dans HHT. Deuxièmement, suite à cette découverte, il a été montré que l'endoglin favoriserait la signalisation BMP9/ALK1 (Nolan-Stevaux et al. 2012; Sugden & Siekmann 2018). Enfin, récemment, certains patients souffrant des symptômes caractéristiques de la télangiectasie hémorragique héréditaire ont présenté des mutations dans le gène codant pour le ligand BMP9 (Wooderchak-Donahue et al. 2013). Le fait que la mutation de deux récepteurs du BMP9 (ALK1 et Endoglin) provoque l'apparition d'HHT et de surcroît que certains patients présentent des mutations au niveau du gène

codant le BMP9 lui-même, confèrent à ce ligand un rôle central dans les futures recherches tentant de mieux comprendre le mécanisme sous-jacent à cette maladie.

L'étude du rôle du BMP9 dans l'angiogenèse est un sujet qui a pris énormément d'importance au cours de ces dernières années. Cependant ses effets sur les cellules endothéliales *in vitro* et *in vivo* semblent toujours disparates. En effet, certains groupes de recherches comme ceux de Larrivée, de ten Dijke ou encore de Feige penchent en faveur d'un rôle inhibiteur de l'angiogenèse alors que Suzuki en 2010 et Buscetti en 2017 ont montré que le BMP9 augmente l'angiogenèse des cellules endothéliales (Scharpfenecker et al. 2007; David et al. 2007; Suzuki et al. 2010; Larrivée et al. 2012; Ntumba et al. 2016; Akatsu et al. 2017; Busceti et al. 2017).

L'objectif de cette thèse est de tenter de clarifier le rôle du BMP9 dans l'angiogenèse en étudiant la possibilité d'un cross-talk entre les voies de signalisation de VEGF et celles du BMP9. Nous avons choisi d'étudier l'effet de ces deux facteurs seuls ou en combinaison au travers d'expériences permettant de déterminer leurs importances dans les interactions entre récepteurs, les fonctions des cellules endothéliales, la signalisation intracellulaire et le trafficking des récepteurs.

Matériel et méthodes

1. Solutions, tampons et réactifs

Solutions et tampons

GSH : 45 mM GSH ; 75 mM NaCl ; 75 mM NaOH ; 1% BSA

PBS : NaCl 137 mM ; Na₂HPO₄ 1,5 mM ; KH₂PO₄ 8,5 mM; KCl 2,7 mM; pH 7,4

TBS : Tris HCl 25mM; NaCl 250 mM; KCl 10 mM; pH 7,4

MBS : MES 25mM; NaCl 150mM; pH 6,5

Tampon d'électrophorèse : Tris HCl 25 mM ; glycine 192 mM ; SDS 0,1%

Tampon de chargement : Tris HCl 30 mM; SDS 5 %, glycérol 5 % ; bleu de bromophénol 0,002 %; β-mercaptoethanol 2,5 %; pH 6,8

Tampon de transfert : Tris HCl 24 mM ; glycine 192 mM

Tampon Running: Tris 1,5M; pH 8,8

Tampon Stacking: Tris 0,5M; pH 6,8

Solution de désybridation : glycine 0,2M ; 0,1% Tween 20, pH 2,5.

Solution de lyse RIPA : Tris-HCL 50 mM, NaCl 150 mM ; NP-40 1 % désoxycholate de sodium 0.5 % ; EDTA 1 mM, DTT 1 mM + inhibiteurs de phosphatases (phostop, Roche, Mannheim, Allemagne), inhibiteurs de protéases (Complete mini, Roche, Mannheim, Allemagne) et octylglucoside 0,2%

Réactifs

VEGF-A165 (*Reliatech*, Wolfenbüttel, Allemagne)

Human GDF-2, BMP9 (*Reliatech*, Wolfenbüttel, Allemagne)

bFGF (*Promega*, Madison, WI, USA)

Anticorps

Rabbit anti-human phospho ERK 1/2 (*Cell signaling*, Billerica, MA, USA), ref. 4377

Rabbit anti-human phospho AKT (Ser473) (*Cell signaling*, Billerica, MA, USA), ref. 4060

Rabbit anti-human VEGFR2 (*Cell signaling*, Billerica, MA, USA), ref. 2479

Mouse anti-human VEGFR2 (*R and D Systems*, Minneapolis, MN, USA), ref. MAB3571

Rabbit anti-human phospho-VEGFR2 (*Cell signaling*, Billerica, MA, USA), ref. 2478

Rabbit anti-human ACVRL1 (*Abcam*, Cambridge, UK), ref. ab68703

Rabbit anti-human ALK5 (*Abcam*, Cambridge, UK), ref. ab31013

Rabbit anti-human Endoglin (*Cell signaling*, Billerica, MA, USA), ref. 14606

Rabbit anti-human P-SMAD 1/5 (*Cell signaling*, Billerica, MA, USA), ref. 9516

Rabbit anti-human SMAD1 (*Cell signaling*, Billerica, MA, USA), ref. 6944

Rabbit anti-human SMAD4 (*Cell signaling*, Billerica, MA, USA), ref. 46535

Rabbit anti-human Rab 4, 5, 7, 11 (Rab Family Antibody Sampler Kit, *Cell signaling*, Billerica, MA, USA), ref. 9385

Mouse anti-human caveoline (*Abcam*, Cambridge, UK), ref. ab37141

Rabbit anti-human tubuline (*Abcam*, Cambridge, UK), ref. ab6046

Cholera Toxin subunit B couplé à AlexaFluor 488 (*Life technologies*, Carlsbad, CA, USA), ref. C34775

Phalloidine-FITC (*Sigma*, Saint-Louis, Missouri, MO, USA), ref. P5282

Les anticorps primaires sont utilisés à une concentration de 1/1000 en Western blotting et 1/100 en immunofluorescence et en PLA.

Goat anti-rabbit couplé à la HRP (*Cell signaling*, Billerica, MA, USA), ref. 7074

Goat anti-mouse couplé à la HRP (*Cell signaling*, Billerica, MA, USA), ref. 4076

Goat anti-rabbit couplé à Alexa 488 (*Life technologies*, Carlsbad, CA, USA), ref. A11008

Goat anti-rabbit couplé à Alexa 568 (*Life technologies*, Carlsbad, CA, USA), ref. A11011

Goat anti-mouse couplé à Alexa 488 (*Life technologies*, Carlsbad, CA, USA), ref. A11001

Goat anti-mouse couplé à Alexa 568 (*Life technologies*, Carlsbad, CA, USA), ref. A11004

2. Culture cellulaire

Les cellules

HUVEC, *Human Umbilical Vein Endothelial Cells* (Lonza)

HUVEC mutées HHT2 (*Centro de Investigaciones Biológicas (CIB) de la Universidad Complutense de Madrid*): cellules provenant du cordon ombilical d'un patient atteint d'HHT de type 2

Les HUVECs sont utilisées entre les passages 5 et 9.

Les milieux de culture

EBM2, *Endothelial Basic Medium* (Lonza)

EGM2, *Endothelial Growth Medium 2 (Lonza)* : ce milieu a la même composition que l'EBM2 mais auquel on a ajouté l'*EGM™-2 BulletKit™ (Lonza)* ainsi que 5% de sérum (BioWhittaker, *Lonza*)

La méthode de culture

Les cellules endothéliales humaines de la veine ombilicale (HUVEC) sont semées dans des flasques de cultures de 75 cm² (*CELLSTAR, Greiner Bio-One, Frieckenhausen, Allemagne*) « coatées » à la gélatine 0,2% et cultivées dans 10 ml d'un milieu riche, l'EGM2, enrichi de 5% de sérum (BioWhittaker, *Lonza*) et de 100 unités/ml de Pénicilline/Streptomycine (*Gibco*). Les cellules de patients sont cultivées de la même façon que les précédentes.

Lorsque les cellules arrivent à confluence, elles sont détachées par une incubation de 3 minutes à 37°C avec 1 ml de trypsine-EDTA 0,5% (*Difco, Detroit, MI, USA*) ; EDTA 0,2% ; PBS ; pH 7,6). Elles sont ensuite récupérées dans 10 ml d'EGM-2 et centrifugées 5 minutes à 1000 rpm. Le culot de cellules est resuspendu dans du milieu frais. La suspension est alors répartie dans de nouvelles flasques (*CELLSTAR, Greiner Bio-One, Frieckenhausen, Allemagne*) contenant du milieu complet. Les boîtes sont incubées à 37°C sous une atmosphère de 5% en CO₂.

3. Tests fonctionnels

3.1 Test de prolifération au BrdU

Cette méthode de quantification de la prolifération cellulaire est basée sur la mesure de la quantité de 5-bromo-2-déoxyuridine (BrdU), analogue de la thymine, incorporée au sein de l'ADN néosynthétisé. Cette quantification est effectuée grâce au kit Cell Proliferation ELISA, BrdU Colorimetric (Roche, Mannheim, Allemagne).

Les cellules sont semées dans des puits de plaques 96 puits (*CELLSTAR, Greiner Bio-One, Frieckenhausen, Allemagne*) à raison de 8000 cellules par puits dans 100 µl d'EGM2. Après 24h, les cellules sont sevrées de leur milieu de culture (riche en sérum et facteurs de croissances) dans un milieu pauvre, l'EBM2 supplémenté de 0,5% de FBS. Après 16 heures dans ce milieu appauvri, les cellules sont traitées avec 50 ng/ml de VEGF-A165, 2 ng/ml de BMP9 et une combinaison des 2 traitements dans 100 µl d'EBM2 à 37°C. Six heures après, les cellules sont mises en présence de 10 µM de BrdU (dilué

100x). Après 24 heures de stimulation, le milieu de culture est éliminé, les cellules sont fixées et l'ADN dénaturé en ajoutant 200 µl de Fix Denat pendant 30 minutes à température ambiante. La dénaturation de l'ADN est nécessaire afin de rendre le BrdU accessible aux anticorps. Les cellules sont ensuite incubées 90 minutes à température ambiante en présence de 100 µl d'anticorps anti-BrdU. Elles sont alors lavées trois fois dans 200 µl de tampon de lavage, puis incubées avec 100 µl de substrat pendant 5 à 30 minutes à température ambiante. La plaque est lue au luminomètre/fluorimètre (Wallace Victor 1420 Multilabel counter) à 370 nm. Les valeurs d'absorbance obtenues sont proportionnelles à la quantité d'ADN synthétisé et, par conséquent, au nombre de cellules qui ont proliféré.

3.2 Test de migration

Les cellules HUVEC sont semées au nombre de 80 000 dans des plaques 48 puits (*CELLSTAR, Greiner Bio-One, Frieckenhaussen, Allemagne*) dans 500 µl d'EGM2. A l'arrière de la boîte, sur la face extérieure, quatre traits équidistants et parallèles sont tracés et serviront de repère lors de la mesure du *scratch*. Après 24h, les cellules sont sevrées de leur milieu de culture (riche en sérum et facteurs de croissances) dans un milieu pauvre, l'EBM2 supplémenté de 0,5% de FBS. Après 16 heures dans ce milieu appauvri, une cicatrice est réalisée dans le tapis cellulaire perpendiculairement aux traits repères. Les cellules sont lavées au PBS 1X et sont traitées avec 50 ng/ml de VEGF-A165, 2 ng/ml de BMP9 et une combinaison des 2 traitements dans 300 µl d'EBM2 à 37°C. La largeur de la cicatrice est alors mesurée aux différents temps souhaités grâce à un objectif gradué.

3.3 Test de tubulogénèse

Les cellules HUVEC sont semées au nombre de 7000 cellules dans des plaques 96 puits (*CELLSTAR, Greiner Bio-One, Frieckenhaussen, Allemagne*) dans 100µl d'EGM2. Les puits de ces plaques ont préalablement été remplis avec 35µl de gel (*Matrigel Matrix 3D, Corning, NY, USA*). Ce gel permet de recréer l'environnement extracellulaire des cellules endothéliales afin de leur permettre de former un pseudo-réseau de capillaires. Les cellules sont semées et traitées en même temps à l'aide de 2ng/ml de BMP9 dans 100µL d'EBM2 à 37°C. Après 24 heures, un réseau s'est plus ou moins bien formé en fonction des conditions et des photos sont prises. Les branchements entre cellules sont alors comptés et analysés à l'aide d'ImageJ.

4. Immunofluorescence

Les cellules sont semées dans des puits d'une plaque 24 puits (*CELLSTAR, Greiner Bio-One*, Frieckenhausen, Allemagne) contenant des *coverslips* (*Microscope cover glasses, Thermo Scientific*, Waltham, MA, USA) « coatés » à la gélatine, à raison de 40 000 cellules par puits dans 1 ml d'EGM2. Après 24h, les cellules sont sevrées de leur milieu de culture (riche en sérum et facteurs de croissances) dans un milieu pauvre, l'EBM2 supplémenté de 0,5% de FBS. Après 16 heures dans ce milieu appauvri, elles subissent des traitements avec 50 ng/ml de VEGF-A165, 2 ng/ml de BMP9 et une combinaison des 2 traitements pendant 5 à 15 minutes dans 500µL d'EBM2 à 37°C. L'activité cellulaire est stoppée en plaçant les cellules sur glace. Elles sont alors rincées au PBS 1X et fixées dans 1 ml de paraformaldéhyde 1% pendant 30 minutes. Après deux lavages au PBS 1X, les cellules sont bloquées pendant 30 minutes dans une solution de PBS 1X ; BSA 5%. Lorsque l'on veut marquer des structures intracellulaires comme les endosomes, cette solution est additionnée de saponine 0,5%. La saponine est un détergent doux qui perméabilise la membrane cellulaire afin de permettre le marquage des compartiments intracellulaires sans les détruire. Les cellules sont ensuite incubées pendant 1 heure à température ambiante avec l'anticorps primaire ou avec deux anticorps primaires lorsque l'on veut étudier la colocalisation de deux protéines, dilués dans une solution de PBS 1X ; BSA 0,5% qui contient également le DAPI (1/500). Le DAPI (*4',6'-diamidino-2-phénylindole*) est une molécule fluorescente qui se lie spécifiquement à l'ADN. Après trois lavages de 5 minutes au PBS 1X, les cellules sont incubées 1 heure à température ambiante, à l'obscurité, avec les anticorps secondaires couplés à des fluorochromes. Les cellules subissent à nouveau trois lavages de 5 minutes avec du PBS 1X, suivi d'un dernier lavage avec de l'eau. Les cellules marquées sont ensuite fixées sur lame par 4 µl de prolong (*Prolong gold antifade reagent, Invitrogen*, Carlsbad, CA, USA). Les marquages sont visualisés avec un microscope confocal (*Leica TCS SP5, Leica-microsystems*, Wetzlar, Allemagne).

5. Proximity Ligation Assay

La technologie *duolink* a été élaborée par la firme suédoise *Olink Bioscience* (Uppsala, Sweden) et permet de mettre en évidence l'interaction entre deux protéines in situ, distantes de moins de 40 nm. Cette méthode est basée sur le principe du *Proximity Ligation Assay* (PLA). Les deux protéines sont reconnues par deux anticorps primaires

appartenant à deux espèces différentes. Deux types d'anticorps secondaires conjugués à un oligonucléotide et nommés sondes PLA, plus et minus, se lient à leur anticorps primaire spécifique. Une étape de ligation permet de joindre les deux oligonucléotides qui forment alors un cercle fermé. Ensuite, une des deux sondes PLA sert de *primer* à l'amplification en rolling circle dont le cercle d'ADN fermé est la matrice. Des oligonucléotides marqués avec un fluorochrome peuvent alors s'hybrider sur le produit de l'amplification et être révélés au microscope à fluorescence. Chaque point visualisé correspond à une interaction protéine-protéine. Nous avons utilisé le kit *Duolink® II Fluorescence*.

Les cellules HUVEC sont semées dans des puits d'une plaque 24 puits (*CELLSTAR, Greiner Bio-One*, Frieckenhausen, Allemagne) contenant des *coverslips* (*Microscope cover glasses, Thermo Scientific*, Waltham, MA, USA) lavés à l'acide et coatés à la gélatine à raison de 40 000 cellules/puits dans 1 ml d'EGM2. Après 24h, les cellules sont sevrées de leur milieu de culture (riche en sérum et facteurs de croissances) dans un milieu pauvre, l'EBM2 supplémenté de 0,5% de FBS. Après 16 heures dans ce milieu appauvri, elles subissent des traitements avec 50 ng/ml de VEGF-A165, 2 ng/ml de BMP9 et une combinaison des 2 traitements pendant 5 à 10 minutes dans 500µL d'EBM2 à 37°C. L'activité cellulaire est stoppée en plaçant les cellules sur glace. Elles sont alors rincées au PBS 1X et fixées dans 2 ml de paraformaldéhyde 1% pendant 30 minutes. Les cellules sont traitées avec une solution de blocage pendant 30 minutes à 37°C. Les deux anticorps primaires sont incubés 1h à RT. Les échantillons sont ensuite lavés deux fois 5 minutes dans une solution de lavage A. Les anticorps secondaires couplés aux sondes PLA sont alors incubés 1 heure à 37°C en présence de DAPI. La solution contenant les anticorps secondaires est éliminée et les cellules sont rincées deux fois 5 minutes avec la solution de lavage A sous légère agitation. Ensuite, les deux sondes PLA sont liguées afin de former un cercle d'ADN fermé grâce à une ligase pendant 30 minutes d'incubation à 37°C. Les échantillons sont rincés deux fois 2 minutes avec la solution de rinçage A. Après cela, le cercle d'ADN fermé subit une étape d'amplification par *rolling circle* durant 100 minutes à 37°C. Les cellules sont alors lavées deux fois 10 minutes dans une solution de lavage B 1X avant un dernier lavage de 1 minute dans la même solution diluée 100 fois. Les *coverslips* sont séchés et fixés sur lame par 4 µl de prolong (*Prolong gold antifade reagent, invitrogen, Carlsbad, CA, USA*). Après 15 minutes, les échantillons peuvent être analysés au microscope à fluorescence (*NIKON eclipse 90i*, Tokyo, Japon).

6. Préparation des extraits protéiques

Les protéines sont extraites à partir des cellules HUVEC semées sur des plaques 6 puits (CELLSTAR, Greiner Bio-One, Frickenhausen, Allemagne) au nombre de 150 000 cellules/puits dans 2ml d'EGM2. Après 24h, les cellules sont sevrées de leur milieu de culture (riche en sérum et facteurs de croissances) dans un milieu pauvre, l'EBM2 supplémenté de 0,5% de FBS. Après 16 heures dans ce milieu appauvri, elles sont traitées avec 50 ng/ml de VEGF-A165, 2 ng/ml de BMP9 et une combinaison des 2 traitements pendant 5 à 30 minutes dans 1ml d'EBM2 à 37°C. Le milieu de culture est éliminé et les cellules sont rincées deux fois avec du PBS froid. Les cellules sont alors lysées dans 35 µl de solution de lyse (RIPA + octylglucoside et inhibiteurs de protéases et phosphatases). Le lysat est transféré dans un tube eppendorf, puis centrifugé à 4°C pendant 10 minutes à 10 000 rpm (Sigma, type 1-15, Fisher Bioblock Scientific, Belgique). Le surnageant contenant les protéines est récupéré et conservé à -20°C.

La concentration en protéines des échantillons est déterminée par la méthode de Bradford à l'aide du Kit BCA assay (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA). La mesure de l'absorbance à 595 nm est effectuée à l'aide d'un spectrophotomètre. La concentration en protéines est évaluée en se rapportant à une droite étalon réalisée à partir de concentrations connues en BSA (Bovine Serum Albumin) (Pierce, Rockford, USA).

7. Western blotting

Les différents extraits protéiques, préalablement dosés, sont séparés sur un gel de polyacrylamide dénaturant SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*). Pour cela, chaque puits est chargé avec la même quantité de protéines, auparavant dénaturées 5 minutes à 100°C dans du tampon de chargement. La migration s'effectue à 150 Volt dans du tampon d'électrophorèse. Lorsque les protéines sont séparées, elles sont transférées sur une membrane hydrophobe de PVDF (*PolyVinylidène DiFluoride*) (*Immobilon-P, Millipore, Bedford, U.S.A*) à 4°C, pendant 2 heures, à 385 mA, dans un tampon de transfert. La membrane a été préalablement activée par un bain de 30 secondes dans du méthanol, suivi d'un bain de 5 minutes dans de l'eau désionisée, pour terminer par un bain de 5 minutes dans le tampon de transfert.

Lorsque les protéines ont été transférées sur la membrane, celle-ci est saturée pendant une heure à température ambiante dans une solution contenant 8% de poudre de lait diluée dans du TBS 1X-Tween 20 0,1%. La membrane est ensuite hybridée avec

l'anticorps primaire dilué dans une solution de TBS 1X; lait 0,8 % ; Tween 20 0,1% pendant toute la nuit à 4°C avec agitation. Elle est alors lavée trois fois 15 minutes dans une solution de TBS 1 X, Tween 20 0,1%. Elle est ensuite incubée pendant 1 heure avec l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase dilué dans une solution de lait 0,8% ; TBS 1X ; Tween 20 0,1%. Elle subit à nouveau trois lavages de 15 minutes dans du TBS 1X ; Tween 20 0,1% suivis d'un dernier lavage dans du TBS 1X pendant 15 minutes également. La révélation par chémoluminescence est effectuée à l'aide du kit ECL (*Thermo Fisher Scientific*, Rockford, IL, USA) ou avec le kit ECL plus (*Thermo Fisher Scientific*, Rockford, IL, USA) sur film Fuji medical X-ray (*Fuji*, Clichy, France). En présence de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), la peroxydase (HRP) catalyse la réaction d'oxydation du luminol. Cette réaction émet une chémoluminescence qui sera détectée sur le film photographique.

8. Biotinylation des protéines de surface

L'expérience de biotinylation des protéines de surfaces nécessite de semer des cellules dans des flasques de 75 cm² (CELLSTAR, Greiner Bio-One, Frickenhausen, Allemagne) à raison de 1 500 000 cellules/flasques dans 10 ml d'EGM2. Après 24h, les cellules sont sevrées de leur milieu de culture (riche en sérum et facteurs de croissances) dans un milieu pauvre, l'EBM2 supplémenté de 0,5% de FBS.

Après les 16 heures de sevrage, les HUVEC sont traitées avec 2mg/ml de biotine clivable (EZ-LINK Sulfo-NHS-SS-Biotin, Thermo Fischer Scientific, Rockford, IL, USA) dans du PBS pendant 30 minutes à 4°C. Les cellules sont alors rincées deux fois au PBS 1x froid et ensuite traitées avec 50 ng/ml de VEGF-A165, 2 ng/ml de BMP9 et une combinaison des 2 traitements dans 5 ml d'EBM2 pendant 15 minutes à 37°C. Les cellules sont ensuite incubées deux fois, 20 minutes avec une solution de glutathion (GSH, Sigma Aldrich, Saint-Louis, Missouri, USA). Cette étape permet la libération des biotines étant toujours présente à la surface des cellules.

Les cellules sont lysées dans 500 µl d'une solution de lyse (RIPA + octylglucoside et inhibiteurs de protéases et phosphatases). Les protéines biotinylées sont immunoprécipitées à l'aide de billes d'agarose « coatées » avec de la streptavidine (Pierce™ Streptavidin Agarose, Thermo Fischer Scientific, Rockford, IL, USA) pendant 2 heures à 4°C avec rotation. Ensuite, les billes sont soumises à trois lavages à l'aide de solution de lyse et les protéines ainsi récupérées sont analysée par SDS-PAGE et Western Blotting.

9. Analyse quantitative du niveau d'expression de gènes par qRT-PCR

La PCR quantitative en temps réel (qRT-PCR) est une technique permettant de quantifier les ARN messagers et les micro-ARN présents au sein d'une population de cellules. L'expérience est réalisée en trois étapes : l'extraction des ARNm et des miARN cellulaires, la transcription inverse des ARN totaux en ADN complémentaires (ADNc) et la PCR quantitative en temps réel. La quantification de l'expression d'un gène ou d'un micro-ARN est basée sur la détection de la quantité de produits générés après chaque cycle de PCR. Cette PCR quantitative est réalisée en présence de SYBR green, un agent intercalant qui émet de la fluorescence lorsqu'il s'intercale dans de l'ADN double-brin. La fluorescence est mesurée après chaque étape d'amplification permettant l'établissement de courbes d'amplification. Ces courbes sont proportionnelles à la quantité d'ARNm initialement présents dans l'échantillon.

9.1 Extraction des ARN messagers et des miRs

Les ARN sont extraits à partir des cellules HUVEC semées sur des flasques de 25 cm² (CELLSTAR, Greiner Bio-One, Frieckenhausen, Allemagne) dans 4 ml à raison de 150 000 cellules/puits dans 2ml d'EGM2. Après 24h, les cellules sont sevrées de leur milieu de culture (riche en sérum et facteurs de croissances) dans un milieu pauvre, l'EBM2 supplémenté de 0,5% de FBS. Après 16 heures dans ce milieu appauvri, elles sont traitées avec 50 ng/ml de VEGF-A165, 2 ng/ml de BMP9 et une combinaison des 2 traitements pendant 6h et 24h à 37°C. Le milieu de culture est éliminé et les cellules sont rincées une fois au PBS 1x. Les ARN totaux des HUVEC sont extraits grâce au kit miRNeasy (Qiagen).

9.2 Transcription inverse

9.2.1 Transcription inverse des ARNm

La transcription des ADNc est réalisée grâce au kit « *cDNA Synthesis Kit* » (Bio-Rad). Les échantillons contenant 500 ng d'extraits d'ARN sont mélangés à 4 µL de 5x *iScript reaction mix*, 1 µL d'*iScript reverse transcriptase* ainsi qu'à de l'eau afin d'obtenir un volume final de 20 µl. Le mélange est ensuite placé dans un thermocycleur (Westburg) où il va subir un programme en 3 étapes : d'abord 5 minutes à 25°C, ensuite 30 minutes à 42°C pour effectuer la transcription inverse et, enfin, 5 minutes à 85°C permettant de dénaturer la reverse transcriptase. Ensuite, 80 µL d'eau sont ajoutés pour atteindre une

concentration finale de 50 ng/μl en ADNc. Les échantillons sont conservés à -20°C jusqu'à leur utilisation.

9.2.2 Transcription inverse de miRs

La transcription inverse de micro-ARN est réalisée à l'aide du kit « qScript™ microRNA cDNA Synthesis » (*Quanta BioSciences*). Cette méthode se déroule en deux étapes. La première étape consiste à ajouter, aux miARN, une queue poly(A). Pour ce faire, 200 ng d'extraits d'ARN sont mis en solution avec 1 μl de polymérase poly(A), 2 μl de « poly(A) Tailing Buffer » et de l'eau pour obtenir un volume final de 10 μl. La réaction de polyadénylation est réalisée au sein d'un thermocycleur (*Westburg*) permettant l'incubation du mélange 60 minutes à 37 °C suivi de 5 minutes à 70 °C. La deuxième étape consiste à réaliser une transcription inverse à partir de la queue poly(A). Cette étape sera possible grâce à l'ajout d'une amorce oligo-dT spécifique de cette queue qui est également prolongée par une séquence spécifique en 5'. Cette dernière servira d'adaptateur au primer universel antisens lors de la qPCR. De telle manière, 9 μl de « microRNA cDNA Reaction Mix » et 1 μl de « qScript Reverse Transcriptase » sont ajoutés au volume réactionnel précédent. Les échantillons sont alors incubés pendant 20 minutes à 42 °C suivi de 5 minutes à 85 °C. Finalement, 180 μl d'eau sont ajoutés pour atteindre une concentration en ADNc de 1 ng/μl. Les échantillons sont stockés à -20 °C.

9.3 PCR quantitative en temps réel par la méthode du SYBR Green

9.3.1 La qPCR des ARN messagers

La qRT-PCR est réalisée dans une plaque 384 puits (*Thermo Scientific*), à raison de 10 ng d'ADNc par puits. A ceux-ci sont ajoutées les amorces nécessaires à l'amplification du gène d'intérêt à une concentration de 150 nM ainsi que le SensiMix SYBR Hi-ROX (*Bioline*), qui comporte une *HotStart DNA polymerase*, les dNTP, du MgCl₂, ainsi que le SYBR green.

La lecture de la plaque est réalisée à l'aide du thermocycleur ABI 7900HT (*Applied Biosystems*). La plaque est soumise à une préincubation de 2 minutes à 50°C. Ensuite, elle est chauffée à 95°C durant 10 minutes de manière à activer l'ADN polymérase. Quarante cycles de PCR sont alors réalisés. Ceux-ci comprennent une phase de dénaturation de l'ADN, 15 secondes à 95°C, suivie d'une phase d'hybridation et d'élongation des amorces, 1 minute à 60°C.

Deux contrôles négatifs sont effectués. Le premier consiste à remplacer, lors du chargement de la plaque de qRT-PCR, l'échantillon par de l'eau. Ce contrôle permet de détecter la dimérisation éventuelle des amorces. Le second contrôle permet de charger des échantillons d'ARN n'ayant pas subi l'étape de transcription inverse, de manière à s'assurer de l'absence d'amplification d'ADN génomique.

Après chaque étape d'élongation, le thermocycleur mesure la fluorescence des différents puits. Après 40 cycles de PCR, un CT (*Cycle Threshold*) est déterminé pour chaque échantillon. Ce seuil correspond au nombre de cycles nécessaires pour que la fluorescence dépasse une valeur seuil.

La normalisation des différents échantillons est effectuée grâce à l'utilisation des gènes *ppia* et *β 2M* humains. Le niveau d'expression d'un ARNm est enfin calculé par la formule 2-delta deltaCT (Livak and Schmittgen 2001) qui permet de normaliser la quantité d'ADNc présente initialement dans les échantillons.

9.3.2 La qPCR des miRs

Le principe de base est le même que pour la PCR quantitative des ARN messagers mais diffère par quelques points repris ci-dessous.

La qRT-PCR est réalisée dans une plaque 384 puits (*Thermo Scientific*). Chaque puits contient 12 μ l de milieu réactionnel contenant 6 μ l de « MasterMix » (*Eurogentec*), 0,5 μ l de primer antisens universel (10 μ M), 0,5 μ l de primer spécifique du miRNA étudié (10 μ M) et 3 μ l d'eau.

La lecture de la plaque est réalisée à l'aide du thermocycleur ABI 7900HT (*Applied Biosystems*). La plaque est soumise à une préincubation de 2 minutes à 50°C. Ensuite, elle est chauffée à 95°C durant 10 minutes de manière à activer l'ADN polymérase. Quarante cycles de PCR sont alors réalisés. Ceux-ci comprennent une phase de dénaturation de l'ADN, 5 secondes à 95°C, suivie d'une phase d'hybridation et d'élongation des amorces pendant 15 secondes à 60°C, et finalement une phase d'élongation durant 15 secondes à 70°C. Après 40 cycles de PCR, le Ct est déterminé pour chaque échantillon. La normalisation est effectuée à l'aide des gènes SNORD44 et SNORD48.

10. Les séquences oligonucléotidiques

Séquence des amorces utilisées pour la PCR quantitative des ARN messagers

Nom	Amorces sens	Amorces anti-sens
<i>hsa PPIA</i>	5'-CCAACACAAATGGTTCCCAGT-3'	5'-CCATGGCCTCCACAATATTCA-3'
<i>hsa β2M</i>	5'-GAGTATGCCTGCCGTGTG-3'	5'-AATCCAAATGCGGCATCT-3'
<i>hsa ALK1</i>	5'-CGAGGGATGAACAGTCCTGG-3'	5'-GTCATGTCTGAGGCGATGAAG-3'
<i>hsa Smad 1</i>	5'-CTCATGTCATTTACTGCCGTGT-3'	5'-TATTCGCTGTGTCTTGGAACC-3'
<i>hsa Smad 4</i>	5'-CTCATGTGATCTATGCCCGTC-3'	5'-AGGTGATACAACCTCGTTTCGTAGT-3'
<i>hsa ID-1</i>	5'-CTGCTCTACGACATGAACGG-3'	5'-GAAGGTCCCTGATGTAGTCGAT-3'
<i>hsa PTEN</i>	5'-TGGATTGACTTAGACTTGACCT-3'	5'-GGTGGGTTATGGTCTTCAAAGG-3'
<i>hsa VEGF-A</i>	5'-AGGGCAGAATCATCACGAAGT-3'	5'-AGGGTCTCGATTGGATGGCA-3'

Séquence des amorces utilisées pour la PCR quantitative des miRs

Amorce sens	Séquence
<i>SNORD44</i>	5'-GCAAATGCTGACTGAACATGAA-3'
<i>SNORD48</i>	5'-CTCTGAGTGTGTCGCTGATGC-3'
<i>hsa-miR205</i>	5'-TCCTTCATTCCACCGGAGTC-3'
<i>Amorce universelle antisens</i>	5'-GCATAGACCTGAATGGCGGTA-3'

11. Statistiques

Toutes les expériences sont réalisées au minimum trois fois. Les valeurs sont représentées sous formes de moyennes \pm la déviation standard (SD). Les différentes conditions sont comparées à l'aide du test de Student. Lorsqu'une comparaison multiple entre les différentes conditions est nécessaire, le modèle général linéaire accompagné d'un test *post-hoc* de Fisher LSD est appliqué.

Résultats

Première partie : Impact du BMP9 dans l'angiogenèse induite par le VEGF

1. Etude de l'interaction des récepteurs

1.1 Etude de l'interaction entre VEGFR2 et les récepteurs de la superfamille du TGF- β

Au sein du laboratoire, nous avons à plusieurs reprises étudié les interactions entre récepteurs. De telle manière Bajou et Herkenne ont mis en évidence l'interaction entre le fragment de 16 kDa de la prolactine (PRL 16K) et PAI-1 mais également entre l'uPAR (*urokinase plasmin activator receptor*) et différents récepteurs membranaires tels que le VEGFR2 et les intégrines (Bajou et al. 2014; Herkenne et al. 2015). La technique utilisée pour étudier la formation de ces complexes à la surface des cellules endothéliales est basée sur le test de *Proximity Ligation Assay* (PLA).

De la même manière, nous avons testé notre hypothèse de départ concernant un possible crosstalk entre la voie du VEGF et celle de la famille du TGF- β en évaluant si le VEGFR2 pouvait se retrouver dans un même complexe que le TGF β RII, l'ALK5, l'ALK1 et l'endogline. La PLA a été réalisée sur des HUVECs non perméabilisées mais préalablement traitées 10 minutes à l'aide de 50 ng/mL de VEGF. La figure montre que lorsque les cellules endothéliales sont traitées au VEGF, la formation d'un complexe entre le VEGFR2 et le TGF β RII, entre VEGFR2 et l'ALK1, entre VEGFR2 et l'endogline et dans une moindre mesure entre le VEGFR2 et l'ALK5 est induite (**Figure 23**).

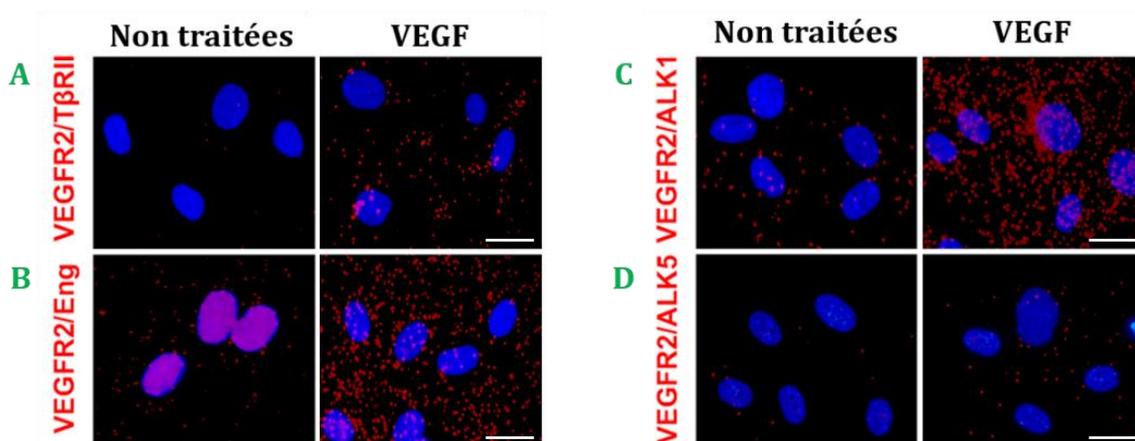


Figure 23 : Le VEGF-A₁₆₅ induit la formation d'un complexe entre VEGFR2 et TGFβRII, Endogline, ALK1 et ALK5. (A) Colocalisation du VEGFR2 avec le TGFβRII à la surface des HUVECs traitées ou non avec du VEGF-A₁₆₅ à une concentration de 50 ng/mL. (B) Colocalisation du VEGFR2 avec l'endogline à la surface des HUVECs traitées ou non avec du VEGF-A₁₆₅ 50 ng/mL. (C) Colocalisation du VEGFR2 avec ALK1 à la surface des HUVECs traitées ou non avec du VEGF-A₁₆₅ 50 ng/mL. (D) Colocalisation du VEGFR2 avec ALK5 à la surface des HUVECs traitées ou non avec du VEGF-A₁₆₅ à une concentration de 50 ng/mL. Les expériences ont été réalisées au minimum trois fois de manière indépendante. Des contrôles ont été réalisés afin de déterminer la spécificité des interactions.

1.2 VEGF et BMP9 modulent l'interaction entre VEGFR2 et ALK1

Comme mentionné précédemment, le BMP9 apparaît comme le facteur prépondérant de la superfamille du TGF-β dans HHT, nous nous sommes donc focalisé sur l'étude de ce ligand et de son récepteur de type I, ALK1.

La figure précédente (C) montre que lorsqu'on traite les HUVECs avec le VEGF-A₁₆₅, un complexe entre le VEGFR2 et ALK1 est formé. Nous nous sommes ensuite demandé quel serait l'impact du BMP9 sur cette interaction. Nous avons donc traité les cellules avec du VEGF-A₁₆₅ 50 ng/ml seul, du BMP9 10 ng/ml seul mais également avec une combinaison des deux ligands aux mêmes concentrations que pour les traitements seuls. Les résultats présentés sur la figure 24 semblent montrer, que lorsque le VEGF et le BMP9 sont tous les deux présents, la formation du complexe entre VEGFR2 et ALK1 à la surface des cellules est diminuée en comparaison à la condition où les cellules sont traitées uniquement avec le VEGF-A₁₆₅. Le traitement au BMP9 seul ne semble pas induire cette interaction (**Figure 24**).

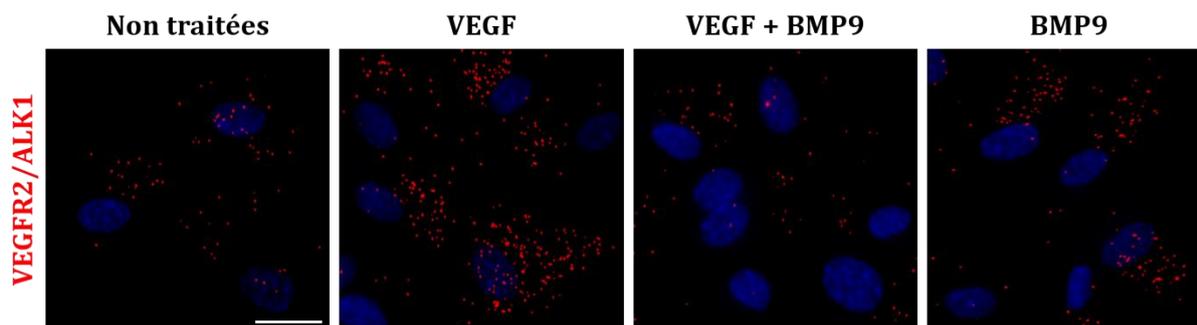


Figure 24 : Le VEGF et le BMP9 modifie la formation du complexe entre le VEGFR2 et ALK1. Colocalisation du VEGFR2 avec ALK1 à la surface des HUVECs traitées avec du VEGF-A₁₆₅ 50 ng/mL, du BMP9 10 ng/ml ou une combinaison des deux traitements.

Ces premiers résultats indiquent que d'une manière ou d'une autre le VEGF et le BMP9 doivent interagir à certains niveaux de leur signalisation. La présence de l'un ou de l'autre à la surface des cellules endothéliales provoque des mouvements de leurs récepteurs qui soit se retrouvent au sein d'un même complexe membranaire soit se séparent.

2. Impact du BMP9 sur les fonctions angiogènes des cellules endothéliales

2.1 Le BMP9 n'influence pas directement la physiologie des HUVECs

Nous nous sommes ensuite intéressés au rôle du BMP9 dans la régulation des fonctions des cellules endothéliales. La littérature concernant ce sujet étant contradictoire nous avons réalisé nos propres expérimentations pour préciser le rôle de ce facteur dans la prolifération, la migration et la tubulogenèse des CEs. Dans un premier temps, la prolifération des HUVECs a été étudiée par incorporation du BrdU. Nous avons choisi de soumettre les cellules à un traitement au BMP9 de deux concentrations différentes, 2 ng/ml et 10 ng/ml. Il apparaît que, seul, le BMP9 n'influence pas la prolifération des HUVECs en comparaison à la condition sans traitement (**Figure 25**). Un test de migration par *scratch assay* donne un résultat similaire. En effet, comme observé sur la figure 25, aucune des deux concentrations utilisées ne modifie significativement la migration des HUVECs.

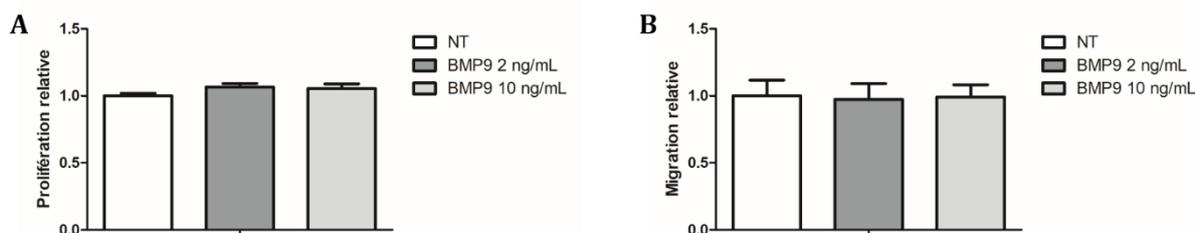


Figure 25 : Les effets du BMP9 sur la prolifération et la migration des HUVECs. (A) La prolifération des HUVECs est analysée par l'incorporation du composé BrdU après un traitement de 24h au BMP9 à du 2 ng/ml ou 10 ng/ml. (B) La migration des cellules est analysée par *scratch assay* après un traitement de 8h avec du BMP9 à 2 ng/ml ou 10 ng/ml. Toutes les données sont représentées sous forme de moyennes +/- SD. Les expériences sont réalisées au minimum trois fois de façon indépendante.

De manière surprenante, il semble que le BMP9 n'ait aucun effet observable sur la prolifération et la migration des HUVECs. Nous nous sommes alors demandé si ce facteur pouvait modifier l'angiogenèse induite par des facteurs stimulant ce processus comme le VEGF et le bFGF.

2.2 BMP9 diminue l'angiogenèse induite par VEGF et bFGF

Le BMP9 n'ayant aucun effet sur la prolifération et la migration des HUVECs, nous avons réalisé les mêmes expériences en combinant un traitement au VEGF- A_{165} et au bFGF avec le BMP9. Les cellules ont donc été traitées avec du VEGF- A_{165} seul, du BMP9 seul et une combinaison des deux traitements simultanément. Les mêmes conditions ont été utilisées avec le bFGF.

Nous avons réalisé un test de prolifération par incorporation du BrdU et nous avons observé que le VEGF induit la prolifération des HUVECs. Néanmoins, lorsque le BMP9 est ajouté à ce traitement, cette induction est fortement diminuée. La même expérience a été réalisée en traitant les HUVECs avec le bFGF et le BMP9. Un résultat similaire a été observé. Ainsi le bFGF induit la prolifération mais l'ajout du BMP9 diminue cette induction (**Figure 26**).

De la même manière, la migration des HUVECs a été analysée par *scratch assay*, sous les mêmes conditions que les tests de prolifération. Les résultats découlant de ces tests sont identiques à ceux obtenu en prolifération. En effet, lorsque le BMP9 est ajouté à un traitement de VEGF- A_{165} ou de bFGF, la migration induite par ces deux facteurs est fortement diminuée (**Figure 26**).

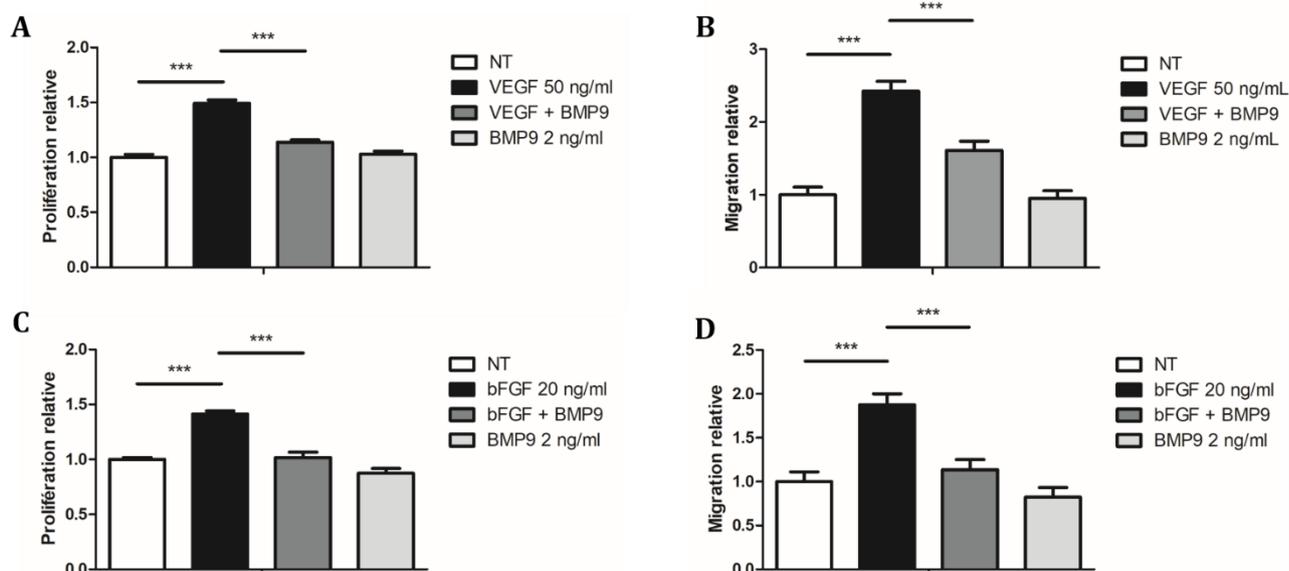


Figure 26 : Le BMP9 diminue la prolifération et la migration induite par le VEGF et le bFGF. (A et B) Analyse de l'effet du BMP9 sur les fonctions angiogènes du VEGF-A₁₆₅. (A) La prolifération des HUVECs est analysée par l'incorporation du composé BrdU après un traitement de 24h au VEGF-A₁₆₅ 50 ng/ml, au BMP9 10 ng/ml ou avec une combinaison des deux traitements. (B) La migration des cellules est analysée par *scratch assay* après un traitement de 8h avec du VEGF-A₁₆₅ 50 ng/ml, du BMP9 10 ng/ml ou avec une combinaison des deux traitements. (C et D) Analyse de l'effet du BMP9 sur les fonctions angiogènes du bFGF. (C) La prolifération des HUVECs est analysée par l'incorporation du composé BrdU après un traitement de 24h au bFGF 20 ng/ml, au BMP9 10 ng/ml ou avec une combinaison des deux traitements. (D) La migration des cellules est analysée par *scratch assay* après un traitement de 8h avec du VEGF-A₁₆₅ 50 ng/ml, du BMP9 10 ng/ml ou avec une combinaison des deux traitements. Dans les diagrammes, les données sont représentées sous forme de moyennes, +/- SD. Les expériences sont réalisées au minimum trois fois de façon indépendante. *** p<0,001

Afin de synthétiser les effets observés en prolifération et en migration, nous avons réalisé un test de tubulogénèse. Cette expérience permet d'analyser la capacité des cellules endothéliales à former des tubes au sein d'une matrice appelée matrigel. Dans le cadre de ce test, les cellules ont uniquement été traitées au BMP9 car le matrigel utilisé contient déjà du VEGF et du bFGF. Comme montré dans la **figure 27**, le BMP9 diminue la formation des tubes par les cellules endothéliales.

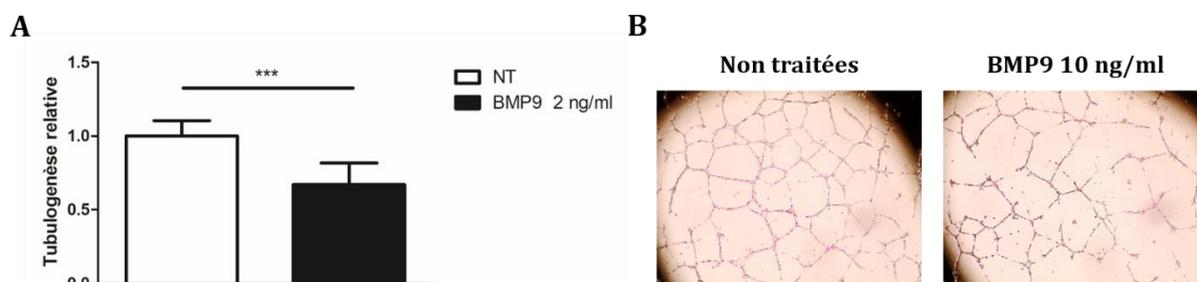


Figure 27 : Le BMP9 diminue la tubulogénèse des HUVEC. La capacité des cellules endothéliales à former des tubes dans une matrice riche en VEGF et bFGF (Matrigel) permet de mimer l'angiogénèse. L'analyse de la tubulogénèse est réalisée par comptage des branchements entre les cellules (prise de photos) après 24h de traitement au BMP9 10ng/ml. (A) Graphique représentant la tubulogénèse relative des HUVECs avec ou sans traitements au BMP9. (B) Exemple de photos prises pour le comptage des branchements à l'aide d'ImageJ. Dans les diagrammes, les données sont représentées sous forme de moyennes, +/- SD. Les expériences sont réalisées au minimum trois fois de façon indépendante. *** p<0,001

Ces résultats suggèrent donc que le BMP9 soit un facteur régulant, *in vitro*, négativement l'angiogenèse induite par le VEGF et le bFGF. Afin de ne pas s'éloigner de l'objectif de cette thèse et comme notre laboratoire a déjà beaucoup étudié le VEGF, nous avons décidé de laisser mettre la partie sur le bFGF en suspens et de se focaliser sur le premier facteur.

2.3 BMP9 n'est plus capable de réguler négativement l'angiogenèse induite par VEGF dans les cellules de patients HHT2

Un des buts du projet est de mieux comprendre ce qui se passe au niveau des cellules endothéliales chez les patients atteints de la télangiectasie hémorragique héréditaire. Dans ce but, nous avons collaboré avec le Dr. Botella (Universidad Complutense de Madrid). Elle nous a fourni des cellules HUVECs provenant de patients atteints de HHT de type 2. Les cellules qui nous ont été fournies proviennent de deux patients différents présentant 2 mutations différentes. Les premières présentent une mutation faux-sens sur l'exon 10 qui est due au remplacement de l'arginine 479 en glutamine du gène *Acvrl1*. Les deuxièmes possèdent également une mutation faux-sens provoquée par le changement de l'arginine 67 en glutamine sur l'exon 5 du gène *Acvrl1*.

Le test de migration par *scratch assay* est un test parfaitement maîtrisé au sein du laboratoire et fournissant des résultats reproductible. La quantité de cellules de patients disponibles étant faible, nous avons décidé de réaliser ce test en premier. Comme la figure 28 le montre, VEGF-A₁₆₅ seul induit toujours la migration des cellules endothéliales. Cependant, le traitement combinant le VEGF et le BMP9 ne montre pas de différence comparé à la condition VEGF (**Figure 28**). Le BMP9 n'est donc plus capable de diminuer la migration induite par le VEGF dans les cellules de patients souffrant d'HHT2.

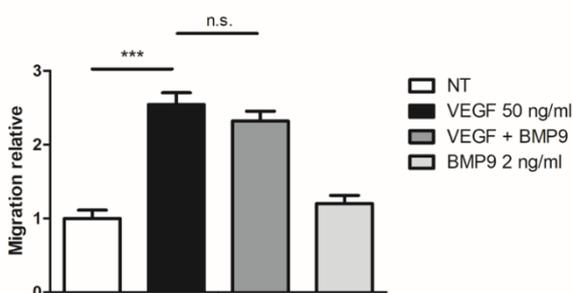


Figure 28 : Le BMP9 n'est pas capable de significativement diminuer la migration induite par le VEGF. La migration des HUVEC provenant de patients souffrant d'HHT2 est analysée par *scratch assay* après un traitement de 8h avec du VEGF-A₁₆₅ 50 ng/ml, du BMP9 10 ng/ml ou avec une combinaison des deux traitements. Dans le diagramme, les données sont représentées sous forme de moyennes, +/- SD. Les expériences sont réalisées au minimum trois fois de façon indépendante. *** p<0,001, n.s. non significatif

Suite à ce résultat intéressant, nous avons décidé d'analyser, à son tour, l'effet du BMP9 sur la prolifération induite par le VEGF dans les cellules mutées. De façon surprenante, aucun effet significatif n'a été observé pour les différents traitements, même

pour le VEGF-A₁₆₅. Afin de mieux comprendre ce résultat divergeant du précédent, nous avons soumis les cellules de patients à un test de tubulogenèse. Comme pour la prolifération, aucune différence significative n'a été observée entre les différents traitements (**Figure 29**).

En allant plus en détail dans l'analyse de la formation des tubes, nous avons remarqué que lorsque nous comparons cette fonction opérée par les cellules de patients et par les HUVECs saines, nous remarquons que la capacité des premières à former un réseau de tubes est fortement diminuée par rapport à celle des deuxièmes (**Figure 29**).

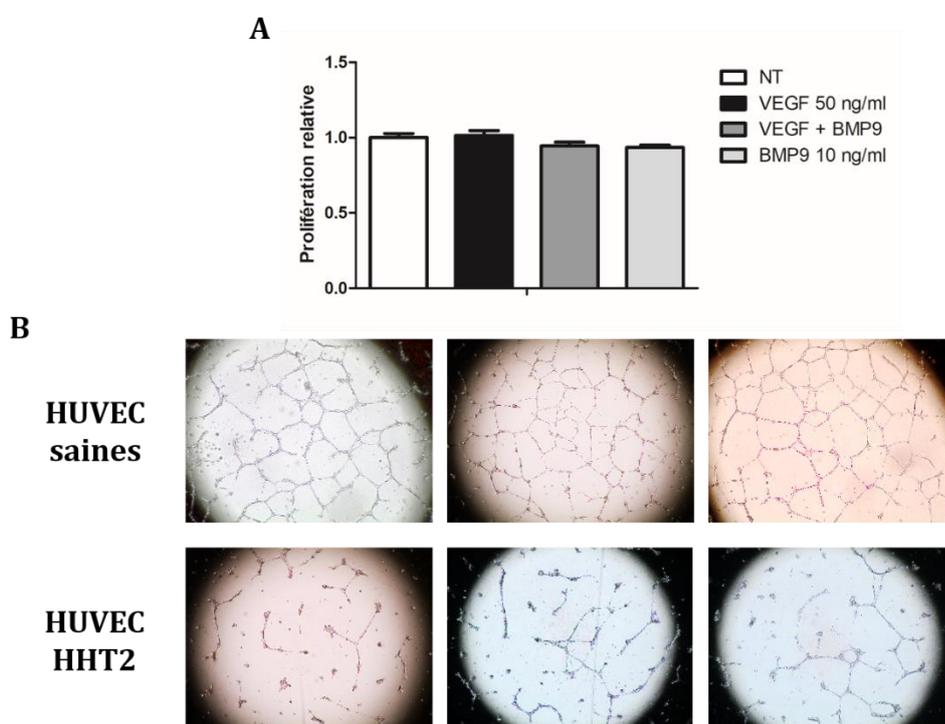


Figure 29 : Les traitements n'ont pas d'effet sur la prolifération des HUVEC mutées qui ne sont plus capables de former un réseau de tubes. . (A) La prolifération des HUVECs HHT2 est analysée par l'incorporation du composé BrdU après un traitement de 24h au VEGF-A₁₆₅ 50 ng/ml, au BMP9 10 ng/ml ou avec une combinaison des deux traitements. (B) Image de tubulogenèse provenant des cellules HUVEC saines (photos du haut) et HHT2 (photos du bas) non traitées. Objectif 10x. Dans le diagramme, les données sont représentées sous forme de moyennes, +/- SD. Les expériences sont réalisées au minimum trois fois de façon indépendante.

3. Etude des voies de signalisation impliquées

3.1 VEGF-A₁₆₅ et BMP9 modulent la phosphorylation des ERK1/2 et des SMAD1/5

Comme il a été mentionné dans l'introduction, le VEGF-A₁₆₅ se fixe sur son récepteur membranaire, le VEGFR2, induit sa dimérisation et sa phosphorylation au niveau de plusieurs résidus tyrosine. Cette activation permet alors le recrutement et la

phosphorylation de divers effecteurs cytoplasmiques permettant l'activation de différentes voies de signalisation. La transduction du signal induit par le VEGF permet la régulation des fonctions de cellules endothéliales. Parmi les voies de signalisation induites par le VEGF-A₁₆₅, celle d'ERK1/2 est une des plus importantes. Elle est notamment impliquée dans la régulation de la prolifération et de la migration des HUVECs.

Afin d'expliquer les effets négatifs du BMP9 sur l'angiogenèse induite par le VEGF, nous avons d'abord investigué son effet sur la phosphorylation du premier intermédiaire dans la transduction du signal du VEGF, le VEGFR2. Les HUVECs ont donc été traitées avec 50 ng/ml de VEGF-A₁₆₅, qui comme montré sur la figure 30 induit la phosphorylation du VEGFR2. Elles ont également été traitées avec 10 ng/ml de BMP9. Ce facteur ne semble pas influencer seul la phosphorylation de ce récepteur. Enfin, comme pour les tests fonctionnels, les HUVECs ont également été traitées avec une combinaison de 50 ng/ml de VEGF et 10 ng/ml de BMP9. Ce troisième traitement ne modifie pas significativement la phosphorylation du VEGFR2 (**Figure 30**).

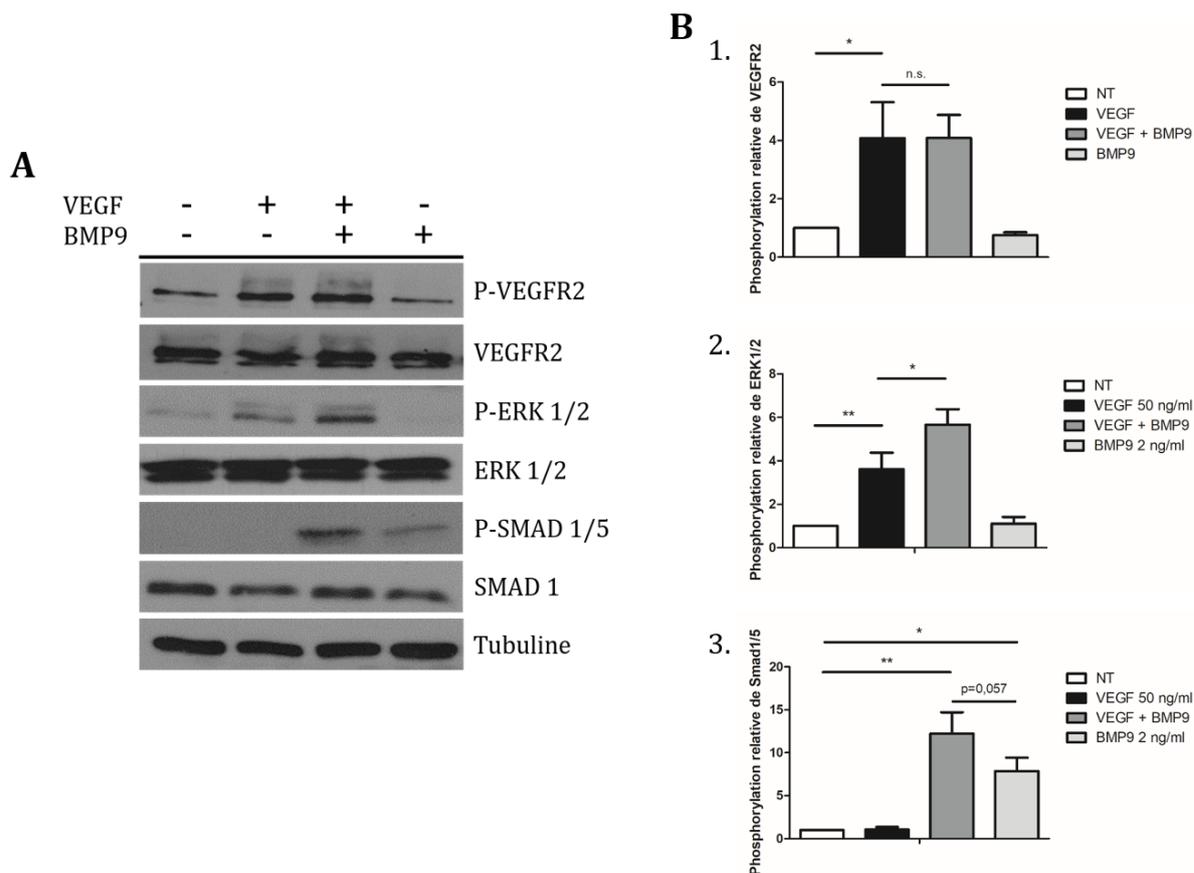


Figure 30 : Le BMP9 influence la phosphorylation d'ERK1/2 induite par le VEGF mais pas celle du VEGFR2. Les protéines des HUVECs traitées 15 minutes au VEGF-A₁₆₅ 50 ng/ml, au BMP9 10 ng/ml et avec la combinaison des deux ont été extraites. Le niveau de phosphorylation du VEGFR2, des ERK1/2 et des SMAD1/5 a été mesuré par western blotting. L'analyse des niveaux totaux du VEGFR2, des ERK1/2, de SMAD1 et de la tubuline ont été utilisés comme contrôle. (A) Western blotting récapitulatif des effets du VEGF-A₁₆₅ et du BMP9 sur les VEGFR2, les ERK1/2, SMAD1/5 et la tubuline. (B) Diagramme représentant l'analyse par densitométrie (ImageJ) de la phosphorylation des protéines VEGFR2 (1.), ERK1/2 (2.) et SMAD1/5 (3.). Dans les diagrammes, les données sont représentées sous forme de moyennes, +/- SD. Les expériences sont réalisées au minimum trois fois de façon indépendante. * p<0,05; ** p<0,01; n.s. non significatif.

Le BMP9 n'ayant pas d'impact direct sur l'activation du VEGFR2, nous nous sommes demandé s'il était capable d'influencer la phosphorylation des ERK1/2. Le VEGF est connu pour induire la phosphorylation de cette voie. Nous l'avons confirmé par western blotting dans lesquels un traitement avec 50 ng/ml de VEGF-A₁₆₅ induit la phosphorylation d'ERK1/2. Le BMP9 seul n'est pas capable d'induire cette activation. Toutefois, lorsque les HUVECs sont soumises au traitement combinant les deux facteurs, un résultat surprenant a été observé. En effet, il semble que le VEGF-A combiné au BMP9 induit une phosphorylation plus importante des ERK1/2 en comparaison à la condition VEGF seule (**Figure 30**).

Afin de vérifier si, inversement, le VEGF-A₁₆₅ peut moduler les voies activées par le BMP9, nous avons analysé son effet sur la phosphorylation des SMAD1/5, la voie canonique activée par ce dernier. L'étude de cette activation par western blotting nous a montré que le VEGF seul n'induit pas la phosphorylation des SMAD1/5 alors que le BMP9 les active déjà après 15 minutes de traitement. A nouveau, lorsque les HUVECs sont soumises au traitement combiné du VEGF-A₁₆₅ et du BMP9, le niveau de SMAD1/5 phosphorylé est plus élevé que celui observé lors du traitement au BMP9 (**Figure 30**).

Une immunohistochimie à l'aide d'anticorps reconnaissant soit Smad1 total, soit la forme phosphorylée de SMAD1/5 a été réalisée. Les résultats présentés sur la figure 31 confirment qu'une stimulation des cellules au BMP9 provoque l'entrée et la phosphorylation des SMAD1 et SMAD1/5 dans le noyau. Le VEGF-A₁₆₅ n'induit aucuns de ces évènements, tout comme la condition sans traitement (**Figure 31**).

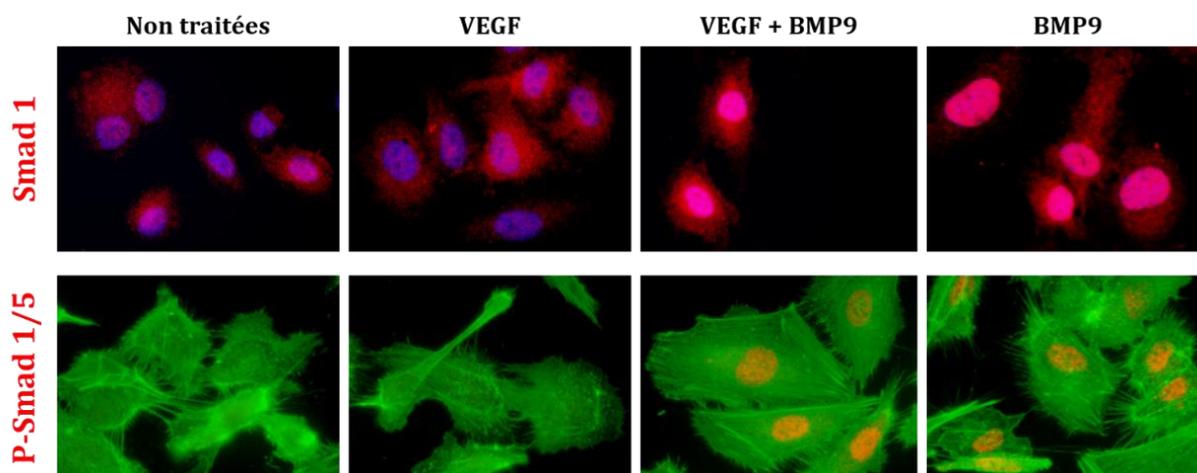


Figure 31 : Le BMP9 stimule l'entrée de SMAD1 dans le noyau des HUVECs et sa phosphorylation. Immunohistochimies SMAD1 (haut) et phospho-SMAD1/5 (bas) réalisées sur les HUVECs préalablement traitées 15 minutes au VEGF-A₁₆₅ 50 ng/ml, au BMP9 10 ng/ml et avec la combinaison des deux. En rouge: SMAD1 ou phospho-SMAD1/5; en bleu: noyaux; en vert: microfilaments d'actine.

3.2. La phosphatase PTEN est inactivée par VEGF-A₁₆₅ et BMP9

Dans le but de comprendre l'augmentation de la phosphorylation d'ERK1/2 lorsque les cellules sont traitées avec le VEGF et le BMP9 en combinaison nous avons analysé l'activation d'une phosphatase dont l'activité peut être régulée par la voie des SMADs et récemment découverte comme régulatrice de l'activité d'ERK1/2 (Arvai et al. 2015; Xiong et al. 2016). PTEN est une protéine de la famille des phosphatases de type 1 des protéines à tyrosine. Elle est constitué de 5 domaines dont un domaine C- et N-terminal, un domaine phosphatase, un domaine C2 de liaison aux lipides et un domaine PDZ. Le résultat obtenu montre que lorsque les HUVECs sont traitées avec le traitement combinant les 50 ng/ml de VEGF-A₁₆₅ et les 10 ng/ml de BMP9, celle-ci présente un niveau de phosphorylation plus important. La phosphorylation de la phosphatase PTEN conduit à son inactivation, la rendant incapable d'aller déphosphoryler ses cibles qui dans ce cas-ci pourraient être les ERK1/2 (**Figure 32**). Ce résultat permet, au moins en partie, d'expliquer pourquoi on observe une augmentation de l'activation des ERKs dans la condition où les deux facteurs sont combinés en comparaison à la condition où le VEGF est présent tout seul.

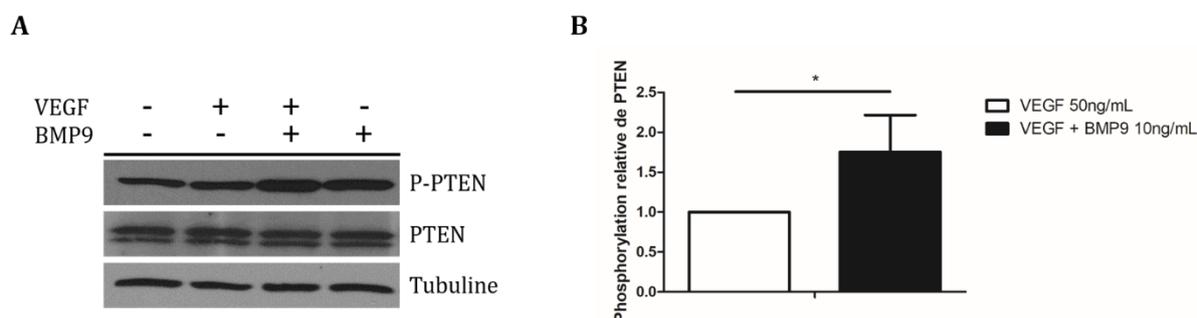


Figure 32 : La phosphatase PTEN est inactivée suite à un traitement combinant le VEGF-A₁₆₅ et le BMP9. Les protéines des HUVECs traitées 15 minutes au VEGF-A₁₆₅ 50 ng/ml, au BMP9 10 ng/ml et avec la combinaison des deux ont été extraites. (A) Le niveau de phosphorylation de PTEN a été mesuré par western blotting. L'analyse des niveaux totaux de PTEN et de la tubuline ont été utilisés comme contrôle. (A) Western blotting récapitulatif des effets du VEGF-A₁₆₅ et du BMP9 sur PTEN et la tubuline. (B) Diagramme représentant l'analyse par densitométrie (ImageJ) de la phosphorylation de PTEN entre les conditions VEGF-A₁₆₅ 50 ng/ml et VEGF-A₁₆₅ + BMP9 10 ng/ml. Dans les diagrammes, les données sont représentées sous forme de moyennes, +/- SD. Les expériences sont réalisées au minimum trois fois de façon indépendante. * p<0,05.

Malgré le fait que des preuves de l'importance de PTEN dans la régulation de la voie des ERK1/2 soient de plus en plus nombreuses ces dernières années, cette protéine est généralement admise comme un régulateur de la voie AKT où elle déphosphoryle le PIP3 en PIP2 conduisant à l'inactivation de la voie (Baker et al. 2018). Par conséquent, nous nous sommes interrogés sur la capacité du VEGF et du BMP9 à pouvoir affecter la phosphorylation d'AKT.

3.3 Les voies Akt et p38 ne sont pas significativement modulées par le traitement VEGF-A₁₆₅ et BMP9

Le VEGF est également capable d'activer d'autres voies que celles d'ERK1/2. Parmi celles-ci, la voie AKT est une des plus connues et son activation, suite à un traitement au VEGF-A₁₆₅, régule la survie, la prolifération et l'apoptose des cellules endothéliales. Nous avons étudié cette voie comme les précédentes. Une étude du niveau de phosphorylation d'AKT a été réalisée par western blotting. Les résultats obtenus montrent que le VEGF induit correctement la phosphorylation d'AKT alors que le BMP9 ne l'induit pas ou faiblement en fonction des répliques biologiques. Comme pour ERK1/2, nous nous sommes demandé si le traitement combinant les deux facteurs modifiait l'activation d'AKT différemment des autres conditions. Nous avons observé une tendance à une légère augmentation par rapport à la condition VEGF-A₁₆₅ seul. Cependant, cette condition n'est pas significativement différente de la dernière (**Figure 33**).

Comme expliqué dans l'introduction sur la famille du VEGF, d'autres voies sont également impliquées dans la modulation des fonctions angiogènes du VEGF-A. Les MAPKs p38 sont une de ces voies. Cette voie est particulièrement intéressante car il existe relativement peu de données concernant son activation par la famille du VEGF. Néanmoins, il semble que ce dernier puisse l'activer dans certaines conditions. De plus, cette voie est une des voies non canoniques du BMP9. Les deux facteurs étudiés semblent donc pouvoir activer cette voie. De la même façon que pour les voies précédentes, nous avons étudié l'état de phosphorylation de cet effecteur. Les résultats obtenus indiquent que, premièrement, le VEGF induit fortement cette phosphorylation et deuxièmement que le BMP9 semble également l'induire mais en moindre mesure. Enfin, l'utilisation simultanée des deux facteurs n'a pas d'effet significativement différent des deux autres conditions (**Figure 33**).

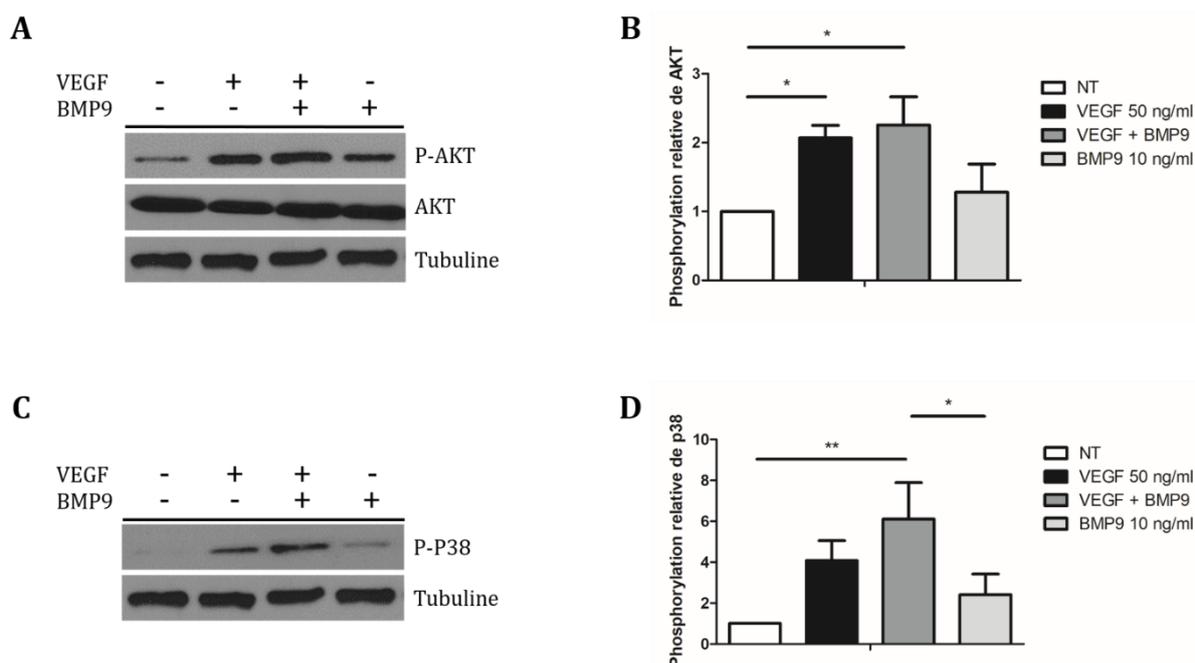


Figure 33 : Le BMP9 n’influence pas significativement la phosphorylation d’AKT induite par le VEGF. Il en est de même pour la phosphorylation de p38 Les protéines des HUVECs traitées 15 minutes au VEGF-A₁₆₅ 50 ng/ml, au BMP9 10 ng/ml et avec la combinaison des deux ont été extraites. (A-B) Le niveau de phosphorylation d’AKT a été mesuré par western blotting. L’analyse des niveaux totaux d’AKT et de la tubuline a été utilisée comme contrôle. (A) Western blotting récapitulatif des effets du VEGF-A₁₆₅ et du BMP9 sur AKT et la tubuline. (B) Diagramme représentant l’analyse par densitométrie ((ImageJ) de la phosphorylation d’AKT. (C-D) Le niveau de phosphorylation de p38 a été mesuré par western blotting. L’analyse des niveaux totaux de la tubuline a été utilisée comme contrôle. (C) Western blotting récapitulatif des effets du VEGF-A₁₆₅ et du BMP9 sur p38 et la tubuline. (D) Diagramme représentant l’analyse par densitométrie ((ImageJ) de la phosphorylation de p38. Dans les diagrammes, les données sont représentées sous forme de moyennes, +/- SD. Les expériences sont réalisées au minimum trois fois de façon indépendante. * p<0,05; ** p<0,01.

3.4 BMP9 augmente l’internalisation du VEGFR2 induite par VEGF-A₁₆₅

La suractivation d’ERK1/2 lorsque le VEGF et le BMP9 stimulent simultanément les HUVECs par rapport à la stimulation au VEGF seul peut être partiellement expliquée par l’inactivation de la phosphatase PTEN. Toutefois, nous avons également décidé d’investiguer le rôle du BMP9 sur l’internalisation du récepteur du VEGF-A₁₆₅ qui pourrait également expliquer une modulation de la phosphorylation des ERK1/2.

Comme expliqué dans l’introduction, l’internalisation du VEGFR2 est essentielle pour permettre au VEGF de réguler les fonctions des cellules endothéliales. Il a notamment été montré à plusieurs reprises que la perturbation de ces mouvements intracellulaires empêche la phosphorylation d’ERK1/2 (Lampugnani et al. 2006; Sawamiphak et al. 2010).

Au sein de notre laboratoire, une technique a souvent été utilisée pour étudier l’internalisation des récepteurs. Il s’agit de la biotinylation des protéines de surface. Elle permet de marquer les protéines membranaires avec de la biotine. La stimulation des

cellules à l'aide de facteurs de croissance provoque l'entrée dans les endosomes des récepteurs biotinylés. La lyse des cellules et la récupération de la biotine par des billes de streptavidine permet de récupérer les récepteurs internalisés.

Dans un premier temps, nous avons réalisé l'expérience en traitant les cellules uniquement avec du VEGF-A₁₆₅ afin de déterminer le temps de stimulation adéquat. Trois temps d'incubation ont été testés ; 5 minutes, 15 minutes et 30 minutes. Les résultats obtenus montrent que l'internalisation du VEGFR2 atteint son maximum après 15 minutes de stimulation (**Figure 34**). Dans un second temps, les HUVECs ont été traitées suivant les mêmes conditions que précédemment. Les résultats obtenus indiquent que lorsque les cellules endothéliales sont traitées simultanément au VEGF-A₁₆₅ et au BMP9, l'internalisation qui en découle est significativement plus élevée que celle induite par le VEGF seul (**Figure 34**).

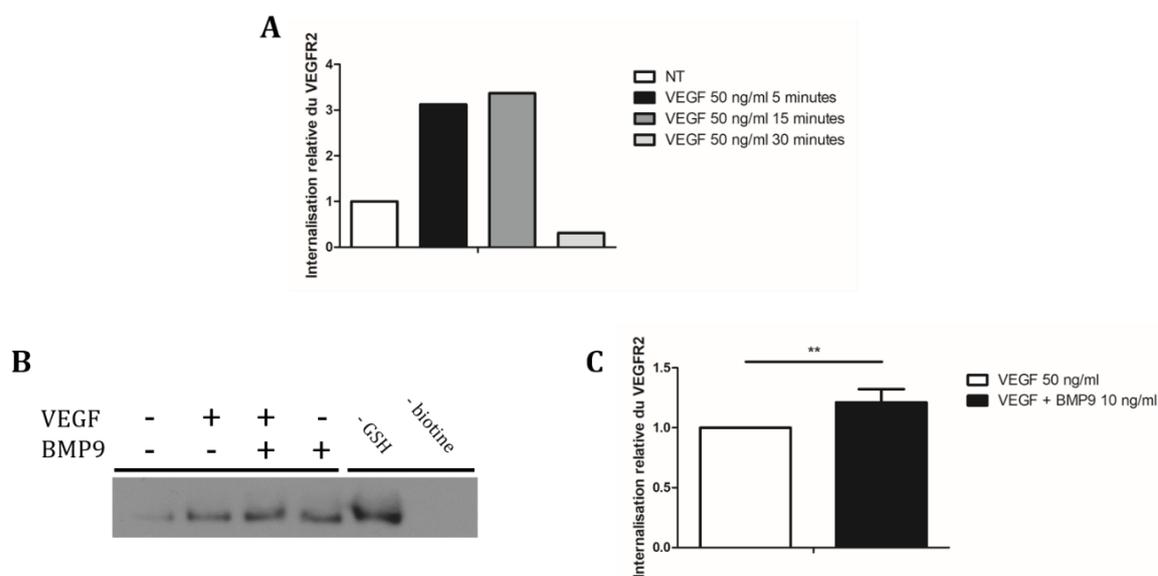


Figure 34 : Le VEGF-A₁₆₅ induit l'internalisation du VEGFR2 avec un maximum après 15 minutes de traitements. BMP9 augmente cette internalisation. Analyse de l'internalisation du VEGFR2 par biotinylation. (A) Les protéines de surface sont marquées à la biotine avant d'être stimulées au VEGF-A₁₆₅ 50 ng/ml pendant 5 minutes, 15 minutes ou 30 minutes. Un western blotting des protéines précipitées par la biotine internalisé est réalisé avec un anticorps ciblant le VEGFR2. Un diagramme de son analyse par densitométrie (ImageJ) est ainsi représenté. (B-C) Analyse de l'internalisation du VEGFR2 suite à la biotinylation des HUVECs stimulées au VEGF-A₁₆₅, au BMP9 ou à une combinaison des deux facteurs. (B) Western blotting issu de cette manipulation. (C) Diagramme de l'analyse par densitométrie du western blotting. Dans les diagrammes, les données sont représentées sous forme de moyennes, +/- SD. Les expériences sont réalisées au minimum trois fois de façon indépendante sauf pour la figure A où une seule expérience a été réalisée pour montrer le graphique (données connues et obtenues précédemment par un autre expérimentateur). ** p<0,01.

Deuxième partie : étude du rôle du micro-ARN 205 dans les cellules endothéliales

Le laboratoire d'angiogenèse moléculaire possède une grande expertise dans le domaine des micro-ARN (miARN) notamment dans la communication entre les cellules endothéliales et l'environnement tumoral. Les miARN sont de petits ARN non codant d'environ 22 nucléotides. Ils répriment l'expression de gènes de manière post-transcriptionnel en se fixant sur la séquence complémentaire de son/ses ARN messenger(s) cibles. Un micro-ARN est d'abord transcrit sous la forme d'un long précurseur (pri-miARN) qui est alors clivé pour donner une entité double brin en forme de boucles d'environ 70 nucléotides, le pré-miARN. Celui-ci est alors exporté hors du noyau et est à nouveau clivé dans le cytoplasme par une autre enzyme (Dicer). L'ensemble de ce procédé permet de donner naissance à un micro-ARN simple brin pouvant réguler ses cibles. Cette famille d'ARN est notamment impliquée dans la régulation de nombreux processus physiologiques mais constitue également une source importante de biomarqueurs dans le diagnostic de différentes maladies. Notre laboratoire a notamment mis en évidence un micro-ARN impliqué dans la télangiectasie hémorragique héréditaire : le micro-ARN205 (Tabruyn et al. 2013). Le premier point de cette partie sera consacré à l'explication du travail réalisé précédemment par notre laboratoire.

1. miR-205 est dérégulé chez les patients atteint de télangiectasie hémorragique héréditaire, affecte les voies de signalisation du TGF- β et les fonctions des cellules endothéliales

Cette deuxième partie du manuscrit a été basée sur une étude réalisée dans notre laboratoire par le Docteur Tabruyn en 2013. Les prochains paragraphes permettront de rapidement résumer ce projet afin de permettre une meilleure compréhension de cette partie.

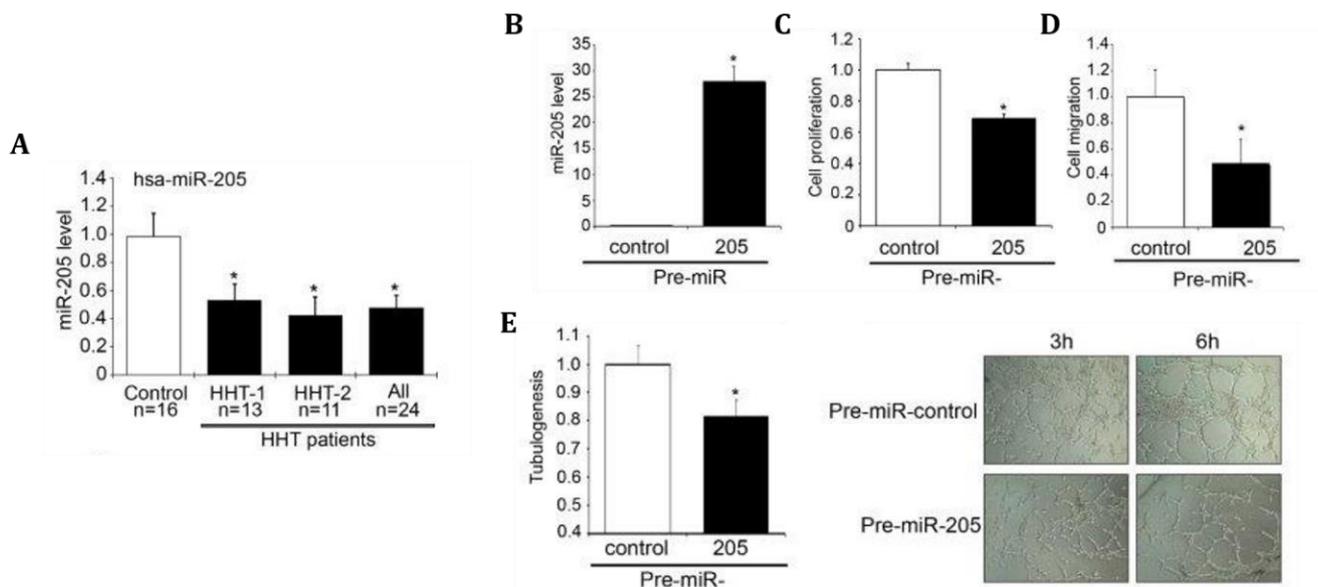


Figure 35 : Le miR-205 est dérégulé dans le plasma des patients HHT et inhibe l'angiogenèse des HUVECs. (A) Niveau de miR-205 présent dans le plasma de 24 patients souffrant d'HHT et de 16 contrôles sains. Le niveau d'expression est analysé par qRT-PCR TaqMan. (B) Niveau d'expression du micro-ARN 205 dans les cellules HUVECs préalablement transfectées avec un pré-miR contrôle et un pré-miR 205. (C-E) Tests fonctionnels sur les HUVECs transfectées. (C) Prolifération cellulaire analysée par incorporation au BrdU. (D) Migration des HUVECs analysée par *scratch assay*. (E) Test de tubulogenèse analysée par la formation de tubes au sein d'un Matrigel. Pour le niveau d'expression du miR-205 (A), les données sont représentées sous forme de moyennes +/- SEM. Il en est de même pour les diagrammes des tests fonctionnels (C-E) mais les données sont exprimées en moyennes +/- SD. Les expériences sont réalisées au minimum trois fois de façon indépendante. * p<0,05. Figure adaptée de Tabruyn 2013

Lors de cette étude, il a premièrement été montré que, dans le plasma des patients, le niveau d'expression du micro-ARN 205 est moins élevé que celui observé dans le plasma des personnes saines (**Figure 35**). Deuxièmement, l'étude de l'impact de cet ARN sur les fonctions des HUVECs a montré qu'il joue un rôle inhibiteur dans l'angiogenèse. En effet, la surexpression du micro-ARN par la transfection des cellules avec du pré-miR-205 diminue la prolifération, la migration et la tubulogenèse des HUVECs (**Figure 35**). Troisièmement, l'utilisation de TargetScan a mis en évidence au moins deux cibles faisant partie de la famille du TGF- β ; SMAD1 et SMAD4. La transfection des cellules a permis de vérifier que ces deux SMADs sont bien parmi les cibles du micro-ARN 205. La voie du TGF- β est donc régulée par le miR-205. Quatrièmement, dans ce travail, la surexpression de ce micro-ARN réduit l'expression d'ID-1, une des cibles de la voie TGF- β /ALK1/SMAD1/5/8. Enfin, la stimulation des HUVECs par une faible dose de TGF- β (1 ng/ml) conduit à l'augmentation de l'expression de miR-205 (**Figure 36**) (Tabruyn et al. 2013).

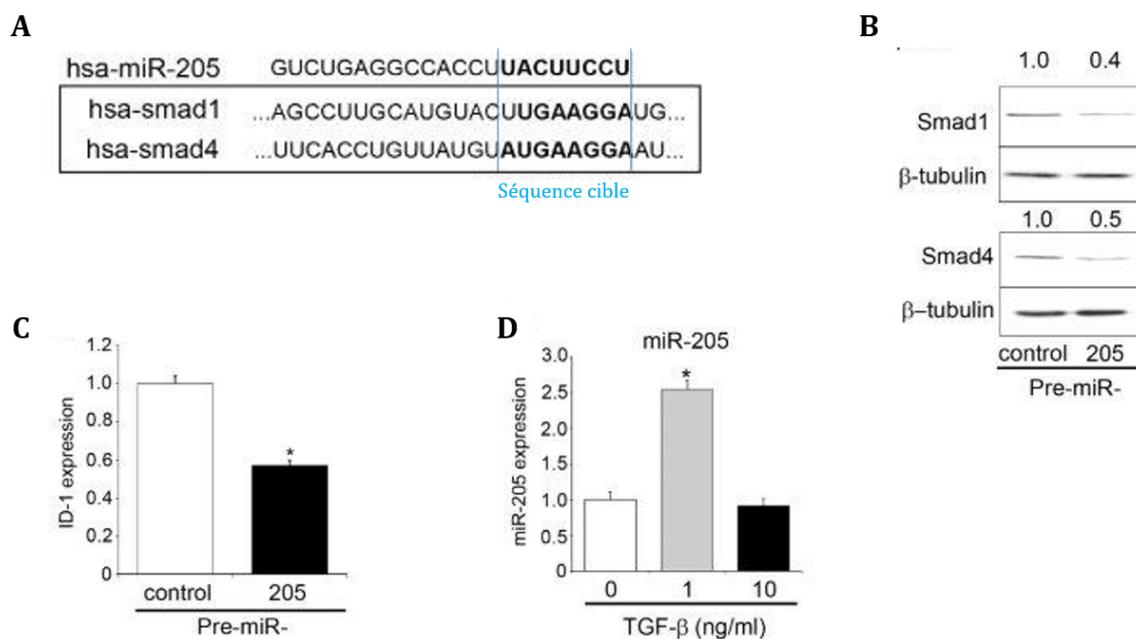


Figure 36 : Le miR-205 cible la voie du TGF- β , qui, à faible concentration augmente l'expression de ce micro-ARN. (A) Représentation de la séquence cible du micro-ARN 205 et de ces cibles prédites par TargetScan. (B) Western blotting du niveau protéique de Smad1 et Smad4 obtenus à partir d'extraits protéiques totaux d'HUVECs transfectées à l'aide de pré-miR contrôle et de pré-miR 205. (C) Analyse de l'expression d'ID-1 par qRT-PCR par les HUVECs transfectées à l'aide de pré-miR contrôle et de pré-miR 205. (D) Niveau de miR-205 dans les HUVEC traitées 24h avec le TGF- β . Toutes les données sont représentées sous forme de moyennes +/- SD. Les expériences sont réalisées au minimum trois fois de façon indépendante. * $p < 0,05$. Figure adaptée de Tabruyn 2013

2. L'expression de miR-205 et de ses cibles est altérée dans les cellules de patients HHT2

Comme mentionné précédemment, la collaboration avec l'université de Madrid nous a permis d'acquérir des cellules mutées dans le gène *ACVRL1* codant pour ALK1 et provoquant le développement de la télangiectasie hémorragique héréditaire de type 2. L'utilisation de ces HUVECs mutées nous a permis d'analyser le niveau d'expression de miR-205 et de ses cibles SMAD1 et SMAD4. Ces analyses permettent de comparer ce qui a été observé dans le plasma sanguin des patients avec ce qui se passe au sein des cellules mutées.

2.1 L'expression du miR-205 est diminuée dans les cellules HHT2

La comparaison du niveau de miR-205 entre les cellules endothéliales provenant de contrôles sains et des patients atteints de HHT2 a été réalisée par qRT-PCR. De telle manière, l'expression de cet ARN est fortement diminuée dans les HUVECs HHT2 en comparaison aux HUVECs saines (**Figure 37A**).

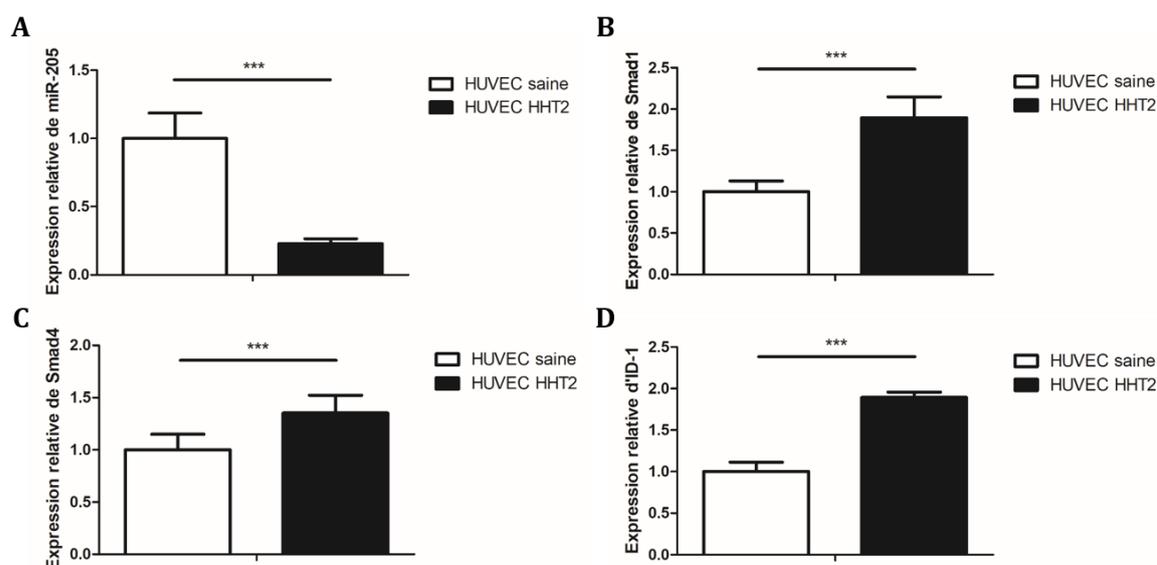


Figure 37 : Le niveau de miR-205 est diminué et ses cibles sont augmentées dans les HUVEC HHT2. (A) Analyse de l'expression de miR-205 par qRT-PCR dans les HUVECs saines et dans les HUVECs provenant de patients HHT2. (B-C) Analyse de l'expression des cibles du miR-205 par qRT-PCR dans les HUVECs saines et dans les HUVECs provenant de patients HHT2. (D) Analyse de l'expression d'ID-1, un gène régulé par SMAD1/4, par qRT-PCR dans les HUVECs saines et dans les HUVECs provenant de patients HHT2. Toutes les données sont représentées sous forme de moyennes +/- SD. Les expériences sont réalisées au minimum trois fois de façon indépendante. *** $p < 0,001$.

2.2 L'expression de SMAD1, SMAD4 et d'ID-1 est augmentée dans les cellules HHT2

L'utilisation de TargetScan montre que parmi les cibles du miR-205 on retrouve SMAD1 et SMAD4. De plus, l'étude de la littérature confirme ces cibles (Tabruyn et al. 2013; Chu et al. 2018). Dans l'article de Tabruyn et al., la surexpression du miR-205 provoque une diminution du niveau protéique de SMAD1 et SMAD4. Nous avons alors analysé par qRT-PCR, le niveau d'expression de ces deux effecteurs dans les cellules HUVECs saines et celles de patients souffrant d'HHT2. Les résultats montrent que le niveau d'ARN messager de SMAD1, et dans une moindre mesure de SMAD4, est significativement plus élevé dans les cellules HHT2 par rapport au niveau observé dans les cellules HUVECs saines (**Figure 37B et C**).

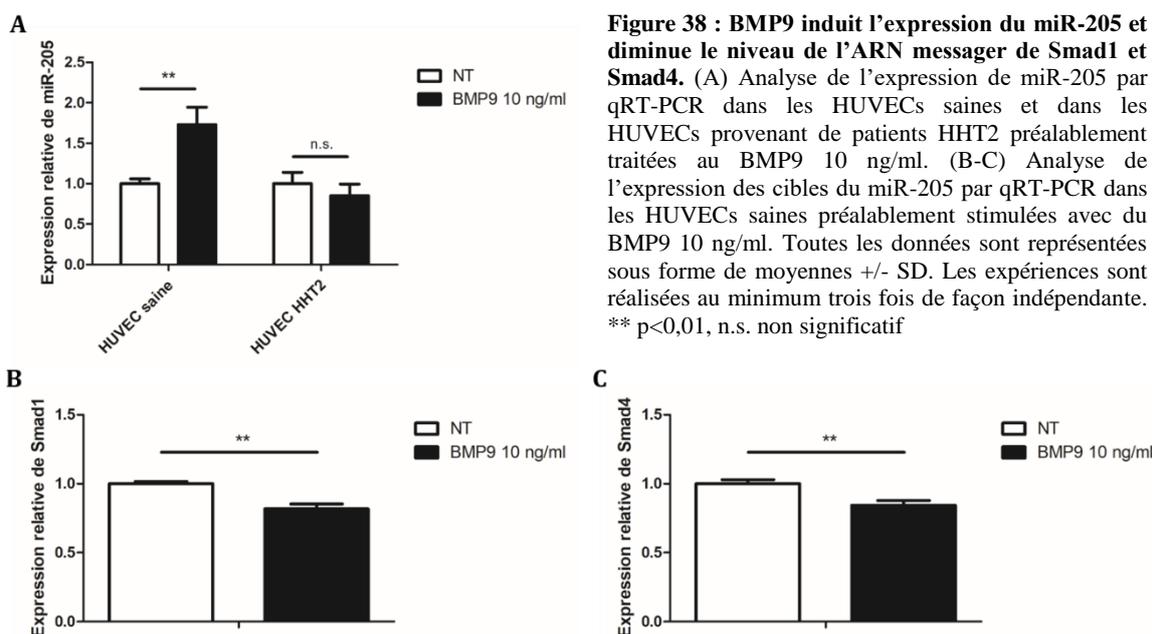
Un des gènes cibles de ces deux SMADs est ID-1. Nous avons alors réalisé une qRT-PCR pour analyser son niveau d'expression dans les cellules HHT2. Ainsi, les résultats obtenus nous indiquent que le niveau d'ID-1 est plus élevé dans les cellules de patients que dans les cellules saines (**Figure 37D**). Ces résultats indiquent donc que dans les cellules HHT2 où le niveau de miR-205 est diminué, ses cibles ainsi que le gène qu'elles régulent sont augmentés.

3. BMP9 induit l'expression du micro-ARN 205

Dans le précédent projet du laboratoire concernant l'étude de miR-205 dans la télangiectasie hémorragique héréditaire, une faible concentration en TGF- β induit l'expression du micro-ARN. Le fait que le miR-205 soit dérégulé dans les cellules HHT2 présentant une mutation dans le gène codant ALK1 suggère qu'un lien existe entre ce récepteur et miR-205. Le BMP9 étant le ligand d'ALK1, celui-ci pourrait réguler l'expression du miR. Depuis la publication de cet article, les données de la littérature montrent que BMP9 joue un rôle plus important que le TGF- β dans la maladie. Par conséquent, nous avons décidé d'analyser la capacité du BMP9 à moduler le niveau cellulaire du miR-205.

Les micro-ARN des HUVECs saines préalablement traitées 6h au BMP9 10 ng/ml ont été extraits et une qRT-PCR a été réalisée pour définir le niveau d'expression du miR-205. Le traitement au BMP9 induit significativement l'expression du micro-ARN 205. Le même traitement a été appliqué aux cellules HHT2. Au niveau de ces dernières, le BMP9 n'est plus capable d'induire l'expression de miR-205 (**Figure 38**). Le micro-ARN 205 est donc sous le contrôle du BMP9 et de la voie BMP9/ALK1/SMAD1/4.

Afin de vérifier ces premiers résultats, nous avons également évalué le niveau des SMAD1 et SMAD4 suite à un traitement au BMP9 10 ng/ml. Nous avons alors constaté une diminution de l'expression de ces deux effecteurs. Cette diminution est relativement faible mais significative (**Figure 38**).



4. miR-205 diminue l'expression de PTEN et du VEGF

La première partie des résultats de cette thèse montre que la combinaison du VEGF et du BMP9 augmente la phosphorylation d'ERK1/2. Cette augmentation peut être expliquée par une inactivation de la phosphatase PTEN et par une modification de l'internalisation du VEGFR2 (Herkenne et al. 2015; Ebbesen et al. 2016; Baker et al. 2018). Les recherches au sein de la littérature et de TargetScan nous ont également montré que le miR-205 possède d'autres cibles que SMAD1 et SMAD4. Parmi celles-ci, on a retrouvé PTEN (Wang et al. 2016; Li et al. 2017; Chu et al. 2018). Il semble donc que PTEN puisse faire un lien entre les deux parties.

Afin de vérifier ces informations, les HUVECs ont été transfectées 24 heures avec le pré-miR 205 afin de surexprimer ce micro-ARN. Une analyse par qRT-PCR nous indique que la transfection s'est correctement déroulée. En effet, le niveau de miR-205 dans les HUVECs est augmenté d'approximativement 6 fois (**Figure 39**). Nous avons ensuite analysé son effet sur l'expression de PTEN. Les résultats obtenus suite à la qRT-PCR montrent que lorsque les cellules surexpriment miR-205, l'expression de PTEN est diminuée. Ceci confirme que cette phosphatase est une cible du miR (**Figure 40**).

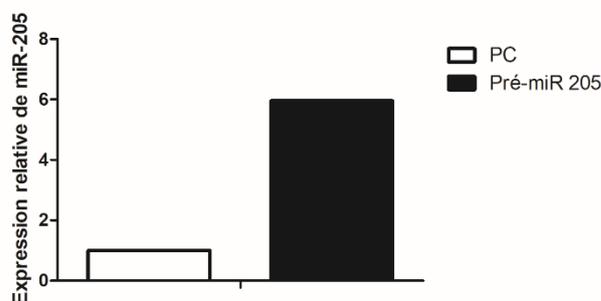


Figure 39 : La transfection des HUVECs avec le pré-miR 205 augmente l'expression du micro-ARN. Analyse de l'expression de miR-205 par qRT-PCR dans les HUVECs transfectées à l'aide de pré-miR contrôle et de pré-miR 205. Les cellules ont été transfectées 24h avec une concentration de pré-miR de 25 nM.

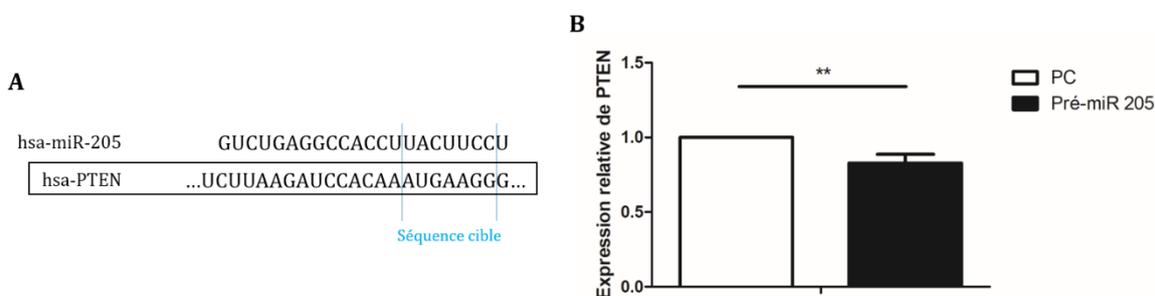


Figure 40 : Le miR-205 diminue l'expression de PTEN dans les HUVECs saines. (A) Représentation de la séquence cible du micro-ARN 205 et de sa cible PTEN prédite par TargetScan. (B) Analyse de l'expression de PTEN par qRT-PCR dans les HUVECs transfectées à l'aide de pré-miR contrôle et de pré-miR 205. Toutes les données sont représentées sous forme de moyennes +/- SD. Les expériences sont réalisées au minimum trois fois de façon indépendante. ** p<0,01.

Récemment, plusieurs articles sont parus et affirment que miR-205 cible également une autre protéine dont l'importance dans la maladie n'est plus à démontrer, le VEGF. Il a notamment été montré qu'un niveau élevé de miR-205 favorise une bonne réponse à la chimiothérapie dans le cas de certains cancers du sein. Cet effet est dû au fait que ce micro-ARN cible le VEGF, diminuant son expression et l'empêchant d'inhiber l'apoptose des cellules tumorales (Hu et al. 2016). Un effet similaire est observé dans le cas d'un carcinome et d'un cancer de la thyroïde (Salajegheh et al. 2015; Vosgha et al. 2018). Ainsi, il semble que ce micro-ARN soit impliqué dans la régulation du niveau de VEGF et pourrait être impliqué dans la compréhension de la maladie. Nous avons donc réalisé la même expérience que pour le niveau de PTEN. Les résultats obtenus indiquent que le niveau de VEGF est diminué lorsque miR-205 est surexprimé dans les HUVECs (**Figure 41**).

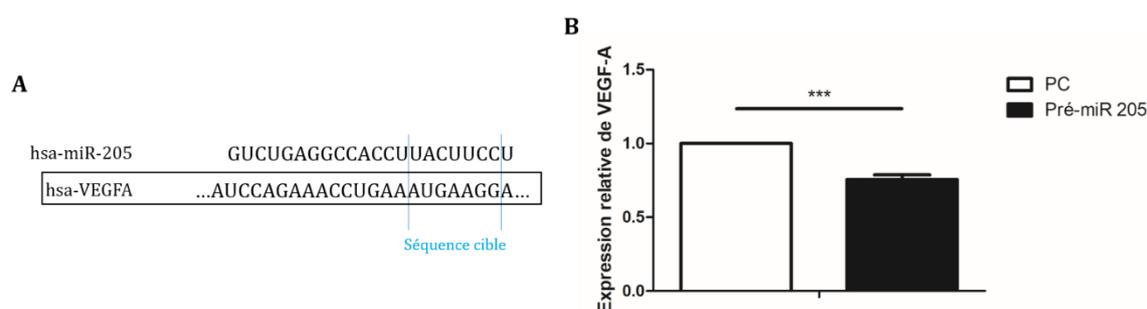


Figure 41: Le miR-205 diminue l'expression de VEGF-A dans les HUVECs saines. (A) Représentation de la séquence cible du micro-ARN 205 et de sa cible VEGF-A prédite par TargetScan. (B) Analyse de l'expression de VEGF-A par qRT-PCR dans les HUVECs transfectées à l'aide de pré-miR contrôle et de pré-miR 205. Toutes les données sont représentées sous forme de moyennes +/- SD. Les expériences sont réalisées au minimum trois fois de façon indépendante. *** p<0,001.

Discussion et conclusions

1. Discussion

La télangiectasie hémorragique héréditaire est une maladie héréditaire autosomique dominante. Elle est caractérisée par divers troubles vasculaires provoquant des symptômes variés allant de simples saignements de nez, à l'apparition de télangiectasies et plus sérieusement au développement de malformations artério-veineuses. Il existe un très grand nombre de mutations provoquant l'apparition des symptômes caractéristiques d'HHT. Cependant, toutes ces mutations touchent des gènes codant pour des protéines de la superfamille du TGF- β . Ainsi, on distingue deux types majeurs de la maladie, HHT1 caractérisée par des mutations dans le gène qui code l'endogline et HHT2 caractérisée par des mutations dans le gène ACVRL1 qui code pour ALK1. Les problèmes vasculaires sous-jacents aux différents symptômes sont provoqués par un mauvais développement du réseau de capillaires faisant la jonction entre les veines et les artères. A la place de ce réseau de fin vaisseaux bien organisé, on retrouve de gros vaisseaux tortueux, fragiles et perméables. Les causes de la formation de ces vaisseaux anormaux sont évidemment les mutations qui causent la maladie. Cependant le mécanisme par lequel ces malformations se développent est encore mal compris et nécessite des études plus approfondies.

Dans un premier temps, les études pour comprendre le mécanisme se sont focalisées sur le rôle du TGF- β . Plusieurs études sont arrivées à la conclusion que ce ligand est capable d'activer à la fois une voie impliquant ALK5/SMAD2/3 et une voie impliquant ALK1/SMAD1/5/8. La balance entre les deux voies a d'abord été utilisée pour expliquer la maladie. Au sein d'une cellule endothéliale saine, les deux voies peuvent toutes les deux être activées et permettent de maintenir l'équilibre entre la phase de maturation et celle d'activation de l'angiogenèse. En effet, la voie impliquant le TGF- β /ALK5/SMAD2/3 est responsable de l'inhibition de la prolifération et de la migration des CEs alors que la voie TGF- β /ALK1/SMAD1/5/8 contribue à l'activation de ces deux fonctions. Lors du développement de la maladie, les gènes codant ALK1 et l'endogline peuvent être muté conduisant à leur haploinsuffisance. Un déséquilibre dans la balance est alors observé compromet alors le processus d'angiogenèse. Par la suite, la cellule s'adapte à ce déséquilibre et diminue le niveau d'expression d'ALK5. Cette voie devient à son tour inactive et provoque un retour de la balance mais à des niveaux très faibles en comparaison

à une cellule non mutée (**Figure 42**). Tout ceci conduit au développement des gros vaisseaux remplaçant le réseau de capillaires (Goumans et al. 2002; Fernández-L et al. 2006).

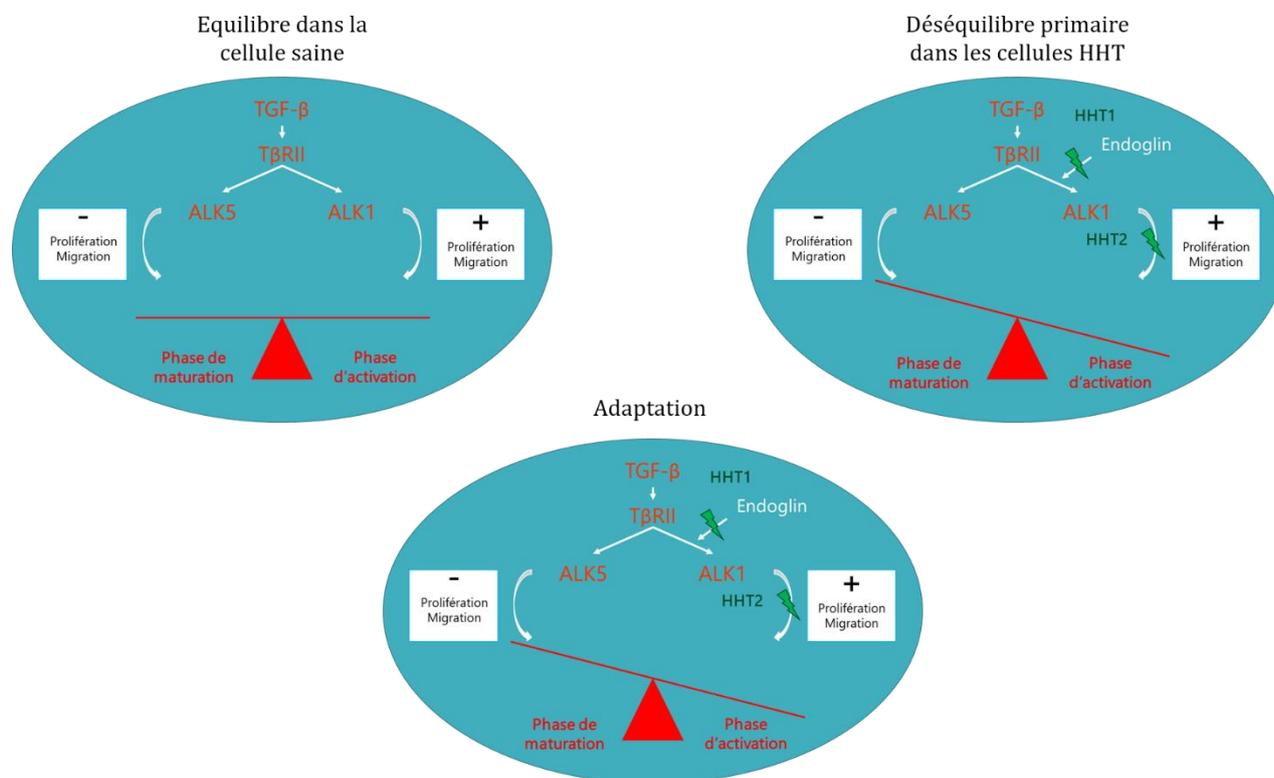


Figure 42 : La balance de signalisation entre la voie TGF- β /ALK5 et TGF- β /ALK1 dans les cellules endothéliales saines et HHT. Au sein des cellules saines, une balance existe entre les deux voies permettant d'établir l'équilibre entre phase d'activation et de maturation de l'angiogenèse. Dans les cellules mutées pour endogline (HHT1) et pour ALK1 (HHT2), la voie TGF- β /ALK1 est partiellement abolie conduisant à un déséquilibre primaire. La voie TGF- β /ALK5 est alors prioritaire et conduit à une diminution de la prolifération et migration des cellules endothéliales. La quiescence vasculaire est alors dominante et compromet le procédé d'angiogenèse. Suite à ce déséquilibre, la cellule s'adapte et diminue le niveau d'ALK5 conduisant au rétablissement de la balance entre les deux voies mais contrairement aux cellules saines, elles sont fortement diminuées. Ceci conduit à la formation de gros vaisseaux fragiles et tortueux. Figure adaptée de Fernandez-Lopez 2006

Ces dernières années, le ligand TGF- β a été moins investigué dans les études tentant de mieux comprendre la télangiectasie hémorragique héréditaire. Le modèle précédent a également été remis en cause avec la découverte d'un nouveau ligand pour ALK1, le BMP9. Il est alors apparu que ce ligand est un des ligands d'ALK1. Il s'y lie avec une haute affinité comparé au TGF- β (David et al. 2007). Dès lors, les études concernant le couple BMP9/ALK1 se sont multipliées et le rôle de ce récepteur de type I et de son ligand est devenu bien moins clair que dans le premier modèle proposé. Contrairement au TGF- β qui semble se comporter comme décrit dans le modèle de Fernandez-Lopez, BMP9, par l'intermédiaire d'ALK1, semble avoir un rôle fortement dépendant du contexte. En effet, comme mentionné dans la partie traitant des objectifs de cette thèse, certains groupes de

recherches penchent pour un rôle inhibiteur de l'angiogenèse alors que d'autres indiquent que le BMP9 joue un rôle activateur de la formation des vaisseaux sanguins (Scharpfenecker et al. 2007; David et al. 2007; Suzuki et al. 2010; Larrivée et al. 2012; Ntumba et al. 2016; Akatsu et al. 2017; Busceti et al. 2017).

Le rôle du BMP9 dans la régulation de l'angiogenèse n'étant pas bien défini, nous avons voulu, par ce projet, apporter des informations supplémentaires quant à l'importance de ce facteur dans la biologie vasculaire. Lorsqu'on parle d'angiogenèse, on pense directement au VEGF. C'est pourquoi, plutôt que de n'étudier que le rôle du BMP9 seul, nous nous sommes focalisés sur l'étude d'un potentiel crosstalk entre la voie du VEGF et celle du BMP9.

Afin de débiter cette étude, des tests de *proximity ligation assay* ont été réalisés pour analyser la capacité du VEGFR2, le récepteur du VEGF-A, à interagir avec des récepteurs de la famille du TGF- β . Ces PLA nous ont montré qu'à l'état basal (cellules non traitées), le récepteur 2 du VEGF n'interagit que très peu avec le TGFRII, ALK5, ALK1 et l'endogline. Cependant, lorsque les HUVECs sont soumises à un traitement au VEGF-A₁₆₅, un complexe entre les VEGFR2 et les quatre récepteurs cités précédemment est observé, particulièrement pour ALK1 et l'endogline. Par conséquent, une stimulation au VEGF semble induire la formation d'un complexe entre le VEGFR2 et les récepteurs du BMP9, ALK1 et l'endogline. Une étude récente corrobore ce que nous avons vu en PLA pour l'endogline. Dans celle-ci, ils ont montré que, dans les cellules MEEC, l'interaction de l'endogline avec le VEGFR2 suite à un traitement au VEGF-A est essentielle à la promotion de la signalisation de ce facteur et de l'angiogenèse qu'il induit (Tian et al. 2018). Dans ce même travail, cette interaction ainsi que les effets bénéfiques de l'endogline sur la signalisation du VEGF-A semblent indépendant d'ALK1 et de BMP9. Nos résultats tendent à montrer que le VEGF est également capable d'induire la formation d'un complexe entre le VEGFR2 et ALK1. Nous nous sommes donc focalisés sur ce récepteur pour mieux comprendre l'importance du couple BMP9/ALK1 dans la voie du VEGF-A.

A l'aide de la même technique de *proximity ligation assay*, nous avons étudié l'impact du BMP9 sur la formation de ce complexe. Les résultats obtenus montrent que le BMP9 n'induit pas la formation du complexe. Cependant, la stimulation des HUVECs avec la combinaison du VEGF et du BMP9 simultanément nous montre qu'elle inhibe l'interaction entre le VEGFR2 et ALK1. La présence des deux ligands à la surface des

cellules dissocie donc le complexe VEGFR2/ALK1. Ce résultat est difficile à expliquer mais nous pouvons conclure, à ce stade, que le VEGF-A semble induire le recrutement d'ALK1 à proximité de son récepteur de type 2 alors que quand le BMP9 est également présent, cette interaction pourrait ne plus avoir lieu (**Figure 43**). Ceci pourrait permettre au BMP9 d'activer de manière plus efficace ses voies de signalisation. Ces premiers résultats préliminaires nous ont confortés dans l'idée que le VEGF et le BMP9 sont en étroite collaboration. Lorsque ces deux facteurs stimulent ensemble les cellules endothéliales, le comportement de ces dernières semble altéré comparé à des cellules stimulées uniquement avec du VEGF.

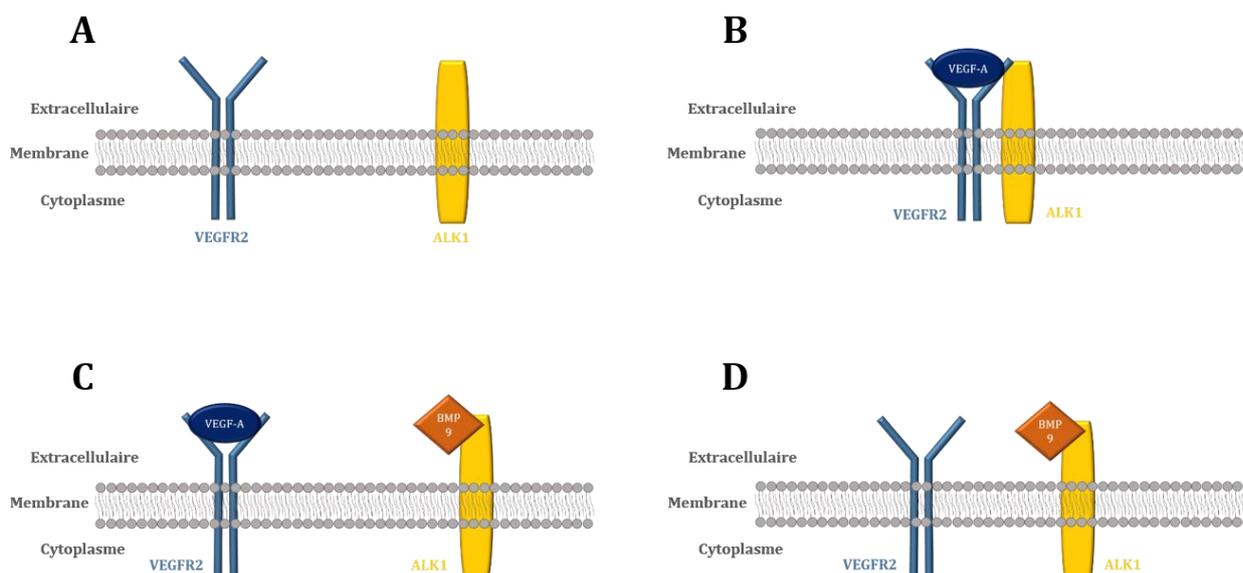


Figure 43 : Schéma représentant les modifications d'interactions entre le VEGFR2 et ALK1. (A) Cellule à l'état basal, sans traitement. (B) Cellules stimulées au VEGF-A. (C) Cellules stimulées avec la combinaison du VEGF et du BMP9. (D) Cellules traitées au BMP9.

L'étude de la littérature nous a laissés perplexes quant au rôle du BMP9 et d'ALK1 dans la régulation de la physiologie des cellules endothéliales. En effet, comme mentionné plusieurs fois, plusieurs articles analysant l'effet de ce couple ligand/récepteur sont sortis ces dernières années et présentent des résultats contradictoires. Dans certains cas, BMP9/ALK1 présente un rôle d'inhibition de l'angiogenèse alors que dans d'autres cas, il favorise ce processus. Afin de pouvoir poursuivre ce projet dans de bonnes conditions, nous avons donc réalisé des tests fonctionnels sur les HUVECs stimulées avec du BMP9, du VEGF et du bFGF, un autre facteur pro-angiogène. Nous avons testé deux concentrations de BMP9, 2 ng/ml et 10 ng/ml en prolifération et en migration. Ces deux

concentrations ont été choisies sur base du niveau de BMP9 circulant dans le sérum humain qui varie entre 2 et 12 ng/ml (David et al. 2008). Les résultats obtenus avec ces tests de prolifération nous indiquent que le BMP9 n'active pas l'angiogenèse mais ne l'inhibe pas non plus lorsqu'il est le seul agent stimulant des HUVECs. Un résultat similaire a été observé par Scharpfenecker dans les cellules endothéliales aortiques de bovins (BAEC). En effet, le BMP9, à une concentration de 10 ng/ml, n'est pas capable d'induire un effet sur la prolifération de ces cellules. Cependant un test de migration sur ce même type cellulaire indique que le BMP9 peut, faiblement mais significativement, inhiber cette fonction dans les BAEC (Scharpfenecker et al. 2007). De plus, Suzuki et al. ont montré que le BMP9 est capable d'induire seul la prolifération d'au moins trois types différents de cellules endothéliales. La concentration de BMP9 utilisée dans ces tests est 1 ng/ml (Suzuki et al. 2010). Ces résultats sont donc discordants des nôtres où l'on n'observe pas d'effets du BMP9 ni en prolifération ni en migration des HUVECs. Cette divergence d'effet et de rôle du BMP9 pourrait s'expliquer par les types cellulaires utilisés. En effet, Sharpfenecker a utilisé des BAEC alors que Suzuki ont utilisé des MESEC, NEC et TEC et nous, des HUVECs.

Le BMP9 n'a donc aucun effet direct sur la prolifération et la migration de ces cellules. Depuis très longtemps, le VEGF-A₁₆₅ et le bFGF sont deux facteurs de croissance connus pour stimuler ces deux fonctions dans les cellules endothéliales (Koch & Harlow 1994; Meadows et al. 2001; Matsumoto et al. 2005; Presta et al. 2005; Turner & Grose 2010; Giordano et al. 2014). Ces deux facteurs sont d'ailleurs rapidement devenus des cibles de choix dans les traitements anti-angiogènes contre le développement tumoral et la dissémination des métastases (Ferrara et al. 2004; Giacomini et al. 2016). Nous nous sommes alors demandé si malgré le fait que le BMP9 n'est pas capable d'influer directement sur l'angiogenèse des HUVECs, il pourrait influencer l'angiogenèse induite par le VEGF et le bFGF. Les résultats obtenus avec l'analyse de l'incorporation au BrdU et le scratch assay indiquent que le BMP9 diminue la prolifération ainsi que la migration des HUVECs stimulées au VEGF ou au bFGF. Un test de tubulogenèse a également été réalisé et résume les deux résultats précédents. En effet, les HUVECs stimulées au BMP9 forment moins de tubes. Ces résultats concordent avec ceux obtenus par plusieurs autres groupes. Il a notamment été montré qu'un traitement combiné de bFGF et de BMP9 réduit l'angiogenèse dans une expérience d'éponge placée en sous-cutanée chez la souris comparée aux éponges traitées uniquement au bFGF (David et al. 2008). Un autre groupe a

mis en évidence que le BMP9 diminue la migration induite par le bFGF des BAEC. Dans cette même étude, le BMP9 inhibe la formation du réseau vasculaire induite par le VEGF dans une expérience utilisant des métatarses d'embryons de souris (Scharpfenecker et al. 2007). Enfin, plus récemment, il a été observé que le BMP9 diminue l'angiogenèse dans les rétines de souris et que cet effet est dû à une modulation du niveau d'expression des récepteurs du VEGF ; une augmentation du VEGFR1 accompagné d'une diminution du VEGFR2 (Ntumba et al. 2016).

En conclusion, le BMP9 ne possède pas la capacité d'influer seul sur l'angiogenèse. Cependant, lorsque ce facteur est présent simultanément avec le VEGF ou le bFGF, il inhibe l'angiogenèse induite par ces derniers (**Figure 44**).

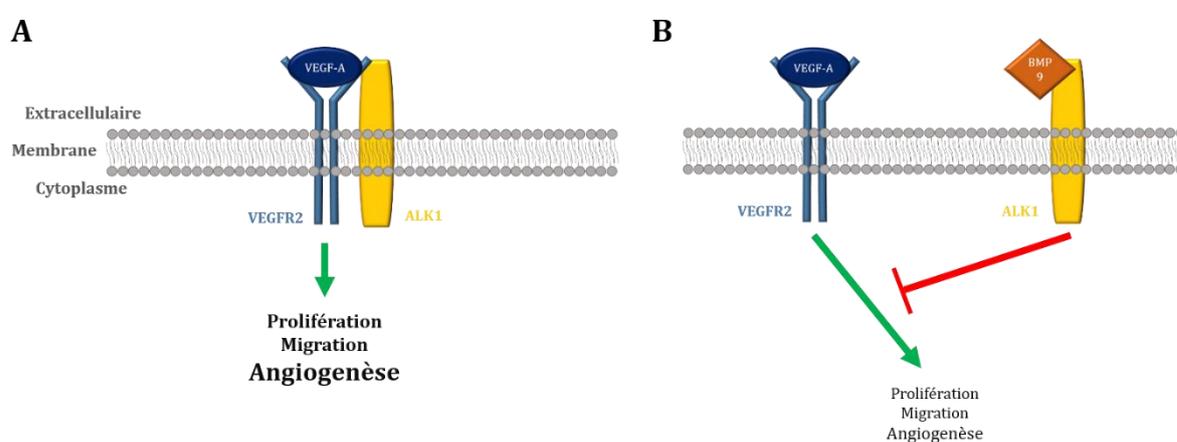


Figure 44 : Schéma représentant l'effet du BMP9 sur les HUVECs. (A) En absence de BMP9, le VEGF induit la prolifération, la migration et l'angiogenèse des HUVECs. (B) La présence du BMP9 inhibe les effets du VEGF et réduit l'angiogenèse induite par le VEGF.

Ce projet essaye non seulement de mieux comprendre l'interaction entre la voie du VEGF et celle du BMP9 mais également l'implication de ces facteurs dans le développement de la télangiectasie hémorragique héréditaire. Par conséquent, il nous est important de comprendre si ce que nous avons observé dans les cellules HUVECs saines est modifié dans le cadre de la maladie. Dans ce but, nous avons longtemps réfléchi au meilleur moyen de mimer la maladie au sein des HUVECs. Dans un premier temps, nous avons tenté d'utiliser des siARN ciblant ALK1. Cependant, après avoir réalisé les tests de prolifération et migration, nous nous sommes rendu compte que cette solution était trop radicale. La diminution du niveau d'ALK1 de plus de 90% provoque une prolifération et une migration trop élevée et il n'était alors plus possible d'observer l'effet du VEGF par rapport aux cellules non stimulées. Dans un second temps, nous avons pensé à utiliser la

technique Crispr-Cas9 pour venir modifier génétiquement les HUVECs afin de générer des mutants d'ALK1. Néanmoins, à notre connaissance cette technique est très peu utilisée pour modifier les cellules endothéliales primaires humaines. La mise en place de cette manipulation aurait nécessité beaucoup de temps et de mises au point sans être certain qu'elle aurait donné de bons résultats (Abrahimi et al. 2016). La collaboration avec le docteur Luisa-Maria Botella de l'université de Madrid nous a fourni les moyens de pouvoir analyser la physiologie de cellules mutées pour ALK1. En effet, ils possèdent des cellules endothéliales, HUVECs, provenant de patients ayant déclaré la maladie. Comme mentionné dans les résultats, nous avons obtenu deux batch de cellules de donneurs différents avec une mutation différente mais affectant le gène ACVRL1. Les résultats obtenus avec ces cellules de patients HHT2 nous ont permis de conclure que l'effet du BMP9 est dérégulé dans celles-ci. L'analyse de la migration nous montre clairement que le VEGF est toujours capable d'induire cet effet alors que le BMP9 ne possède plus la capacité de réduire la migration induite par le VEGF. A notre connaissance, aucun autre groupe n'a utilisé des HUVECs provenant de patients HHT2 pour les soumettre à des tests fonctionnels. Il est donc difficile de se baser sur des précédents pour comprendre les résultats obtenus. Ainsi, bien que les tests de migration en scratch assay nous aient permis d'obtenir de bons résultats, nous n'avons jamais réussi à obtenir de résultats corrects en prolifération par incorporation au BrdU. Afin de potentiellement comprendre ce résultat, nous avons analysé la capacité de ces cellules mutées à former des tubes au sein du matrigel. Ce test permet de récapituler l'angiogenèse des cellules endothéliales car pour pouvoir former ces tubes, elles doivent être capables de migrer et proliférer. De manière intéressante, les HUVECs HHT2 ne sont pas capables de former un réseau organisé de tubes comme le font les HUVECs saines. Par conséquent, les mutations au sein du gène ACVRL1 codant pour ALK1, empêchent le BMP9 de pouvoir réguler négativement la migration induite par le VEGF. De plus ces cellules mutées souffrant de l'haploinsuffisance d'ALK1 ont de grandes difficultés à proliférer normalement et à former des tubes organisés.

En conclusion, le BMP9 est un facteur favorisant la quiescence des cellules endothéliales. Cet effet permet d'empêcher les facteurs pro-angiogènes d'induire une trop forte activation de l'angiogenèse. Chez les patients souffrant de la télangiectasie hémorragique héréditaire de type 2, le niveau d'ALK1 fonctionnel est réduit. BMP9 n'est

alors plus suffisamment capable de réduire l'angiogenèse induite par ces facteurs conduisant au développement aberrant de vaisseaux.

Une fois le rôle du BMP9 défini au sein des cellules endothéliales, nous avons voulu répondre à la question concernant le mécanisme par lequel ce facteur régule négativement l'angiogenèse induite par le VEGF. Nous nous sommes donc intéressés aux voies de signalisation activées par le VEGF-A et par le BMP9. Le VEGF induit sa signalisation par liaison à un dimère de VEGFR2 qui subit des événements d'auto- et de trans-phosphorylation au niveau de résidus tyrosines. Ces sites phosphorylés constituent alors des sites d'ancrages pour de nombreuses protéines adaptatrices permettant la transduction du signal dans le cytoplasme et dans le noyau. *In fine*, ce signal amène à la régulation de gènes impliqués dans la modulation des fonctions des cellules endothéliales comme la prolifération ou la migration. De son côté, le BMP9 d'une manière similaire se lie à ses récepteurs parmi lesquels on retrouve ALK1. Cette interaction conduit à la phosphorylation de résidus sérines et thréonines du domaine cytoplasmique des récepteurs qui servent alors de sites de liaison pour des protéines cytoplasmiques responsables de la transduction du signal vers le noyau.

Une des voies intracellulaires activées par le VEGF-A est la cascade de signalisation des MAPKinases aboutissant à l'activation d'ERK1/2. Cette voie est connue pour réguler à la fois la prolifération et la migration des cellules endothéliales (Simons & Eichmann 2015). Elle constitue donc un point de départ idéal dans la compréhension de l'impact du BMP9 sur la signalisation du VEGF. En effet, une dérégulation de cette voie par des inhibiteurs spécifiques conduit à l'inhibition de la prolifération et de la migration des CEs (Hu et al. 2018; Chen et al. 2018). Les résultats obtenus par l'analyse de la phosphorylation d'ERK1/2 nous indiquent que le VEGF-A induit correctement son activation alors que le BMP9 n'en est pas capable. Cependant, de manière très surprenante, lorsque l'on combine les deux facteurs pour stimuler les HUVECs, on observe une augmentation plus importante de la phosphorylation des ERK1/2. Ce résultat est en complète discordance avec ce qui a été observé dans les tests fonctionnels. Une augmentation de la phosphorylation des ERK1/2 est généralement associée à une augmentation de la prolifération et de la migration et non pas à une diminution comme observé dans les résultats précédents. De plus, la littérature ne fournit aucune preuve qu'une sur-activation des ERK1/2 pourrait conduire à une inhibition de l'angiogenèse induite par le VEGF. Afin de comprendre ce résultat, nous avons également analysé l'activation du premier intermédiaire, le VEGFR2.

Cependant, la phosphorylation de ce récepteur n'est en aucun cas affectée par la stimulation des cellules avec le BMP9. Le niveau auquel la phosphorylation d'ERK1/2 est modifiée par le BMP9 se situe donc en aval du VEGFR2. La voie canonique du BMP9, via l'activation de son récepteur ALK1, sont les SMAD1/5/8. Leur activation et leur interaction avec le Co-Smad SMAD4 permet leur entrée dans le noyau et la régulation de gènes comme ID-1. L'analyse de la phosphorylation de cette voie nous a indiqué que le VEGF-A n'est pas capable d'activer seul cette voie alors que logiquement, le BMP9 induit la phosphorylation des SMAD1/5. Un résultat intéressant découlant de ces expériences est que la stimulation des HUVECs avec du VEGF et du BMP9 simultanément induit également une augmentation de la phosphorylation de SMAD1/5. Même si cette dernière n'est pas significativement différente de celle induite par le BMP9 seul, une tendance à la hausse est observée à chacune des expériences réalisées. En conclusion, lorsque le VEGF et le BMP9 stimulent simultanément les HUVECs, on observe une augmentation de l'activité à la fois des ERK1/2 et des SMAD1/5. Malgré le fait que certains articles fassent un lien entre l'activation des ERK1/2 et l'activation des SMAD2/3 dans certaines cellules épithéliales de la rétine, aucune information n'est disponible concernant un crosstalk entre ERK1/2 et SMAD1/5/8 dans les cellules endothéliales (Chen, Ye, et al. 2014; Chen, Xiao, et al. 2014).

La phosphatase PTEN est bien connue pour son rôle dans l'inactivation des voies de signalisation comme AKT, JNK, STAT ou encore FAK. Elle a longuement été étudiée dans le cadre de la recherche contre le cancer. En effet, le gène codant PTEN est un gène dit suppresseur de tumeur et dans de nombreux cas de cancers, PTEN apparaît diminué et conduit à une sur-activation de la signalisation des récepteurs RTKs (Chetram & Hinton 2012). Ces dernières années, PTEN semble de plus en plus apparaître comme un régulateur de la voie des ERK. Ainsi, le groupe de Eng a montré qu'une sur-expression de PTEN dans des cellules de cancer du sein (MCF-7) conduit à une inhibition de l'activation de la voie des MAPK. De plus, alors que PTEN déphosphoryle AKT au sein du cytoplasme, cette phosphatase inhibe ERK1/2 à l'intérieur du noyau. De nombreuses autres études ont également mis en évidence l'importance de PTEN dans la régulation de la phosphorylation des ERK1/2 dans le cadre de différents cancers (Chung et al. 2006; Ebbesen et al. 2016; Baker et al. 2018). L'importance de PTEN a également été observée dans les HUVECs dans lesquelles une augmentation de son expression conduit à une inhibition d'ERK1/2 et à la diminution de la prolifération et de la migration des cellules endothéliales (Kim et al.

2012). Nous avons donc émis une hypothèse selon laquelle l'augmentation de la phosphorylation d'ERK1/2 observée dans les cellules stimulées avec les deux ligands pourrait être due à une inactivation de cette phosphatase. Cette hypothèse a été renforcée par le fait que certains membres de la famille du TGF- β peuvent diminuer l'activité de PTEN par l'intermédiaire des SMADs (Arvai et al. 2015; Xiong et al. 2016). Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons analysé l'activité de PTEN en regardant son état de phosphorylation (la phosphatase sera inactive lorsqu'elle est phosphorylée) et son niveau total dans les HUVECs traitées suivant les mêmes conditions que précédemment. Ainsi, les résultats obtenus nous indiquent que le niveau total de PTEN n'est pas influencé par le traitement. Cependant, lorsque la condition VEGF est comparée avec la condition VEGF + BMP9, on remarque une augmentation significative de la phosphorylation de la phosphatase dans la deuxième condition. Notre hypothèse semble donc se vérifier mais nécessitera l'utilisation d'un inhibiteur de PTEN afin de vérifier que l'augmentation de la phosphorylation d'ERK1/2 est bien due à l'inhibition de PTEN par la voie BMP9/ALK1/SMAD1/5.

Afin de vérifier si ce mécanisme de régulation est unique à ERK1/2, nous avons également testé d'autres intermédiaires de signalisation du VEGF-A₁₆₅. En effet, pour induire la prolifération, la migration ou encore la survie et la perméabilité des cellules endothéliales, le VEGF fait intervenir d'autres molécules que celles de la voie de MAPKinases. Parmi celles-ci, la voie impliquant AKT est bien connue. Une protéine, beaucoup moins connue mais qui semble sortir de l'oubli ces dernières années est la MAPK p38. Ainsi, dans certaines conditions comme la présence de forces de cisaillements, le VEGF induit l'activation de p38 et permet la régulation de la migration, de la survie et de la perméabilité des cellules endothéliales (Gee et al. 2010; Simons et al. 2016). Les résultats obtenus avec les études de phosphorylation d'AKT et de p38 sont bien moins claires que pour ERK1/2. En effet, le VEGF-A₁₆₅ induit l'activation d'AKT. Cependant, nous n'observons qu'une légère augmentation lors de la stimulation combinant VEGF et BMP9. Cette dernière n'est pas significative. En ce qui concerne p38, VEGF et BMP9 seul semble activer la phosphorylation de p38. Cependant, les différentes expériences ne nous permettent pas de montrer une augmentation significative car il subsiste de grandes variations d'activation d'un réplicat à un autre. De plus, il semble que lorsque les deux ligands sont appliqués simultanément sur les HUVECs, la phosphorylation de p38 soit augmentée lorsqu'elle est comparée à celle induite par les facteurs séparément. Cependant

cette différence est uniquement significative entre la condition VEGF+BMP9 et BMP9 seul. En conclusion, BMP9 module la voie de signalisation du VEGF au niveau de la voie des ERK1/2 via l'intermédiaire de la phosphatase PTEN. Néanmoins, il n'est pas à exclure que certaines autres voies soient également impactées. En effet, malgré notre manque de résultats probant concernant la voie PI3K/AKT, plusieurs études récentes ont mis en évidence une voie de régulation impliquant BMP9/SMAD4/PI3K/AKT/PTEN. Ainsi, BMP9 active la voie ALK1/SMAD4 permettant de diminuer l'expression de la protéine CK2 (*Casein Kinase 2*). Cette dernière est capable de phosphoryler PTEN et de l'inactiver en la détachant de la membrane plasmique ; la rendant indisponible pour inhiber PI3K. Ces deux études mettent en lien direct BMP9, PTEN et la voie PI3K (Lee et al. 2016; Ola 2018).

Malgré le fait que la diminution de l'activité de PTEN puisse être une explication à la différence d'augmentation de la phosphorylation d'ERK1/2 entre les deux conditions, nous sommes allés plus loin dans le raisonnement. Ainsi, nous avons analysé l'impact du BMP9 sur l'internalisation du VEGFR2 induite par le VEGF-A₁₆₅. L'internalisation du VEGFR2 est une étape cruciale dans la signalisation du VEGF. Il a été montré par plusieurs groupes que ce phénomène est indispensable pour permettre au couple VEGF-A₁₆₅/VEGFR2 d'induire une activation complète de la phosphorylation des ERK1/2 et de permettre la prolongation de sa signalisation (Lampugnani et al. 2006; Gourlaouen et al. 2013; Herkenne et al. 2015). Les résultats obtenus à l'aide de la technique de biotinylation nous indiquent que lorsque BMP9 stimule les cellules en même temps que le VEGF (15 minutes de traitement), l'internalisation du VEGFR2 est légèrement plus importante que celle observée dans les cellules traitées uniquement avec le VEGF. Ce résultat se situe également en faveur de l'augmentation plus importante de la phosphorylation des ERK1/2 dans la condition combinant les deux ligands. Si le VEGFR2 est plus internalisé, il est protégé de l'activité des phosphatases membranaires et permet une prolongation de son signal et donc une augmentation de la phosphorylation des ERK1/2. Le fait qu'on n'observe pas une augmentation similaire pour AKT est probablement dû au fait que ce mécanisme d'internalisation prend une part beaucoup plus importante dans la signalisation via les ERK1/2. En effet, Herkenne et al ont notamment montré que l'utilisation d'un antagoniste de LRP-1, une protéine indispensable à l'internalisation du VEGFR2, affecte la phosphorylation d'ERK1/2 mais pas celle d'AKT.

Pour conclure, la stimulation des HUVECs par le VEGF-A induit une augmentation de la phosphorylation des ERK1/2 alors que le BMP9 induit l'activation des SMAD1/5. La présence combinée du VEGF et du BMP9 à la surface des HUVECs conduit à une augmentation plus importante de la phosphorylation des ERK et, dans une moindre mesure, de celle des SMAD1/5. Ces effets peuvent être expliqués par l'activation des SMADs par le BMP9 qui phosphoryle alors la phosphatase PTEN. Cette dernière est alors inactivée et n'est plus capable de déphosphoryler les ERK1/2 présents dans le noyau ; conduisant ainsi à leur sur-activation. De plus, nous avons remarqué que le BMP9 modifie l'internalisation du VEGFR2 induite par son ligand. L'augmentation de cette endocytose est également un élément de réponse à l'augmentation de l'activation des ERK1/2 (**Figure 45**).

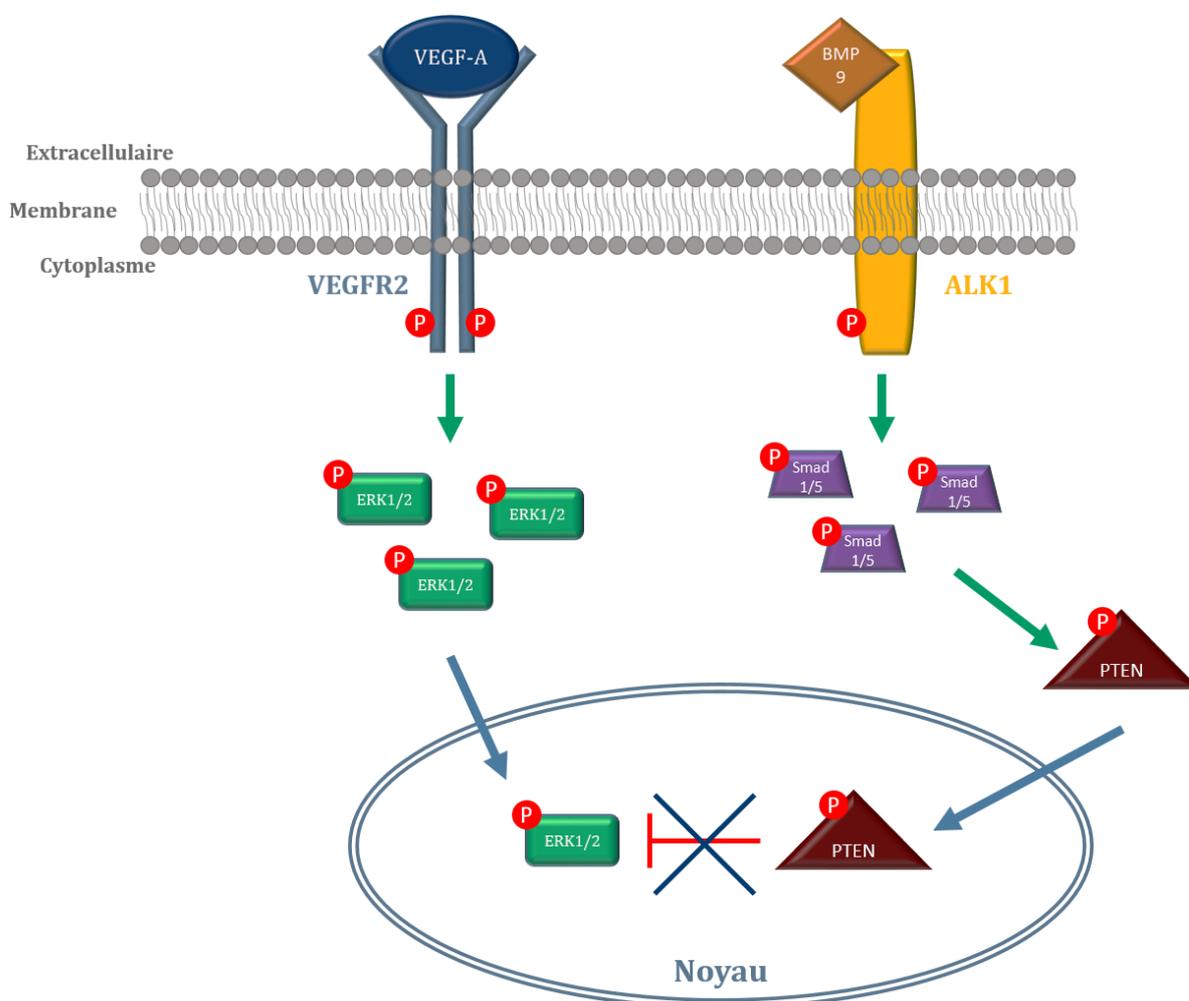


Figure 45 : Modèle schématisant l'impact du BMP9 dans l'activation d'ERK1/2 induite par le VEGF. Le VEGF se lie à son récepteur le VEGFR2 et permet d'induire des événements d'auto- et trans-phosphorylation. Les tyrosines phosphorylées servent de site d'ancrage à des protéines adaptatrices qui, *in fine*, permettent la phosphorylation d'ERK1/2 et leur entrée dans le noyau. En absence de BMP9, ERK1/2 est déphosphorylé au sein du noyau par la phosphatase PTEN et permet l'arrêt de la signalisation. La présence du BMP9 et sa liaison à son récepteur ALK1 provoque l'activation des Smad1/5 qui viennent phosphoryler PTEN. Cette phosphatase phosphorylée devient alors inactive et incapable d'inactiver ERK1/2 conduisant à sa sur-phosphorylation.

Le modèle ainsi présenté permet d'expliquer la sur-activation des ERK1/2 lorsque le BMP9 est présent au niveau des HUVECs. Cependant, il n'explique en aucun cas pourquoi cette activation est accompagnée d'une diminution de la prolifération et de la migration plutôt qu'à une augmentation. A notre connaissance, il n'a jamais été reporté qu'une augmentation de l'activité de la voie des MAPKinases conduit à une inhibition de la prolifération ou de la migration des cellules endothéliales. Il a par ailleurs été montré que l'activation d'ALK1 conduit à une diminution de la migration des cellules endothéliales par une inhibition de la voie des ERK. Cependant, les cellules ne sont pas traitées avec le BMP9 mais sont soumises à une surexpression ou une sous-expression d'ALK1 (David et al. 2007). Beaucoup plus récemment, Alsina-Sanchis et al ont montré que le traitement des HUVECs à l'aide de BMP9 (10 ng/ml) et de VEGF-A₁₆₅ (10 ng/ml) conduit à une diminution de la phosphorylation d'ERK1/2 et d'AKT induite par le VEGF (Alsina-Sanchis et al. 2018). Ce résultat est totalement contradictoire à ceux que nous avons obtenus mais extrêmement intéressants. En effet, lorsque l'on compare les timings de stimulation des HUVECs, nous remarquons rapidement qu'ils sont totalement différents. Dans nos analyses de la phosphorylation, les cellules sont traitées 15 minutes avec chacun des facteurs étudiés alors que dans leurs analyses, les cellules sont d'abord traitées 4h au BMP9 avant de subir un traitement de 30 minutes au VEGF. Les résultats obtenus par Alsina-Sanchis sont beaucoup plus en accord avec les informations obtenues dans nos tests fonctionnels. La durée de stimulation semble donc cruciale pour comprendre les effets du BMP9 sur les voies de signalisation du VEGF. Il se pourrait qu'à court terme, le BMP9 favorise le VEGF à activer ses voies de signalisation et permette rapidement d'augmenter les fonctions des cellules endothéliales alors qu'une prolongation de l'exposition des cellules à ce facteur lui permette d'empêcher le VEGF d'induire une trop forte activation des CEs et de l'angiogenèse.

La deuxième partie de ce projet porte sur l'étude d'un micro-ARN impliqué dans la télangiectasie hémorragique héréditaire. Les connaissances concernant le rôle de ces petites molécules dans cette maladie sont relativement minces. Jusqu'à présent trois miARN (miR-27, miR-205 et miR-210) ont été découverts comme différemment régulés chez les personnes atteintes de ce syndrome (Tabruyn et al. 2013; Zhang et al. 2013). Une autre preuve très récente de l'importance de ces molécules dans la régulation de la maladie est la présence importante, chez les patients HHT, de mutations faux-sens dans le gène codant la protéine DROSHA (Jiang et al. 2018). Cette protéine est notamment essentielle

dans la maturation du pri-miARN en pré-miARN. L'étude qui a été commencée il y a quelques années au sein de notre laboratoire a mis en évidence la dérégulation du miR-205 au sein du plasma provenant de différents patients HHT. Ils ont ensuite rapidement montré que ce micro-ARN diminuait l'angiogenèse et ciblait l'expression de SMAD1 et SMAD4. De plus, cette étude a montré que le TGF- β à faible concentration induit l'expression de ce miR. L'ensemble de ces données nous étant disponibles au sein de notre laboratoire, nous avons voulu poursuivre l'étude du rôle de miR-205 dans HHT en utilisant d'une part des cellules HUVECs de type HHT2 et d'autre part en analysant l'impact du BMP9 sur l'expression du miR-205. Les résultats que nous avons obtenu nous indiquent que, tout comme dans le plasma des patients, le niveau d'expression de 205 est réduit dans les HUVECs HHT2. Les recherches précédentes ont montré que le TGF- β est capable d'induire l'expression du miR-205. Dans cette thèse nous avons montré que le BMP9 est également capable d'induire son expression et que cette induction conduit à une diminution de ses cibles SMAD1 et SMAD4. Ce résultat peut paraître surprenant car les cibles de ce micro-ARN sont également les effecteurs cytoplasmiques du BMP9. Cette régulation pourrait alors constituer une boucle d'autorégulation négative de la voie de signalisation du BMP9. Les boucles de régulations négatives sont d'ailleurs fréquemment observées dans les processus de signalisation (Brabletz et al. 2011; Minami 2014; Vullhorst et al. 2015). La réalisation de la même expérimentation sur les cellules provenant de patients atteints d'HHT de type 2 nous indique que le BMP9 n'est plus capable d'induire l'expression du miR-205. Ce dernier résultat permet de conclure que la diminution du niveau du miR dans les cellules de patients et probablement dans leur plasma sanguin est due à une diminution de l'activité du BMP9. L'haploinsuffisance d'ALK1 empêche ce ligand de pouvoir induire correctement sa signalisation.

L'utilisation d'un programme de prédiction de cibles de microARN (TargetScan) afin de prédire les cibles de miR-205 a non seulement révélé SMAD1 et SMAD4, qui ont été confirmées, mais également beaucoup d'autres cibles potentielles. Parmi celles-ci, deux nous sont d'un grand intérêt. Il s'agit de PTEN et du VEGF. L'étude de l'impact du micro-ARN 205 sur l'expression de l'ARN messager de PTEN et de VEGF a été réalisée dans les HUVECs transfectées avec un pré-miR205 afin d'en augmenter son niveau d'expression cellulaire. Les résultats obtenus ont démontré que la présence de ce miR en quantité importante diminue à la fois l'expression de PTEN et du VEGF. En conclusion, il semble que le BMP9 puisse réguler l'expression de ces deux protéines en venant moduler le

niveau d'expression du miR-205. Ce micro-ARN joue donc un rôle central dans la signalisation du BMP9, à la fois comme instigateur d'une boucle de régulation négative mais également comme effecteur afin de moduler l'expression de protéines permettant au BMP9 de moduler les fonctions angiogènes induites par le VEGF (**Figure 46**).

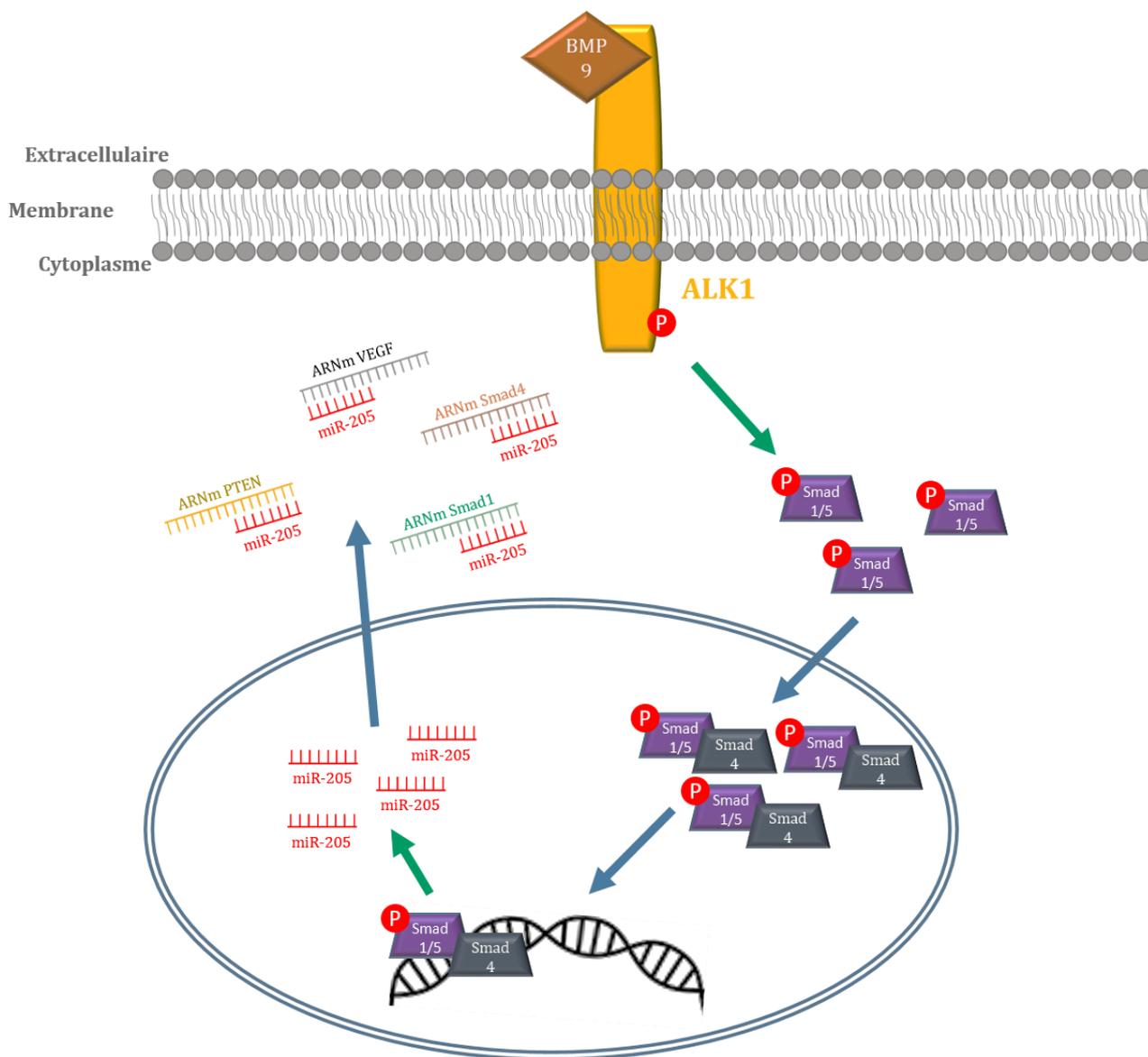


Figure 46 : Modèle schématisant l'impact du BMP9 sur le niveau d'expression du miR-205 et de ses cibles. BMP9 se lie à ALK1. L'activation de ce récepteur conduit à la phosphorylation des Smad1/5 et à leur liaison à Smad4. Le complexe entre dans le noyau et permet la régulation des gènes. Parmi ces gènes, BMP9 induit l'expression du micro-ARN 205. Ce dernier après avoir été mûré se lie aux ARN messagers de Smad1 et Smad4, permettant l'établissement d'une boucle d'autorégulation négative. De plus, ce miR-205 cible également l'ARN messager de PTEN et du VEGF.

2. Conclusion générale et perspectives

En conclusion, cette thèse montre l'importance du BMP9 dans la régulation négative de l'angiogenèse induite par le VEGF. L'hypothèse de départ selon laquelle il existe un lien entre la voie du VEGF et celle du BMP9 a été vérifiée. En effet, la première partie de ce travail nous indique que le BMP9 diminue l'angiogenèse induite par le VEGF en modifiant potentiellement, d'une part les interactions entre le VEGFR2 et ALK1 et, d'autre part, en modulant les voies de signalisation intracellulaires. La manière dont ces voies sont modulées est encore floue car notre modèle montre qu'avec une stimulation à court terme (15 minutes), le BMP9 inactive la phosphatase PTEN et permet une sur-activation d'ERK1/2 qui normalement est associée à une augmentation de l'angiogenèse. Cependant, une stimulation à plus long terme semble inhiber cette phosphorylation des ERK1/2 comme le montre Alsina-Sanchis, résultat qui concorde avec la diminution de la prolifération et migration observée dans nos résultats (Alsina-Sanchís et al. 2018). Le mécanisme selon lequel le BMP9 régule négativement l'angiogenèse nécessitera donc d'approfondir l'étude des voies de signalisation impliquées et probablement d'analyser l'importance du temps de stimulation. Enfin, cette partie montre également que le BMP9 est capable d'augmenter l'internalisation induite par le VEGF. Ce résultat ouvre la porte à de nombreuses opportunités dans l'étude du trafficking du VEGFR2 suite à une stimulation au BMP9. En effet, même si cette étude montre que ce facteur augmente l'internalisation, nous ne savons toujours pas si c'est pour permettre de prolonger sa signalisation ou justement pour adresser le récepteur à la machinerie de recyclage ou de dégradation (Kofler et al. 2018). La deuxième partie s'est focalisée sur l'étude du rôle de miR-205 dans la voie de signalisation du BMP9. Nous avons alors mis en évidence que ce micro-ARN est modulé positivement par le BMP9 et permet dans un premier temps de mettre en place une boucle d'autorégulation négative en ciblant SMAD1 et SMAD4, deux effecteurs cytoplasmique du BMP9 et dans un deuxième temps de diminuer le niveau d'expression de PTEN et du VEGF permettant d'influer sur les effets angiogènes du BMP9. Cette partie ouvre potentiellement de nouvelles opportunités thérapeutiques. En effet, comme le miR-205 semble important pour la signalisation du BMP9 et que le niveau de ce miR est diminué chez les patients souffrant d'HHT, on pourrait imaginer la mise en place d'une thérapie où les patients seraient traités avec du miR-205 afin de compenser la perte de signalisation du BMP9. Le fait que BMP9 induise l'expression de miR-205 et par conséquent réduise l'expression du VEGF permet d'établir un lien entre les deux parties de

ce manuscrit. En effet, d'une part le BMP9 réduit l'angiogenèse induite par le VEGF par l'intermédiaire des voies de signalisations et d'autre part ce même ligand diminue le niveau d'expression du VEGF, contribuant également à la régulation négative de l'angiogenèse (**Figure 47**).

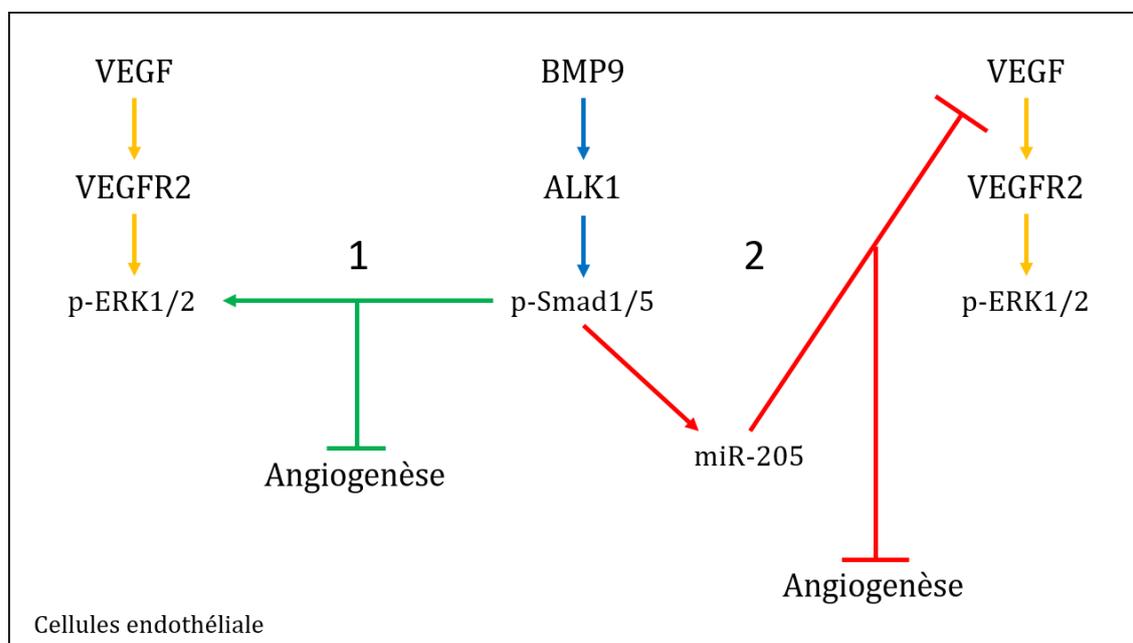


Figure 47 : Modèle récapitulant les effets du BMP9 sur la physiologie des cellules endothéliales et l'angiogenèse induite par le VEGF. (1) La liaison du BMP9 sur ALK1 engendre l'activation des Smad1/5 qui modifient les voies de signalisation du VEGF provoquant une diminution de l'angiogenèse induite par ce ligand. (2) L'activation des Smad1/5 modifie l'expression de différents gènes et permet l'augmentation de l'expression du miR-205. Ce dernier se fixe alors sur l'ARN messager de ces cibles dont celui du VEGF et contribue à la diminution du niveau de VEGF et à la diminution de l'angiogenèse. Chez les patients, une mutation dans le gène codant ALK1 provoque une diminution de la signalisation du BMP9. Ceci empêche alors le BMP9 d'inhiber d'une part la signalisation du VEGF et d'autre part son niveau d'expression. Ces dérégulations provoquent un excès d'angiogenèse.

En résumé, en absence de BMP9, le VEGF stimule les cellules endothéliales saines en se fixant sur le VEGFR2. Ceci conduit à divers événements de phosphorylation et notamment à l'activation d'ERK1/2 et à leur entrée dans le noyau afin de réguler l'expression de gènes permettant de moduler la prolifération, la migration, la tubulogenèse et *in fine* l'angiogenèse. Cette étape est indispensable à la phase d'activation de l'angiogenèse. Cependant une cellule endothéliale n'est jamais uniquement stimulée par le VEGF et d'autres facteurs entre en jeu. C'est ainsi que la liaison du BMP9 à son récepteur ALK1 conduit à l'activation des SMAD1/5/8 et permet de diminuer l'angiogenèse induite par le VEGF d'une part en modifiant les voies de signalisation du VEGF et d'autre part en diminuant son niveau d'expression. Le BMP9 contribue donc à la quiescence des CEs. Cette étape fait partie de la phase de maturation de l'angiogenèse et est tout aussi

importante. En effet, une trop forte activation de cette dernière conduit à l'apparition de différentes pathologies. C'est d'ailleurs ce qu'il semble se passer dans le cadre de la télangiectasie hémorragique héréditaire. Ainsi, la mutation d'ALK1 empêche le BMP9 d'activer correctement sa voie. Il ne régule plus négativement le VEGF et conduit à une activation prolongée et trop importante des cellules endothéliales. Ceci provoque l'apparition de malformations artério-veineuse caractérisées par de gros vaisseaux fragiles dont les cellules prolifèrent et migrent de manière aberrante.

Bibliographie

- Aase, K. et al., 2001. Vascular Endothelial Growth Factor-B – Deficient Mice Display an Atrial Conduction Defect. , pp.358–364.
- AAassar, O.S., Friedman, C.M. & White, R.I., 1991. The natural history of epistaxis in hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Laryngoscope*, 101, pp.977–980.
- Abdalla, S.A., 2005. Hereditary haemorrhagic telangiectasia: current views on genetics and mechanisms of disease. *Journal of Medical Genetics*, 43(2), pp.97–110.
- Abraham, S. et al., 2015. A Rac/Cdc42 exchange factor complex promotes formation of lateral filopodia and blood vessel lumen morphogenesis. *Nature Communications*, 6, pp.1–14.
- Abrahimi, P. et al., 2016. HHS Public Access. , 117(2), pp.121–128.
- Adams, R.H. & Eichmann, A., 2010. Axon guidance molecules in vascular patterning. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2(5), pp.1–19.
- Akatsu, Y. et al., 2017. Dual targeting of vascular endothelial growth factor and bone morphogenetic protein-9/10 impairs tumor growth through inhibition of angiogenesis. *Cancer Science*, 108(1), pp.151–155.
- Albin, V. et al., 2011. Immunosuppressor FK506 Increases Endoglin and Activin Receptor-Like Kinase 1 Expression and Modulates Transforming Growth Factor- β 1 Signaling in Endothelial Cells. *Molecular Pharmacology*, 79(5), pp.833–843.
- Albiñana, V. et al., 2010. Estrogen therapy for hereditary haemorrhagic telangiectasia (HHT): Effects of raloxifene, on Endoglin and ALK1 expression in endothelial cells. *Thrombosis and Haemostasis*, 103(3), pp.525–534.
- Albuquerque, R.J.C. et al., 2009. Alternatively spliced vascular endothelial growth factor receptor-2 is an essential endogenous inhibitor of lymphatic vessel growth. *Nature Medicine*, 15(9), pp.1023–1030.
- Alitalo, K., 2011. The lymphatic vasculature in disease. *Nature Medicine*, 17(11), pp.1371–1380.
- Allende, M.L. & Proia, R.L., 2002. Sphingosine-1-phosphate receptors and the development of the vascular system. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1582(1–3), pp.222–227.
- Alsina-Sanchís, E. et al., 2018. *ALK1 (Activin-Receptor Like Kinase 1) Loss Results in Vascular Hyperplasia in Mice and Humans Through PI3K (Phosphatidylinositol 3-Kinase) Activation*,
- Arthur, H.M. et al., 2000. Endoglin , an Ancillary TGF β Receptor , Is Required for Extraembryonic Angiogenesis and Plays a Key Role in Heart Development. , 53, pp.42–53.
- Arvai, K.J. et al., 2015. A transition zone showing highly discontinuous or alternating levels of stem cell and proliferation markers characterizes the development of PTEN-haploinsufficient colorectal cancer. *PLoS ONE*, 10(6), pp.1–15.
- Bajou, K. et al., 2014. PAI-1 mediates the antiangiogenic and profibrinolytic effects of 16K prolactin. *Nature Medicine*, 20(7), pp.741–747.
- Baker, A. et al., 2018. Notch-1-PTEN-ERK1/2 signaling axis promotes HER2+ breast cancer cell proliferation and stem cell survival. *Oncogene*, 37(33), pp.4489–4504.

- Ballmer-Hofer, K. et al., 2011. Neuropilin-1 promotes VEGFR-2 trafficking through Rab11 vesicles thereby specifying signal output. *Blood*, 118(3), pp.816–826.
- Barrientos, S. et al., 2008. Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair and Regeneration*, 16(5), pp.585–601.
- Basagiannis, D. & Christoforidis, S., 2016. Constitutive endocytosis of VEGFR2 protects the receptor against shedding. *Journal of Biological Chemistry*, 291(32), pp.16892–16903.
- Becker, P.M. et al., 2005. Neuropilin-1 regulates vascular endothelial growth factor-mediated endothelial permeability. *Circulation Research*, 96(12), pp.1257–1265.
- Beets, K. et al., 2013. Robustness in angiogenesis: Notch and BMP shaping waves. *Trends in Genetics*, 29(3), pp.140–149.
- Ben-Haim, N. et al., 2006. The Nodal Precursor Acting via Activin Receptors Induces Mesoderm by Maintaining a Source of Its Convertases and BMP4. *Developmental Cell*, 11(3), pp.313–323.
- Benzinou, M. et al., 2012. Mouse and human strategies identify PTPN14 as a modifier of angiogenesis and hereditary haemorrhagic telangiectasia. *Nature Communications*, 3.
- Bergers, G. & Benjamin, L.E., 2003. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nature Reviews Cancer*, 3(6), pp.401–410.
- Bidart, M. et al., 2012. BMP9 is produced by hepatocytes and circulates mainly in an active mature form complexed to its prodomain. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 69(2), pp.313–324.
- Blanco, F.J. et al., 2005. Interaction and functional interplay between endoglin and ALK-1, two components of the endothelial transforming growth factor- β receptor complex. *Journal of Cellular Physiology*, 204(2), pp.574–584.
- Blasi, F. & Carmeliet, P., 2002. uPAR: A versatile signalling orchestrator. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 3(12), pp.932–943.
- Borges, E., Jan, Y. & Ruoslahti, E., 2000. Platelet-derived growth factor receptor β and vascular endothelial growth factor receptor 2 bind to the β 3 integrin through its extracellular domain. *Journal of Biological Chemistry*, 275(51), pp.39867–39873.
- Botella, L.-M. et al., 2015. Research on potential biomarkers in hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Frontiers in Genetics*, 6(March), pp.1–9.
- Bourdeau, A. et al., 1999. A murine model of hereditary hemorrhagic telangiectasia Find the latest version : A murine model of hereditary hemorrhagic telangiectasia. , 104(10), pp.1343–1351.
- Bourdeau, A. et al., 2001. Potential role of modifier genes influencing transforming growth factor- β 1 levels in the development of vascular defects in endoglin heterozygous mice with hereditary hemorrhagic telangiectasia. *American Journal of Pathology*, 158(6), pp.2011–2020.
- Brabletz, S. et al., 2011. The ZEB1/miR-200 feedback loop controls Notch signalling in cancer cells. *EMBO Journal*, 30(4), pp.770–782.
- Braverman, I.M., Keh, A. & Jacobson, B.S., 1990. Ultrastructure and Three-Dimensional Organization of the Telangiectases of Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia. *Journal of Investigative Dermatology*, 95(4), pp.422–427.
- Bromberg, J. & Darnell, J.E., 2000. The role of STATs in transcriptional control and their impact

- on cellular function. *Oncogene*, 19(21), pp.2468–2473.
- Bruns, A.F. et al., 2010. Ligand-stimulated VEGFR2 signaling is regulated by co-ordinated trafficking and proteolysis. *Traffic*, 11(1), pp.161–174.
- Van Bueren, K.L. & Black, B.L., 2012. Regulation of endothelial and hematopoietic development by the ETS transcription factor Etv2. *Current Opinion in Hematology*, 19(3), pp.199–205.
- Busceti, C.L. et al., 2017. Dickkopf-3 upregulates VEGF in cultured human endothelial cells by activating activin receptor-like kinase 1 (ALK1) pathway. *Frontiers in Pharmacology*, 8(MAR), pp.1–10.
- Cao, Y. et al., 1996. In vivo angiogenic activity and hypoxia induction of heterodimers of placenta growth factor/vascular endothelial growth factor. *Journal of Clinical Investigation*, 98(11), pp.2507–2511.
- Caporali, A. et al., 2017. Contribution of pericyte paracrine regulation of the endothelium to angiogenesis. *Pharmacology and Therapeutics*, 171, pp.56–64.
- Cardone MH, Roy N, Stennicke HR, Salvesen GS, Franke TF, Stanbridge E, Frisch S, R.J., 1998. Phosphorylation., Regulation of cell death protease caspase-9. *Science*, 282(November), pp.1318–1321.
- Cariboni, A. et al., 2011. VEGF signalling controls GnRH neuron survival via NRP1 independently of KDR and blood vessels. *Development*, 138(17), pp.3723–3733.
- Carmeliet, P. et al., 1996. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature*, 380(6573), pp.435–439.
- Carmeliet, P., 2005. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature*, 438(7070), pp.932–936.
- Carmeliet, P., 2000. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nature Medicine*, 6(4), pp.389–395.
- Carmeliet, P. & Jain, R.K., 2011. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature*, 473(7347), pp.298–307.
- Castonguay, R. et al., 2011. Soluble endoglin specifically binds bone morphogenetic proteins 9 and 10 via its orphan domain, inhibits blood vessel formation, and suppresses tumor growth. *Journal of Biological Chemistry*, 286(34), pp.30034–30046.
- Chen, H. et al., 2013. Context-dependent signaling defines roles of BMP9 and BMP10 in embryonic and postnatal development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(29), pp.11887–11892.
- Chen, T.T. et al., 2010. Anchorage of VEGF to the extracellular matrix conveys differential signaling responses to endothelial cells. *Journal of Cell Biology*, 188(4), pp.595–609.
- Chen, X., Ye, S., et al., 2014. ERK1/2 pathway mediates epithelial-mesenchymal transition by cross-interacting with TGF β /Smad and Jagged/Notch signaling pathways in lens epithelial cells. *International Journal of Molecular Medicine*, 33(6), pp.1664–1670.
- Chen, X. et al., 2018. Myeloperoxidase modification of high-density lipoprotein suppresses human endothelial cell proliferation and migration via inhibition of ERK1/2 and Akt activation. *Atherosclerosis*, 273, pp.75–83.
- Chen, X., Xiao, W., et al., 2014. The complex interplay between ERK1/2, TGF β /Smad, and Jagged/Notch signaling pathways in the regulation of epithelial-mesenchymal transition in

- retinal pigment epithelium cells. *PLoS ONE*, 9(5), pp.1–9.
- Chetram, M.A. & Hinton, C. V., 2012. PTEN regulation of ERK1/2 signaling in cancer. *Journal of Receptors and Signal Transduction*, 32(4), pp.190–195.
- Choi, E. et al., 2014. Novel Brain Arteriovenous Malformation Mouse Models for Type 1 Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia. , 9(2).
- Chu, P. et al., 2018. miR-205 regulates the proliferation and invasion of ovarian cancer cells via suppressing PTEN / SMAD4 expression. *Oncology Letters*, pp.7571–7578.
- Chung, A.S. & Ferrara, N., 2011. Developmental and Pathological Angiogenesis. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 27(1), pp.563–584.
- Chung, J.H. et al., 2006. The ERK1/2 pathway modulates nuclear PTEN-mediated cell cycle arrest by cyclin D1 transcriptional regulation. *Human Molecular Genetics*, 15(17), pp.2553–2559.
- Cirulli, A. et al., 2003. Vascular endothelial growth factor serum levels are elevated in patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Acta Haematologica*, 110(1), pp.29–32.
- di Clemente, N. & Belville, C., 2006. Anti-Müllerian hormone receptor defect. *Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism*, 20(4), pp.599–610.
- Cole, S.G., 2005. A new locus for hereditary haemorrhagic telangiectasia (HHT3) maps to chromosome 5. *Journal of Medical Genetics*, 42(7), pp.577–582.
- Crist, A.M. et al., 2018. Vascular deficiency of Smad4 causes arteriovenous malformations : a mouse model of Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia. *Angiogenesis*, 21(2), pp.363–380.
- Dakeishi, M. et al., 2002. Genetic epidemiology of hereditary hemorrhagic telangiectasia in a local community in the northern part of Japan. *Human Mutation*, 19(2), pp.140–148.
- Damjanovich, K. et al., 2011. 5'UTR mutations of ENG cause hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 6(1), pp.1–11.
- David, L. et al., 2008. Bone morphogenetic protein-9 is a circulating vascular quiescence factor. *Circulation Research*, 102(8), pp.914–922.
- David, L. et al., 2007. Identification of BMP9 and BMP10 as functional activators of the orphan activin receptor-like kinase 1 (ALK1) in endothelial cells. *Blood*, 109(5), pp.1953–1961.
- David, L., Feige, J.J. & Bailly, S., 2009. Emerging role of bone morphogenetic proteins in angiogenesis. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 20(3), pp.203–212.
- Dickson, M.C. et al., 1995. Defective haematopoiesis and vasculogenesis in transforming growth factor-beta 1 knock out mice. *Development*, 121(6), pp.1845–1854.
- ten Dijke, P., Goumans, M.-J. & Pardali, E., 2008. Endoglin in angiogenesis and vascular diseases. *Angiogenesis*, 11(1), pp.79–89.
- Dupuis-Girod, S. et al., 2016. Effect of bevacizumab nasal spray on epistaxis duration in hereditary hemorrhagic telangiectasia: A randomized clinical trial. *JAMA - Journal of the American Medical Association*, 316(9), pp.934–942.
- Dupuis-Girod, S., Cottin, V. & Shovlin, C.L., 2017. The Lung in Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia. *Respiration*, 94(4), pp.315–330.
- Dyer, L.A., Pi, X. & Patterson, C., 2014. The role of BMPs in endothelial cell function and dysfunction. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 25(9), pp.472–480.

- Ebbesen, S.H. et al., 2016. Pten loss promotes MAPK pathway dependency in HER2/neu breast carcinomas. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(11), pp.3030–3035.
- Eble, J. a & Niland, S., 2009. The extracellular matrix of blood vessels. *Current pharmaceutical design*, 15, pp.1385–1400.
- Faughnan, M.E. et al., 2011. International guidelines for the diagnosis and management of hereditary haemorrhagic telangiectasia. *Journal of Medical Genetics*, 48(2), pp.73–87.
- Fernández-L, A. et al., 2006. Hereditary hemorrhagic telangiectasia, a vascular dysplasia affecting the TGF-beta signaling pathway. *Clinical medicine & research*, 4(1), pp.66–78.
- Ferrara, N. et al., 2004. Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer. *Nature Reviews Drug Discovery*, 3(5), pp.391–400.
- Ferrara, N., Clapp, C. & Weiner, R., 1991. The 16K fragment of prolactin specifically inhibits basal or fibroblast growth factor stimulated growth of capillary endothelial cells. *Endocrinology*, 129(2), pp.896–900.
- Fiorella, M.L. et al., 2005. Outcome of septal dermoplasty in patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Laryngoscope*, 115(2), pp.301–305.
- Fischer, C. et al., 2007. Anti-PlGF Inhibits Growth of VEGF(R)-Inhibitor-Resistant Tumors without Affecting Healthy Vessels. *Cell*, 131(3), pp.463–475.
- Fong, G.H. et al., 1995. Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature*, 376(6535), pp.66–70.
- De Franceschi, N. et al., 2015. Integrin traffic - the update. *Journal of Cell Science*, 128(5), pp.839–852.
- Fukumura, D. et al., 2001. Predominant role of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis and vascular permeability.
- Gaengel, K. et al., 2009. Endothelial-mural cell signaling in vascular development and angiogenesis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 29(5), pp.630–638.
- Galat, A., 2011. Common structural traits for cystine knot domain of the TGFβ superfamily of proteins and three-fingered ectodomain of their cellular receptors. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 68(20), pp.3437–3451.
- Gallardo-Vara, E. et al., 2016. Transcription factor KLF6 upregulates expression of metalloprotease MMP14 and subsequent release of soluble endoglin during vascular injury. *Angiogenesis*, 19(2), pp.155–171.
- Gallione, C. et al., 2010. Overlapping spectra of SMAD4 mutations in juvenile polyposis (JP) and JP-HHT syndrome. *American Journal of Medical Genetics, Part A*, 152(2), pp.333–339.
- Gallione, C.J. et al., 2004. A combined syndrome of juvenile polyposis and hereditary haemorrhagic telangiectasia associated with mutations in MADH4 (SMAD4). *Lancet*, 363(9412), pp.852–859.
- Gampel, A. et al., 2006. VEGF regulates the mobilization of VEGFR2/KDR from an intracellular endothelial storage compartment. *Blood*, 108(8), pp.2624–2631.
- García de Vinuesa, A. et al., 2016. BMP signaling in vascular biology and dysfunction. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 27, pp.65–79.
- Garrido-martin, E.M. et al., 2014. Common and Distinctive Pathogenetic Features of Arteriovenous

- Malformations in Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia 1 and Hereditary Hemorrhagic. , pp.2232–2236.
- Gatza, C.E., Oh, S.Y. & Blobe, G.C., 2010. Roles for the type III TGF- β receptor in human cancer. *Cellular Signalling*, 22(8), pp.1163–1174.
- Ge, G. et al., 2005. GDF11 Forms a Bone Morphogenetic Protein 1-Activated Latent Complex That Can Modulate Nerve Growth Factor-Induced Differentiation of PC12 Cells GDF11 Forms a Bone Morphogenetic Protein 1-Activated Latent Complex That Can Modulate Nerve Growth Factor-Induc. *Molecular and Cell Biology*, 25(14), pp.5846–5858.
- Gee, E., Milkiewicz, M. & Haas, T.L., 2010. p38 MAPK activity is stimulated by vascular endothelial growth factor receptor 2 activation and is essential for shear stress-induced angiogenesis. *Journal of Cellular Physiology*, 222(1), pp.120–126.
- Geisthoff, U.W. et al., 2014. Treatment of epistaxis in hereditary hemorrhagic telangiectasia with tranexamic acid - A double-blind placebo-controlled cross-over phase IIIB study. *Thrombosis Research*, 134(3), pp.565–571.
- Van Gent, M.W.F. et al., 2010. Real prevalence of pulmonary right-to-left shunt according to genotype in patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia: A transthoracic contrast echocardiography study. *Chest*, 138(4), pp.833–839.
- Gerber, H.P., Dixit, V. & Ferrara, N., 1998. Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells. *J Biol Chem*, 273(21), pp.13313–13316.
- Gerhardt, H. & Betsholtz, C., 2005. How do endothelial cells orientate? *Exs*, (94), pp.3–15.
- Giacomini, A. et al., 2016. Blocking the FGF/FGFR system as a “two-compartment” antiangiogenic/antitumor approach in cancer therapy. *Pharmacological Research*, 107, pp.172–185.
- Gilles, R., 2006. *Physiologie animale*,
- Giordano, A. et al., 2014. Tirofiban induces VEGF production and stimulates migration and proliferation of endothelial cells. *Vascular Pharmacology*, 61(2–3), pp.63–71.
- Gkatzis, K. et al., 2016. in the Development of Arteriovenous Malformations. , pp.707–717.
- Goumans, M.-J. et al., 2002. Balancing the activation state of the endothelium via two distinct TGF-beta type I receptors. *The EMBO journal*, 21(7), pp.1743–53..
- Goumans, M.-J. et al., 2017. Bone Morphogenetic Proteins in Vascular Homeostasis and Disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*.
- Goumans, M.J. et al., 2003. Activin receptor-like kinase (ALK) 1 is an antagonistic mediator of lateral TGF [beta]/ALK5 signaling. *Molecular cell*, 12, pp.817–828.
- Gourlaouen, M. et al., 2013. Essential role for endocytosis in the growth factor-stimulated activation of ERK1/2 in endothelial cells. *Journal of Biological Chemistry*, 288(11), pp.7467–7480.
- Govani, F.S. & Shovlin, C.L., 2009. Hereditary haemorrhagic telangiectasia: A clinical and scientific review. *European Journal of Human Genetics*, 17(7), pp.860–871.
- Grigg, C., Anderson, D. & Earnshaw, J., 2017. Diagnosis and Treatment of Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia. *Ochsner Journal*, 17(2), pp.157–161.

- Grünewald, F.S. et al., 2010. Structure-function analysis of VEGF receptor activation and the role of coreceptors in angiogenic signaling. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 1804(3), pp.567–580.
- Guilhem, A. et al., 2013. Immunological abnormalities associated with hereditary haemorrhagic telangiectasia. *Journal of Internal Medicine*, 274(4), pp.351–362.
- Guilhem, A. et al., 2017. Intra-venous bevacizumab in hereditary hemorrhagic telangiectasia (HHT): A retrospective study of 46 patients. *PLoS ONE*, 12(11), pp.1–12.
- De Gussem, E.M. et al., 2016. Life expectancy of parents with Hereditary Haemorrhagic Telangiectasia. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 11(1), pp.1–8.
- Hanahan, D. & Folkman, J., 1996. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*, 86(3), pp.353–364.
- Harrison, R.E. et al., 2003. Molecular and functional analysis identifies ALK-1 as the predominant cause of pulmonary hypertension related to hereditary haemorrhagic telangiectasia. *Journal of medical genetics*, 40(12), pp.865–871.
- Hawinkels, L.J.A.C. et al., 2010. Matrix metalloproteinase-14 (MT1-MMP)-mediated endoglin shedding inhibits tumor angiogenesis. *Cancer Research*, 70(10), pp.4141–4150.
- Herkenne, S. et al., 2015. The interaction of uPAR with VEGFR2 promotes VEGF-induced angiogenesis. *Science Signaling*, 8(403), pp.1–11.
- Hood, J.D. et al., 2018. rapid communication. , pp.1054–1058.
- Hosman, A. et al., 2015. Follow-up of Thalidomide treatment in patients with Hereditary Haemorrhagic Telangiectasia. *Rhinology*, 53(4), pp.340–4.
- Hu, W.-H. et al., 2018. Polydatin suppresses VEGF-induced angiogenesis through binding with VEGF and inhibiting its receptor signaling. *The FASEB Journal*, p.fj.201800750R. Hu, Y. et al., 2016. miRNA-205 targets VEGFA and FGF2 and regulates resistance to chemotherapeutics in breast cancer. *Cell death & disease*, 7(6), p.e2291.
- Hua, J. et al., 2010. Recombinant human vegf165b inhibits experimental choroidal neovascularization. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 51(8), pp.4282–4288.
- Huse, M. et al., 2001. The TGF β Receptor Activation Process. *Molecular Cell*, 8(3), pp.671–682.
- Ichimura, K. et al., 2016. Topical application of timolol decreases the severity and frequency of epistaxis in patients who have previously undergone nasal dermoplasty for hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Auris Nasus Larynx*, 43(4), pp.429–432.
- Ikeda, S. et al., 2005. Novel role of ARF6 in vascular endothelial growth factor-induced signaling and angiogenesis. *Circulation Research*, 96(4), pp.467–475.
- Iruela-Arispe, M.L. & Davis, G.E., 2009. Cellular and Molecular Mechanisms of Vascular Lumen Formation. *Developmental Cell*, 16(2), pp.222–231.
- Iyer, N.K. et al., 2010. SMAD4 mutation and the combined syndrome of juvenile polyposis syndrome and hereditary haemorrhagic telangiectasia. *Thorax*, 65(8), pp.745–746.
- Jakobsson, L. et al., 2006. Heparan Sulfate in trans Potentiates VEGFR-Mediated Angiogenesis. *Developmental Cell*, 10(5), pp.625–634.
- Jakobsson, L. & van Meeteren, L.A., 2013. Transforming growth factor B family members in regulation of vascular function: In the light of vascular conditional knockouts. *Experimental*

- Cell Research*, 319(9), pp.1264–1270.
- Jarad, M. et al., 2017. Release of endothelial cell associated VEGFR2 during TGF- β modulated angiogenesis in vitro. *BMC Cell Biology*, 18(1), pp.1–10.
- Jiang, X. et al., 2018. Inactivating mutations in drosha mediate vascular abnormalities similar to hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Science Signaling*, 11(513), pp.1–14.
- Jinnin, M. et al., 2009. NIH Public Access. , 14(11), pp.1236–1246.
- Johnson, D.W. et al., 1996. Mutations in the activin receptor-like kinase 1 gene in hereditary haemorrhagic telangiectasia type 2. *Nature genetics*, 13(2), pp.189–195.
- Jopling, H. et al., 2014. Endosome-to-Plasma Membrane Recycling of VEGFR2 Receptor Tyrosine Kinase Regulates Endothelial Function and Blood Vessel Formation. *Cells*, 3(2), pp.363–385.
- Kaipainen, A. et al., 1995. Expression of the fms-like tyrosine kinase 4 gene becomes restricted to lymphatic endothelium during development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(8), pp.3566–70.
- Kappas, N.C. et al., 2008. The VEGF receptor Flt-1 spatially modulates Flk-1 signaling and blood vessel branching. *Journal of Cell Biology*, 181(5), pp.847–858.
- Kawasaki, K. et al., 2014. Genetic variants of Adam17 differentially regulate TGF signaling to modify vascular pathology in mice and humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(21), pp.7723–7728.
- Kendall, R.L. et al., 1999. Vascular endothelial growth factor receptor KDR tyrosine kinase activity is increased by autophosphorylation of two activation loop tyrosine residues. *Journal of Biological Chemistry*, 274(10), pp.6453–6460.
- Kim, J.H. et al., 2012. BMP9 induces EphrinB2 expression in endothelial cells through an Alk1-BMPRII/ActRII-ID1/ID3-dependent pathway: Implications for hereditary hemorrhagic telangiectasia type II. *Angiogenesis*, 15(3), pp.497–509.
- Kirkbride, K.C. et al., 2008. Bone morphogenetic proteins signal through the transforming growth factor- β type III receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 283(12), pp.7628–7637.
- Kjeldsen, a D. & Kjeldsen, J., 2000. Gastrointestinal bleeding in patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia. *The American journal of gastroenterology*, 95(2), pp.415–8.
- Kjeldsen, A.D., Vase, P. & Green, A., 1999. Hereditary haemorrhagic telangiectasia: A population-based study of prevalence and mortality in Danish patients. *Journal of Internal Medicine*, 245(1), pp.31–39.
- Koch, A.E. & Harlow, L.A., 1994. Vascular endothelial growth factor. A cytokine modulating endothelial function in rheumatoid arthritis. *The Journal of Immunology*, 152(8), p.4149–56.
- Koch, S. et al., 2014. NRP1 Presented in trans to the endothelium arrests VEGFR2 endocytosis, preventing angiogenic signaling and tumor initiation. *Developmental Cell*, 28(6), pp.633–646.
- Koch, S. et al., 2011. Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. *Biochemical Journal*, 437(2), pp.169–183.
- Koch, S. & Claesson-Welsh, L., 2012. Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(7).
- Kofler, N. et al., 2018. The Rab-effector protein RABEP2 regulates endosomal trafficking to mediate vascular endothelial growth factor receptor-2 (VEGFR2)-dependent signaling.

- Journal of Biological Chemistry*, 293(13), pp.4805–4817.
- Kolodkin, A.L. et al., 1997. Neuropilin is a semaphorin III receptor. *Cell*, 90(4), pp.753–762.
- Vander Kooi, C.W. et al., 2007. Structural basis for ligand and heparin binding to neuropilin B domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(15), pp.6152–7.
- Korpisalo, P. & Yla-Herttuala, S., 2010. Stimulation of functional vessel growth by gene therapy. *Integrative Biology*, 2(2–3), pp.102–112.
- Krueger, J. et al., 2011. Flt1 acts as a negative regulator of tip cell formation and branching morphogenesis in the zebrafish embryo. *Development*, 138(10), pp.2111–2120.
- L.M., B. et al., 2015. Bazedoxifene: A new orphan drug for the treatment of bleeding in hereditary haemorrhagic telangiectasia (HHT). *Angiogenesis*, 18(4), p.528.
- Labrecque, L., 2003. Regulation of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2 Activity by Caveolin-1 and Plasma Membrane Cholesterol. *Molecular Biology of the Cell*, 14(1), pp.334–347.
- Lacout, A. et al., 2010. Pancreatic Involvement in Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia : Assessment with Multidetector Helical CT. *Radiology*, 254(2), pp.479–484.
- Lamallice, L. et al., 2004. Phosphorylation of tyrosine 1214 on VEGFR2 is required for VEGF-induced activation of Cdc42 upstream of SAPK2/p38. *Oncogene*, 23(2), pp.434–445.
- Lampugnani, M.G. et al., 2006. Vascular endothelial cadherin controls VEGFR-2 internalization and signaling from intracellular compartments. *Journal of Cell Biology*, 174(4), pp.593–604.
- Lanahan, A. et al., 2013. The Neuropilin 1 Cytoplasmic Domain Is Required for VEGF-A-Dependent Arteriogenesis. *Developmental Cell*, 25(2), pp.156–168.
- Larrivé, B. et al., 2012. ALK1 Signaling Inhibits Angiogenesis by Cooperating with the Notch Pathway. *Developmental Cell*, 22(3), pp.489–500.
- Lebrin, F. et al., 2004. Endoglin promotes endothelial cell proliferation and TGF- β /ALK1 signal transduction. *The EMBO Journal*, 23(20), pp.4018–4028.
- Lebrin, F., 2015. Pericytes as targets in hereditary hemorrhagic telangiectasia. , 6(February), pp.1–16.
- Lebrin, F. et al., 2010. Thalidomide stimulates vessel maturation and reduces epistaxis in individuals with hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Nature Medicine*, 16(4), pp.420–428.
- Lee, M. et al., 2016. PI3 kinase inhibition improves vascular malformations in mouse models of hereditary haemorrhagic telangiectasia.
- Lee, S. et al., 2007. Autocrine VEGF Signaling Is Required for Vascular Homeostasis. *Cell*, 130(4), pp.691–703.
- Van Lessen, M. et al., 2015. Regulation of vascular endothelial growth factor receptor function in angiogenesis by numb and numb-like. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 35(8), pp.1815–1825.
- Letteboer, T.G.W. et al., 2015. Genetic variation in the functional ENG allele inherited from the non-affected parent associates with presence of pulmonary arteriovenous malformation in hereditary hemorrhagic telangiectasia 1 (HHT1) and may influence expression of PTPN14. , 6(March), pp.1–9.

- Letteboer, T.G.W. et al., 2006. Genotype-phenotype relationship in hereditary haemorrhagic telangiectasia. *Journal of Medical Genetics*, 43(4), pp.371–377.
- Li, J. et al., 2017. Upregulation of miR-205 transcriptionally suppresses SMAD4 and PTEN and contributes to human ovarian cancer progression. *Scientific Reports*, 7(October 2016), pp.1–9.
- Liu, Z. et al., 2009. VEGF and inhibitors of TGF type-I receptor kinase synergistically promote blood-vessel formation by inducing $\alpha 5$ -integrin expression. *Journal of Cell Science*, 122(18), pp.3294–3302.
- Long, L. et al., 2015. Selective enhancement of endothelial BMPR-II with BMP9 reverses pulmonary arterial hypertension. *Nature Medicine*, 21(7), pp.777–785.
- Mahabeleshwar, G.H. et al., 2007. Mechanisms of integrin-vascular endothelial growth factor receptor cross-activation in angiogenesis. *Circulation Research*, 101(6), pp.570–580.
- Mahabeleshwar, G.H. & Byzova, T. V., 2008. Chapter 11 Vascular Integrin Signaling. *Methods in Enzymology*, 443(08), pp.199–226.
- Mahmoud, M. et al., 2010. Pathogenesis of Arteriovenous Malformations in the Absence of Endoglin. , pp.1425–1433.
- Maisonpierre, P.C. et al., 1997. Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science*, 277(July), pp.55–60.
- Manes, A. et al., 2001. Clinical and molecular genetic features of pulmonary hypertension in patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia. *The New England journal of medicine*, 345(5), pp.325–34.
- Manickam, V. et al., 2011. Regulation of vascular endothelial growth factor receptor 2 trafficking and angiogenesis by Golgi localized t-SNARE syntaxin 6. *Blood*, 117(4), pp.1425–1435.
- Manni, S. et al., 2014. Functional and structural characterization of the kinase insert and the carboxy terminal domain in VEGF receptor 2 activation. *FASEB Journal*, 28(11), pp.4914–4923.
- Massagué, J. & Gomis, R.R., 2006. The logic of TGF β signaling. *FEBS Letters*, 580(12), pp.2811–2820.
- Massagué, J. & Wotton, D., 2000. Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system. *The EMBO journal*, 19(8), pp.1745–1754.
- Matsumoto, T. et al., 2005. VEGF receptor-2 Y951 signaling and a role for the adapter molecule TSAd in tumor angiogenesis. *EMBO Journal*, 24(13), pp.2342–2353.
- McColl, B.K. et al., 2003. Plasmin Activates the Lymphangiogenic Growth Factors VEGF-C and VEGF-D. *The Journal of Experimental Medicine*, 198(6), pp.863–868.
- McDonald, J. et al., 2011. Molecular diagnosis in hereditary hemorrhagic telangiectasia: Findings in a series tested simultaneously by sequencing and deletion/duplication analysis. *Clinical Genetics*, 79(4), pp.335–344.
- McDonald, J. et al., 2015. Hereditary hemorrhagic telangiectasia: Genetics and molecular diagnostics in a new era. *Frontiers in Genetics*, 5(JAN), pp.1–8.
- McDonald, J., Bayrak-Toydemir, P. & Pyeritz, R.E., 2011. Hereditary hemorrhagic telangiectasia: An overview of diagnosis, management, and pathogenesis. *Genetics in Medicine*, 13(7), pp.607–616.

- Meadows, K.N., Bryant, P. & Pumiglia, K., 2001. Vascular Endothelial Growth Factor Induction of the Angiogenic Phenotype Requires Ras Activation. *Journal of Biological Chemistry*, 276(52), pp.49289–49298.
- Mei-Zahav, M. et al., 2006. Symptomatic Children With Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia. *Archives of Pediatrics & Adolescent Medicine*, 160(6), p.596.
- Mei-Zahav, M. et al., 2017. Topical propranolol improves epistaxis in patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia - A preliminary report. *Journal of Otolaryngology - Head and Neck Surgery*, 46(1), pp.1–4.
- Meyer, R.D., Singh, A.J. & Rahimi, N., 2004. The Carboxyl Terminus Controls Ligand-dependent Activation of VEGFR-2 and Its Signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 279(1), pp.735–742.
- Milkiewicz, M. et al., 2006. Regulators of angiogenesis and strategies for their therapeutic manipulation. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 38(3), pp.333–357.
- Minami, T., 2014. Calcineurin-NFAT activation and DSCR-1 auto-inhibitory loop: How is homeostasis regulated? *Journal of Biochemistry*, 155(4), pp.217–226.
- Morgan, T. et al., 2002. Intracranial hemorrhage in infants and children with hereditary hemorrhagic telangiectasia (Osler-Weber-Rendu syndrome). *Pediatrics*, 109(1), pp.1–7.
- Nakayama, M. & Berger, P., 2013. Coordination of VEGF receptor trafficking and signaling by coreceptors. *Experimental Cell Research*, 319(9), pp.1340–1347.
- Noghero, A. et al., 2012. Liver X receptor activation reduces angiogenesis by impairing lipid raft localization and signaling of vascular endothelial growth factor receptor-2. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 32(9), pp.2280–2288.
- Noh, Y.H. et al., 2003. An N-terminal 80 kDa recombinant fragment of human thrombospondin-2 inhibits vascular endothelial growth factor induced endothelial cell migration in vitro and tumor growth and angiogenesis in vivo. *J Invest Dermatol*, 121(6), pp.1536–1543. f.
- Nolan-Stevaux, O. et al., 2012. Endoglin Requirement for BMP9 Signaling in Endothelial Cells Reveals New Mechanism of Action for Selective Anti-Endoglin Antibodies. *PLoS ONE*, 7(12).
- Nowak, D.G. et al., 2008. Expression of pro- and anti-angiogenic isoforms of VEGF is differentially regulated by splicing and growth factors. *Journal of Cell Science*, 121(20), pp.3487–3495.
- Ntumba, K. et al., 2016. BMP9/ALK1 inhibits neovascularization in mouse models of age-related macular degeneration. *Oncotarget*, 7(35).
- O'Reilly, M.S. et al., 1997. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell*, 88(2), pp.277–285.
- Oh, S.P. et al., 2000. Activin receptor-like kinase 1 modulates transforming growth factor-beta 1 signaling in the regulation of angiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(6), pp.2626–31.
- Ola, R., 2018. SMAD4 Prevents Flow Induced Arterial-Venous Malformations by Inhibiting Casein Kinase 2. *Circulation Research*.
- Ota, T. et al., 2002. Targets of transcriptional regulation by two distinct type I receptors for transforming growth factor- β in human umbilical vein endothelial cells. *Journal of Cellular*

- Physiology*, 193(3), pp.299–318.
- Ou, G., Galorport, C. & Enns, R., 2016. Bevacizumab and gastrointestinal bleeding in hereditary hemorrhagic telangiectasia. *World Journal of Gastrointestinal Surgery*, 8(12), p.792.
- Pan, Q. et al., 2007. Neuropilin-1 binds to VEGF121 and regulates endothelial cell migration and sprouting. *Journal of Biological Chemistry*, 282(33), pp.24049–24056.
- Pardali, E., Goumans, M.J. & ten Dijke, P., 2010. Signaling by members of the TGF- β family in vascular morphogenesis and disease. *Trends in Cell Biology*, 20(9), pp.556–567.
- Park, J.E.S. et al., 2012. BMP-9 induced endothelial cell tubule formation and inhibition of migration involves Smad1 driven endothelin-1 production. *PLoS ONE*, 7(1), pp.1–13.
- Park, S.O. et al., 2009. Real-time imaging of de novo arteriovenous malformation in a mouse model of hereditary hemorrhagic telangiectasia. *J Clin Invest*, 119(11), pp.3487–96.
- Parker, M.W. et al., 2012. Structural basis for selective vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A) binding to neuropilin-1. *Journal of Biological Chemistry*, 287(14), pp.11082–11089.
- Pasula, S. et al., 2012. Endothelial epsin deficiency decreases tumor growth by enhancing VEGF signaling. *Journal of Clinical Investigation*, 122(12), pp.4424–4438.
- Pawlikowska, L. et al., 2018. Association of common candidate variants with vascular malformations and intracranial hemorrhage in hereditary hemorrhagic telangiectasia. , (September 2017), pp.350–356.
- Dela Paz, N.G., Melchior, B. & Frangos, J.A., 2013. Early VEGFR2 activation in response to flow is VEGF-dependent and mediated by MMP activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 434(3), pp.641–646.
- Pepper, M.S. et al., 1993. Biphasic Effect of Transforming Growth Factor- β 1 on in Vitro Angiogenesis. *Experimental Cell Research*, 204, pp.356–363.
- Phng, L.K. & Gerhardt, H., 2009. Angiogenesis: A Team Effort Coordinated by Notch. *Developmental Cell*, 16(2), pp.196–208.
- Plauchu, H. et al., 1989. Age-related clinical profile of heredity hemorrhagic telangiectasia in an epidemiologically recruited population. *American Journal of Medical Genetics*, 32(3), pp.291–297.
- Plauchu, H., 1984. Epidémiologie et constitution d ' un registre de population à propos d ' une concentration géographique d ' une maladie héréditaire rare. , pp.765–785.
- Plumitallo, S. et al., 2018. Functional analysis of a novel ENG variant in a patient with hereditary hemorrhagic telangiectasia (HHT) identifies a new Sp1 binding-site. *Gene*, 647(September 2017), pp.85–92.
- Poirier, O. et al., 2012. Inhibition of apelin expression by BMP signaling in endothelial cells. *AJP: Cell Physiology*, 303(11), pp.C1139–C1145.
- Potente, M., Gerhardt, H. & Carmeliet, P., 2011. Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. *Cell*, 146(6), pp.873–887.
- Presta, M. et al., 2005. Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 16(2 SPEC. ISS.), pp.159–178.
- Quinn, T.P. et al., 1993. Fetal liver kinase 1 is a receptor for vascular endothelial growth factor and

- is selectively expressed in vascular endothelium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(16), pp.7533–7.
- Ribatti, D., 2009. Endogenous inhibitors of angiogenesis. A historical review. *Leukemia Research*, 33(5), pp.638–644.
- Ribatti, D., Nico, B. & Crivellato, E., 2011. The role of pericytes in angiogenesis. *International Journal of Developmental Biology*, 55(3), pp.261–268.
- Ricard, N. et al., 2012. BMP9 and BMP10 are critical for postnatal retinal vascular remodeling. *Blood*, 119(25), pp.6162–6171.
- Richards-Yutz, J. et al., 2010. Update on molecular diagnosis of hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Human Genetics*, 128(1), pp.61–77.
- Rigelsky, C.M. et al., 2008. BMPR2 mutation in a patient with pulmonary arterial hypertension and suspected hereditary hemorrhagic telangiectasia. *American Journal of Medical Genetics, Part A*, 146(19), pp.2551–2556.
- Robinson, S.D. et al., 2009. Av β 3 Integrin Limits the Contribution of Neuropilin-1 To Vascular Endothelial Growth Factor-Induced Angiogenesis. *Journal of Biological Chemistry*, 284(49), pp.33966–33981.
- Rohlenova, K. et al., 2017. Endothelial Cell Metabolism in Health and Disease. *Trends in Cell Biology*, xx, pp.1–13.
- Ross, S. & Hill, C.S., 2008. How the Smads regulate transcription. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 40(3), pp.383–408.
- Rostama, B. et al., 2015. DLL4/Notch1 and BMP9 Interdependent Signaling Induces Human Endothelial Cell Quiescence via P27KIP1 and Thrombospondin-1. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 35(12), pp.2626–2637.
- Ruiz-Llorente, L. et al., 2017. Endoglin and alk1 as therapeutic targets for hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 21(10), pp.933–947.
- Ruiz, S. et al., 2016. A mouse model of hereditary hemorrhagic telangiectasia generated by transmammary- delivered immunoblocking of. *Nature Publishing Group*, (April), pp.1–12.
- Ryeom, S. et al., 2008. Targeted Deletion of the Calcineurin Inhibitor DSCR1 Suppresses Tumor Growth. *Cancer Cell*, 13(5), pp.420–431.
- Sadick, H. et al., 2005. Patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia have increased plasma levels of vascular endothelial growth factor and transforming growth factor-beta1 as well as high ALK1 tissue expression. *Haematologica*, 90(5), pp.818–828.
- Sakurai, Y. et al., 2005. Essential role of Flk-1 (VEGF receptor 2) tyrosine residue 1173 in vasculogenesis in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(4), pp.1076–1081.
- Salajegheh, A. et al., 2015. Modulatory role of mir-205 in angiogenesis and progression of thyroid cancer. *Journal of Molecular Endocrinology*, 55(3), pp.183–196.
- Sánchez-Elsner, T. et al., 2001. Synergistic Cooperation between Hypoxia and Transforming Growth Factor- β Pathways on Human Vascular Endothelial Growth Factor Gene Expression. *Journal of Biological Chemistry*, 276(42), pp.38527–38535.
- Sant, B.I.U., 1896. In : Gazette des hôpitaux civils et militaires, 1896, t. 69, pp. 1322-3.

- Santibañez, J.F., Quintanilla, M. & Bernabeu, C., 2011. TGF- β /TGF- β receptor system and its role in physiological and pathological conditions. *Clinical Science*, 121(6), pp.233–251.
- Sarabipour, S., Ballmer-Hofer, K. & Hristova, K., 2016. VEGFR-2 conformational switch in response to ligand binding. *eLife*, 5(APRIL2016), pp.1–23.
- Sawamiphak, S. et al., 2010. Ephrin-B2 regulates VEGFR2 function in developmental and tumour angiogenesis. *Nature*, 465(7297), pp.487–491.
- Scharpfenecker, M. et al., 2007. BMP-9 signals via ALK1 and inhibits bFGF-induced endothelial cell proliferation and VEGF-stimulated angiogenesis. *Journal of Cell Science*, 120(6), pp.964–972.
- Schier, A.F., 2009. Nodal morphogens. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 1(5).
- Schmierer, B. & Hill, C.S., 2007. TGF β -SMAD signal transduction: Molecular specificity and functional flexibility. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(12), pp.970–982.
- Selvaraj, D. et al., 2015. A Functional Role for VEGFR1 Expressed in Peripheral Sensory Neurons in Cancer Pain. *Cancer Cell*, 27(6), pp.780–796.
- Senger, D.R. et al., 1983. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science (New York, N.Y.)*, 219(4587), pp.983–5.
- Serrati, S. et al., 2009. TGF β 1 antagonistic peptides inhibit TGF β 1-dependent angiogenesis. *Biochemical Pharmacology*, 77(5), pp.813–825.
- Shalaby, F. et al., 1995. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature*, 376(6535), pp.62–66.
- SHARATHKUMAR, A.A. & SHAPIRO, A., 2008. Hereditary haemorrhagic telangiectasia. *Rhinology*, 14(March 1990), pp.1269–1280.
- Shen, B.Q., Lee, D.Y. & Zioncheck, T.F., 1999. Vascular endothelial growth factor governs endothelial nitric-oxide synthase expression via a KDR/Flk-1 receptor and a protein kinase C signaling pathway. *J Biol Chem*, 274(46), pp.33057–33063.
- Shi, Y. & Massagué, J., 2003. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell*, 113(6), pp.685–700.
- Shibuya, M., 2013. VEGFR and type-V RTK activation and signaling. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(10), pp.1–14.
- Shoukier, M. et al., 2008. Characterization of five novel large deletions causing hereditary haemorrhagic telangiectasia. *Clinical Genetics*, 73(4), pp.320–330.
- Shovlin, C.L. et al., 1994. A gene for hereditary haemorrhagic telangiectasia maps to chromosome 9q3. *Nature Genetics*, 6(2), pp.205–209.
- Shovlin, C.L. et al., 2000. Diagnostic criteria for hereditary hemorrhagic telangiectasia (Rendu-Osler-Weber syndrome). *American Journal of Medical Genetics*, 91(1), pp.66–67.
- Shovlin, C.L., 2010. Hereditary haemorrhagic telangiectasia: Pathophysiology, diagnosis and treatment. *Blood Reviews*, 24(6), pp.203–219.
- Simons, M. & Eichmann, A., 2015. Molecular controls of arterial morphogenesis. *Circulation Research*, 116(10), pp.1712–1724.
- Simons, M., Gordon, E. & Claesson-Welsh, L., 2016. Mechanisms and regulation of endothelial

- VEGF receptor signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 17(10), pp.611–625.
- Slaton, J.W. et al., 1999. Interferon- α -mediated down-regulation of angiogenesis-related genes and therapy of bladder cancer are dependent on optimization of biological dose and schedule. *Clinical Cancer Research*, 5(10), pp.2726–2734.
- Smads, I., Miyazawa, K. & Miyazono, K., 2017. Regulation of TGF- β Family Signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 9(022095), pp.1–26.
- Soker, S. et al., 2002. VEGF165 mediates formation of complexes containing VEGFR-2 and neuropilin-1 that enhance VEGF165-receptor binding. *Journal of Cellular Biochemistry*, 85(2), pp.357–368.
- Solowiej, J. et al., 2009. Characterizing the effects of the juxtamembrane domain on vascular endothelial growth factor receptor-2 enzymatic activity, autophosphorylation, and inhibition by axitinib. *Biochemistry*, 48(29), pp.7019–7031.
- Soubrier, F. et al., 2013. Genetics and genomics of pulmonary arterial hypertension. *Journal of the American College of Cardiology*, 62(25 SUPPL.).
- Sporn, M.B., 2006. The early history of TGF- β , and a brief glimpse of its future. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 17(1–2), pp.3–7.
- Srinivasan, S. et al., 2003. A mouse model for hereditary hemorrhagic telangiectasia (HHT) type 2. , 12(5), pp.473–482.
- Stenvers, K.L. & Findlay, J.K., 2010. Inhibins: From reproductive hormones to tumor suppressors. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 21(3), pp.174–180.
- Sugden, W.W. & Siekmann, A.F., 2018. Endothelial cell biology of Endoglin in hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Current Opinion in Hematology*, 25(3), pp.237–244.
- Sun, Z. et al., 2012. VEGFR2 induces c-Src signaling and vascular permeability in vivo via the adaptor protein TSA β . *The Journal of Experimental Medicine*, 209(7), pp.1363–1377.
- Suzuki, Y. et al., 2010. BMP-9 induces proliferation of multiple types of endothelial cells in vitro and in vivo. *Journal of Cell Science*, 123(10), pp.1684–1692.
- Tabruyn, S.P. et al., 2013. MiR-205 is downregulated in hereditary hemorrhagic telangiectasia and impairs TGF- β signaling pathways in endothelial cells. *Angiogenesis*, 16(4), pp.877–887.
- Takahashi, T., Ueno, H. & Shibuya, M., 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), pp.2221–2230.
- Tammela, T. et al., 2008. Blocking VEGFR-3 suppresses angiogenic sprouting and vascular network formation. *Nature*, 454(7204), pp.656–660.
- Tan, W. et al., 2008. An essential role for Rac1 in endothelial cell function and vascular development. *The FASEB Journal*, 22(6), pp.1829–1838.
- Telangiectasia, H. et al., 2015. Bevacizumab in Patients With Hereditary. , 307(9).
- Tian, H. et al., 2018. Endoglin interacts with VEGFR2 to promote angiogenesis. *FASEB Journal*, 32(6), pp.2934–2949.
- Tiwari, A. et al., 2013. The myosin motor Myo1c is required for VEGFR2 delivery to the cell surface and for angiogenic signaling. *AJP: Heart and Circulatory Physiology*, 304(5), pp.H687–H696.

- Tkachuk, V.A., Plekhanova, O.S. & Parfyonova, Y. V., 2009. Regulation of arterial remodeling and angiogenesis by urokinase-type plasminogen activator. This article is one of a selection of papers from the NATO Advanced Research Workshop on Translational Knowledge for Heart Health (published in part 2 of a 2-part Sp. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 87(4), pp.231–251.
- Torsney, E. et al., 2003. Mouse Model for Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia Has a Generalized Vascular Abnormality. , pp.1653–1657.
- Townson, S.A. et al., 2012. Specificity and structure of a high affinity activin receptor-like kinase 1 (ALK1) signaling complex. *Journal of Biological Chemistry*, 287(33), pp.27313–27325.
- Trerotola, S.O. & Pyeritz, R.E., 2010. PAVM embolization: An update. *American Journal of Roentgenology*, 195(4), pp.837–845.
- Tual-chalot, S. et al., 2014. Endothelial Depletion of *Acvrl1* in Mice Leads to Arteriovenous Malformations Associated with Reduced Endoglin Expression. , 9(6).
- Tual-chalot, S., Oh, S.P. & Arthur, H.M., 2015. Mouse models of hereditary hemorrhagic telangiectasia : recent advances and future challenges. , 6(February), pp.1–12.
- Tugues, S. et al., 2011. Vascular endothelial growth factors and receptors: Anti-angiogenic therapy in the treatment of cancer. *Molecular Aspects of Medicine*, 32(2), pp.88–111.
- Turner, N. & Grose, R., 2010. Fibroblast growth factor signalling: From development to cancer. *Nature Reviews Cancer*, 10(2), pp.116–129.
- Upton, P.D. et al., 2009. Bone morphogenetic protein (BMP) and activin type II receptors balance BMP9 signals mediated by activin receptor-like kinase-1 in human pulmonary artery endothelial cells. *Journal of Biological Chemistry*, 284(23), pp.15794–15804.
- Urness, L.D., Sorensen, L.K. & Li, D.Y., 2000. Arteriovenous malformations in mice lacking activin receptor-like kinase-1. , 26(november), pp.328–331.
- Vlahakis, N.E. et al., 2007. Integrin $\alpha 9\beta 1$ directly binds to vascular endothelial growth factor (VEGF)-A and contributes to VEGF-A-induced angiogenesis. *Journal of Biological Chemistry*, 282(20), pp.15187–15196.
- Vosgha, H. et al., 2018. MiR-205 targets angiogenesis and EMT concurrently in anaplastic thyroid carcinoma. *Endocrine-Related Cancer*, 25(3), pp.323–337.
- Vullhorst, D. et al., 2015. A negative feedback loop controls NMDA receptor function in cortical interneurons via neuregulin 2/ErbB4 signalling. *Nature Communications*, 6(June), pp.1–14.
- Wain, K.E. et al., 2014. Appreciating the broad clinical features of SMAD4 mutation carriers: A multicenter chart review. *Genetics in Medicine*, 16(8), pp.588–593.
- Wang, H. et al., 2016. miR-205 suppresses cell proliferation, invasion, and metastasis via regulation of the PTEN/AKT pathway in renal cell carcinoma. *Molecular Medicine Reports*, 14(4), pp.3343–3349.
- Wang, S. et al., 2008. Control of endothelial cell proliferation and migration by VEGF signaling to histone deacetylase 7. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(22), pp.7738–7743.
- Wei, G. et al., 2009. Ets1 and Ets2 are required for endothelial cell survival during embryonic angiogenesis. *Blood*, 114(5), pp.1123–1130.

- Walti, J. et al., 2013. Recent molecular discoveries in angiogenesis and antiangiogenic therapies in cancer. *Journal of Clinical Investigation*, 123(8), pp.3190–3200.
- West, X.Z. et al., 2012. Integrin β 3 crosstalk with VEGFR accommodating tyrosine phosphorylation as a regulatory switch. *PLoS ONE*, 7(2).
- Westermann, C.J.J. et al., 2003. The prevalence and manifestations of hereditary hemorrhagic telangiectasia in the Afro-Caribbean population of the Netherlands Antilles: A family screening. *American Journal of Medical Genetics*, 116A(4), pp.324–328.
- Whitehead, K.J. et al., 2016. Effect of topical intranasal therapy on epistaxis frequency in patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia: A randomized clinical trial. *JAMA - Journal of the American Medical Association*, 316(9), pp.943–951.
- Wooderchak-Donahue, W.L. et al., 2013. BMP9 mutations cause a vascular-anomaly syndrome with phenotypic overlap with hereditary hemorrhagic telangiectasia. *American Journal of Human Genetics*, 93(3), pp.530–537.
- Wooderchak, W.L. et al., 2010. Repository of SMAD4 Mutations: Reference for Genotype/Phenotype Correlation. *Journal of Data Mining in Genomics & Proteomics*, 01(01), pp.1–7.
- Woolford, T.J., Loke, D. & Bateman, N.D., 2002. The use of a nasal obturator in hereditary haemorrhagic telangiectasia: An alternative to Young's procedure. *Journal of Laryngology and Otolaryngology*, 116(6), pp.455–456.
- Wu, L.-W. et al., 2000. VRAP Is an Adaptor Protein That Binds KDR, a Receptor for Vascular Endothelial Cell Growth Factor. *Journal of Biological Chemistry*, 275(9), pp.6059–6062.
- Xia, Y. & Schneyer, A.L., 2009. The biology of activin: Recent advances in structure, regulation and function. *Journal of Endocrinology*, 202(1), pp.1–12.
- Xiong, S. et al., 2016. TGF- β 1 stimulates migration of type II endometrial cancer cells by down-regulating PTEN via activation of SMAD and ERK1/2 signaling pathways. *Oncotarget*, 7(38), pp.61262–61272.
- Yan, X.H. et al., 2014. Yin Yang 1 (YY1) synergizes with Smad7 to inhibit TGF- β signaling in the nucleus. *Science China Life Sciences*, 57(1), pp.128–136.
- Yaniv, E. et al., 2009. Antiestrogen therapy for hereditary hemorrhagic telangiectasia: A double-blind placebo-controlled clinical trial. *The Laryngoscope*, 119(2), pp.284–288.
- Yao, Y. et al., 2013. mouse vascular endothelium Crossveinless 2 regulates bone morphogenetic protein 9 in human and mouse vascular endothelium. , 119(21), pp.5037–5047.
- Zeeb, M., Strilic, B. & Lammert, E., 2010. Resolving cell-cell junctions: Lumen formation in blood vessels. *Current Opinion in Cell Biology*, 22(5), pp.626–632.
- Zhang, Q. et al., 2013. Elevated circulating microRNA-210 levels in patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia and pulmonary arteriovenous malformations: A potential new biomarker. *Biomarkers*, 18(1), pp.23–29.
- Zhang, X. & Simons, M., 2014. Receptor tyrosine kinases endocytosis in endothelium: Biology and signaling. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 34(9), pp.1831–1837.
- Zhang, Y.E., 2016. Non-Smad Signaling Pathways of the TGF- β Family. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 19, pp.1–19.

La télangiectasie hémorragique héréditaire est une maladie génétique provoquant divers troubles vasculaires (épistaxis, télangiectasies et malformations artério-veineuses). Ces troubles sont provoqués par la présence de mutations au sein de différents gènes codant des protéines de la superfamille du Transforming Growth Factor- β (TGF- β). Basé sur le gène muté provoquant l'apparition de ce syndrome, on distingue deux types principaux de la maladie, HHT1 et HHT2. Ceux-ci sont caractérisés par des mutations dans les gènes codant pour l'endogline et l'ALK1, respectivement. Ces dernières années le ligand Bone morphogenetic protein 9 (BMP9) est apparu comme un élément clé dans la compréhension de la maladie et dans la régulation de l'angiogénèse.

L'angiogénèse est le processus de formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de ceux préexistants. Elle est très active durant l'embryogénèse mais devient quiescente à l'âge adulte. Cependant, ce mécanisme peut être à nouveau activé lors de la réparation tissulaire et lors du cycle menstruel. Un défaut dans l'angiogénèse (que ce soit une diminution ou au contraire une activation trop importante) conduit à des problèmes vasculaires favorisant le développement de diverses pathologies comme le cancer, la dégénérescence maculaire liée à l'âge ou encore certains diabètes. La formation des vaisseaux sanguins est modulée par de nombreux facteurs qui permettent de l'activer ou de l'inhiber. La balance entre ces deux types de régulateurs est essentielle pour le bon déroulement de l'angiogénèse. Le facteur le plus connu pour réguler positivement ce procédé est le Vascular endothelial growth factor (VEGF).

Au sein de la première partie de cette thèse, nous avons établi la présence d'un lien entre la voie du VEGF et celle du BMP9. Ce facteur régule négativement l'angiogénèse induite par le VEGF en modifiant les interactions entre le VEGFR2 et ALK1 (récepteur de type I du BMP9), les voies de signalisation intracellulaires (ERK1/2, PTEN,...) mais également en influençant l'internalisation du récepteur VEGFR2.

Au cours de la seconde partie, nous avons observé que BMP9 augmente l'expression du micro-ARN 205 dont les cibles sont Smad1 et Smad4. Par cette régulation, BMP9 met en place une boucle d'auto-régulation négative. De surcroît, l'augmentation du niveau de ce miR provoque une diminution de l'expression du VEGF et de la phosphatase PTEN au sein des cellules endothéliales. Des expériences menées sur des cellules endothéliales provenant de patients HHT2 montrent que, dans ce contexte, BMP9 n'est plus capable d'activer complètement ces différentes voies ce qui conduit à une dérégulation de l'angiogénèse.

En conclusion, BMP9 possède un rôle de régulateur négatif de l'angiogénèse induite par le VEGF. Ceci permet d'empêcher une sur-activation de l'angiogénèse et permettre la maturation des vaisseaux nouvellement formés. Chez les patients souffrant de la télangiectasie hémorragique héréditaire, la signalisation du BMP9 est diminuée et ne permet plus la régulation négative de l'angiogénèse.