

THÈSE PRÉSENTÉE

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR DE

L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ (SVS)

SPÉCIALITÉ BIOLOGIE CELLULAIRE ET PHYSIOPATHOLOGIE

Par Sandra OUCHERIF

**Étude du ciblage de la voie bêta-adrénergique par le propranolol
dans le traitement des tumeurs vasculaires cutanées**

Sous la direction de : François MOISAN

Soutenue le 16 décembre 2021

Membres du jury :

Pr DUFOURCQ Pascale	Université de Bordeaux, France	Président du jury
Pr IMHOF Beat	Université de Genève, Suisse	Rapporteur
Dr PASQUIER Eddy	Université de Marseille, France	Rapporteur
Pr BILLOTTET Clotilde	Université de Bordeaux, France	Examinatrice
Dr LEAUTE-LABREZE Christine	CHU de Bordeaux, France	Invitée
Dr MOISAN François	Université de Bordeaux, France	Invité

*A mes parents,
A mon époux,
A mon pays ...*

REMERCIEMENTS

Je souhaite en premier lieu sincèrement remercier les membres de mon jury qui me font l'honneur de juger mon travail de thèse. Merci au Pr. Pascale Dufourcq de me faire l'honneur de présider cette thèse. Merci au Pr. Beat Imhof et au Dr. Eddy Pasquier d'avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse et d'apporter votre expertise sur l'angiogenèse et l'angiosarcome, soyez assurés de mon profond respect. Merci au Pr. Clotilde Billottet d'avoir accepté d'examiner mon travail, je vous en suis très reconnaissante.

Merci au Dr. Christine Léauté-Labrèze pour votre présence en tant qu'invitée dans ce jury de thèse. Votre découverte a donné naissance à ce beau projet sur lequel j'ai eu l'honneur de travailler. Merci pour tous nos précieux échanges scientifiques.

Merci à mon directeur de thèse, le Dr. François Moisan, qui m'a donné l'opportunité de faire cette thèse. Merci de t'être toujours montré positif et motivant. Merci pour nos nombreux échanges scientifiques (et pas que !) et pour la confiance que tu as su m'accorder pendant ces trois années de thèse. C'était un immense plaisir d'avoir travaillé avec toi.

Merci à Hamid, de m'avoir accueillie au sein de l'équipe de dermatologie. Merci pour votre aide pendant la thèse, vos conseils avisés et vos encouragements. Vous avez toujours été à l'écoute pour me soutenir et me rassurer quand ça n'allait pas ou que je doutais de mes résultats. Merci pour nos nombreux échanges qui me seront sans doute utiles très longtemps.

Merci à Mumu, tu as joué un rôle primordial dans cette thèse. Merci pour tes qualités professionnelles et humaines, pour tes conseils avisés et précieux et pour ton soutien dans les moments difficiles. Merci pour ton enthousiasme, ta bonne humeur contagieuse et pour le temps que tu as consacré à la relecture de ce manuscrit.

Merci au Pr Alain Taieb, pour votre disponibilité, votre bienveillance et vos encouragements. C'était un réel honneur d'avoir travaillé avec vous.

Merci à Priscilla pour toute l'aide que tu m'as apporté durant cette thèse. Merci pour ta joie de vivre, tes bons conseils et d'avoir été à l'écoute à chaque fois que j'en aie eu besoin.

Merci à Sorilla pour ton implication et le temps que tu as pris pour répondre à mes nombreuses questions.

Merci à Pauline et Léa, mes co-thésardes de cette aventure. Merci pour votre soutien, votre écoute dans les moments de doutes. Merci pour tous les bons moments aussi réconfortants qu'indispensables que l'on a partagés ensemble.

Merci aux membres de mon équipe, Sandrine, Salomé, Catherine, Walid, Elodie, Joudi pour leur bonne humeur. Merci pour ces 3 belles années passées à vos côtés.

Merci à Myriam, notre stagiaire de Master 2 pour son sérieux et sa contribution à ce travail de recherche.

Merci à tous les membres de l'unité INSERM 1035 pour la bonne ambiance, les moments de rigolades pendant les pauses. Merci pour votre accueil et le cadre de travail agréable que vous m'avez apporté.

Merci à toute l'équipe MirCade, Fatma, Malak, Marina et Guillaume pour votre aide précieuse dans la mise au point des sphéroïdes.

Merci à Jérôme d'avoir pris le temps de relire ce manuscrit, merci pour ta bonne humeur contagieuse et les nombreux fous rires du midi.

Merci à toute ma famille et amis d'Algérie, cousines et copines, Kahina, Rime, Lilia, nos moments de pure rigolade ont été un vrai anti-stress pendant ces années de thèse.

Enfin, je veux remercier les membres de ma famille, toujours présents dans les bons comme les mauvais moments. Youcef & Walid, mes chers frères, sans votre soutien indéfectible et votre amour fraternel inconditionnel, je ne serais pas là où j'en suis. Merci à mes chers parents, vous avez tout donné pour nous. Maman, je te dois tout, tu es le pilier de tout ce qui a été entrepris dans ma vie. Merci pour tous tes sacrifices, ton soutien et ton amour inconditionnel.

A mon cher époux Azeddine, qui me soutient au quotidien et illumine ma vie. Je t'aime.

Étude du ciblage de la voie bêta-adrénergique par le propranolol dans le traitement des tumeurs vasculaires cutanées

Le propranolol est actuellement le traitement de première intention des hémangiomes infantiles (HI), tumeurs vasculaires cutanées bénignes touchant 5 à 10% des nouveau-nés. La découverte de l'efficacité du propranolol dans le traitement des HI par notre équipe a ouvert une nouvelle voie thérapeutique pour les tumeurs vasculaires, en particulier les angiosarcomes, qui sont des tumeurs malignes très rares et de mauvais pronostic. Cependant, les mécanismes d'action ainsi que les cibles moléculaires et cellulaires du bêtabloquant sont à ce jour loin d'être complètement élucidés. Le repositionnement du propranolol comme traitement anti-tumoral nécessite d'une part une meilleure compréhension de ses mécanismes d'action et d'autre part l'identification de marqueurs prédictifs de réponse. Le propranolol agit en se fixant sur les récepteurs bêta-adrénergiques, empêchant l'activation de la voie bêta-adrénergique par les agonistes naturels que sont les catécholamines. Il n'existe actuellement pas de modèles satisfaisant d'HI ni d'angiosarcome pour l'étude de l'efficacité du propranolol, d'où la nécessité de mettre au point de nouveaux modèles d'étude. Ce travail de recherche s'inscrit dans cet axe. Outre la compréhension des effets anti-tumoraux du propranolol, ces modèles doivent permettre l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques. Dans un premier temps, un modèle *in vivo* de glioblastome nous a permis d'identifier la protéine aquaporine 1 (AQP1) comme cible du propranolol. L'étude de l'expression et de la localisation d'AQP1 dans l'HI a révélé un profil histopathologique unique de la protéine, fortement exprimée au niveau périvasculaire, précisément par les télocytes, identifiés par microscopie électronique. Dans un deuxième temps, nous avons développé un modèle *in vitro* d'HI répondant à de faibles doses de propranolol et avons testé l'effet de la drogue sur un paramètre clé du développement des HI, l'angiogenèse. Nous avons évalué l'importance fonctionnelle des télocytes et testé AQP1 comme cible dans ce modèle. Les résultats ont mis en évidence le rôle clé des télocytes et d'AQP1 dans la réponse anti-tumorale au propranolol dans l'HI. Ce modèle a également permis l'étude de l'impact de la noradrénaline et a révélé un rôle important de cette catécholamine dans la tubulogenèse de l'HI et dans sa réponse au propranolol. Nous avons également montré une quantité élevée de noradrénaline et des enzymes de synthèse des catécholamines dans les HI. Enfin, nous avons testé les effets du propranolol sur la migration, l'interaction cellule-cellule ainsi que sur la formation de sphéroïdes de lignées humaines d'angiosarcome. Grâce à l'établissement de ces modèles d'étude 2D et 3D, nous avons mis en évidence un effet inhibiteur du bêtabloquant à faible dose sur la migration et l'invasion des cellules tumorales d'angiosarcome et nous avons pu investiguer le rôle du récepteur bêta-2 adrénergique et d'AQP1 dans cet effet. L'ensemble de ces résultats permettent de mieux comprendre l'activité anti-tumorale du propranolol et de mieux appréhender d'éventuels nouveaux essais précliniques et cliniques.

Mots clés : Propranolol, Angiogenèse, Aquaporine 1, Catécholamines, Dermatologie

Targeting of the beta-adrenergic pathway with propranolol in cutaneous vascular tumors

Propranolol is currently the first-line treatment for severe infantile hemangioma (IH), which is the most frequent tumor of infancy, affecting 5-10% of newborns. Neither the molecular mechanism of action of propranolol nor the cellular and molecular targets of the drug has been identified with a strong proof of concept. Propranolol is a non-selective beta-adrenergic receptors inhibitor that antagonizes the effect of catecholamines, and thus, prevents the activation of beta-adrenergic pathway. The serendipitous discovery of the propranolol efficiency in IH treatment by our team has opened up a new therapeutic strategy for the treatment of other vascular tumors, in particular angiosarcomas, which are rare malignant tumors with a poor prognosis. The repositioning of propranolol requires a better understanding of the antitumor mechanism of action of this betablocker as well as the identification of new predictive markers of response. There are currently no satisfactory models of IH or angiosarcoma for studying the efficacy of propranolol. Therefore, there is a need to develop new models for a better understanding of the antitumor effects of propranolol to, ultimately, identify new therapeutic targets. First, we showed that propranolol antitumor activity was associated with alteration of Aquaporin 1 (AQP1), a water and ion channel involved in tumor cell migration, invasion and angiogenesis. Immunofluorescence staining revealed a unique histological profile of AQP1 in IH, which is highly expressed in the perivascular space by stromal cells named telocytes that we recently identified in IH. We developed an IH *in vitro* model using lesional patient-derived cells to investigate the role of telocytes in the antiangiogenic effect of propranolol in IH, the impact of noradrenaline and to test AQP1 as a target of the beta blockade response. This 3D model showed an involvement of noradrenaline in IH tubulogenic properties and revealed a critical role of AQP1 and telocytes in the antitumor response of propranolol. Moreover, we showed high levels of noradrenaline and catecholamines synthesis enzymes in IH. Finally, we studied the effects of propranolol in 2D and 3D *in vitro* models using human angiosarcoma cell lines and showed an inhibitory effect of low doses of this betablocker on the migration, cell-cell interactions and invasion of the human angiosarcoma tumor cell lines. Then we investigated the role of the beta-2 adrenergic receptor and AQP1 in this effect.

All together, these results provide a better understanding of the antitumor activity of propranolol and a pave the way for new preclinical and clinical trials.

Keywords: Propranolol, Angiogenesis, Aquaporin 1, Catecholamines, Dermatology

UNITE DE RECHERCHE

Biothérapie des Maladies Génétiques et des Cancers (BMGIC)

Université de Bordeaux

INSERM U1035 – Bâtiment TP, Zone Sud, 4e étage

146 rue Léo Saignat

33076 BORDEAUX – France

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABBREVIATIONS	12
TABLE DES FIGURES.....	14
TABLE DES TABLEAUX.....	17
INTRODUCTION.....	18
1. MORPHOGENESE VASCULAIRE.....	20
1.1. VASCULOGENESE	20
1.2. ANGIOGENESE.....	22
1.2.1. Angiogenèse physiologique.....	22
1.2.2. Angiogenèse tumorale	25
2. CATHECOLAMINES ET VOIE BETA-ADRENERGIQUE.....	27
2.1. CATECHOLAMINES	27
2.1.1. Physiologie des catécholamines.....	27
2.1.2. Synthèse des catécholamines.....	28
2.1.3. Dégradation des catécholamines	29
2.2. VOIE DE SIGNALISATION BETA-ADRENERGIQUE	30
2.2.1. Physiologie de la voie bêta-adrénergique	30
2.2.2. Récepteurs de la voie bêta-adrénergique	31
2.2.3. Voie bêta-adrénergique et cancer.....	33
2.3. ANTAGONISTES DE LA VOIE BETA-ADRENERGIQUE	37
2.3.1. Modes d'action des bêtabloquants.....	37
2.3.2. Le propranolol	38
3. L'HEMANGIOME INFANTILE : TUMEUR VASCULAIRE CUTANEE BENIGNE	40
3.1. STRUCTURE DE LA PEAU	40
3.2. PRESENTATION DE LA PATHOLOGIE	42
3.2.1. Définition et généralités.....	42
3.2.2. Caractéristiques cliniques.....	42
3.2.3. Epidémiologie.....	46

3.2.4.	Diagnostic	46
3.3.	ORIGINES POSSIBLES	46
3.4.	PATHOGENESE	47
3.4.1.	Dérégulation de la voie angiogénique.....	47
3.4.2.	Autres voies de signalisation impliquées	49
3.4.3.	Rôle de l'hypoxie	50
3.5.	HISTOLOGIE ET COMPOSANTS CELLULAIRES.....	51
3.5.1.	Les cellules progénitrices endothéliales.....	51
3.5.2.	Les cellules endothéliales	52
3.5.3.	Les péricytes	52
3.5.4.	Les télocytes	53
3.5.5.	Les mastocytes	55
3.5.6.	Les macrophages.....	55
3.5.7.	Les adipocytes	56
3.6.	STRATEGIES THERAPEUTIQUES ACTUELLES.....	56
3.6.1.	Corticostéroïdes et autres traitements médicaux.....	57
3.6.2.	Bêtabloquants : mécanismes d'action du propranolol dans l'hémangiome infantile	58
4.	L'ANGIOSARCOME : TUMEUR VASCULAIRE MALIGNE	60
4.1.	DEFINITION.....	60
4.2.	PRESENTATION DE LA PATHOLOGIE	60
4.2.1.	Epidémiologie.....	60
4.2.2.	Caractéristiques cliniques, pathologie et diagnostic.....	61
4.3.	PHYSIOPATHOLOGIE MOLECULAIRE	63
4.4.	OPTIONS THERAPEUTIQUES	64
4.4.1.	Chirurgie	64
4.4.2.	Radiothérapie	65
4.4.3.	Chimiothérapie.....	65
4.5.	THERAPIE CIBLEE : MODULATION PHARMACOLOGIQUE DE LA VOIE BETA-ADRENERGIQUE	65
5.	LES AQUAPORINES.....	67
5.1.	DEFINITION ET ISOFORMES	67

5.2.	STRUCTURE ET DISTRIBUTION DES AQUAPORINES	67
5.2.1.	Perméabilité hydrique	67
5.2.2.	Structure des aquaporines	69
5.2.3.	Distribution des aquaporines	71
5.3.	FONCTIONS DES AQUAPORINES	74
5.3.1.	Le transport d'eau	74
5.3.2.	Le transport de glycérol.....	76
5.3.3.	Autres fonctions des aquaporines.....	76
5.4.	MECANISMES D'ACTION D'AQUAPORINE 1 DANS LA PROGRESSION TUMORALE	77
5.4.1.	Modulation de la migration et invasion tumorales.....	77
5.4.2.	Modulation de l'angiogenèse tumorale	78
5.4.3.	Modulation de la prolifération tumorale	79
	PRESENTATION DU TRAVAIL EXPERIMENTAL	80
	RESULTATS.....	81
	PARTIE 1 : ROLE CRITIQUE D'AQUAPORINE 1 ET DES TELOCYTES DANS LA	
	REPONSE DE L'HEMANGIOME INFANTILE AU PROPRANOLOL	82
	PARTIE 2 : ROLE CRITIQUE DE LA NORADRENALINE ET DES TELOCYTES DANS	
	L'ANGIOGENESE ET LA SENSIBILITE DE L'HEMANGIOME INFANTILE AU	
	PROPRANOLOL	120
	PARTIE 3 : ETUDE DU CIBLAGE <i>IN VITRO</i> DE LA VOIE BETA-ADRENERGIQUE DANS	
	L'ANGIOSARCOME	152
	MATERIELS ET METHODES.....	153
	RESULTATS	167
	DISCUSSION	187
	CONCLUSION.....	196
	PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS	197
	BIBLIOGRAPHIE	200
	ANNEXES.....	216

LISTE DES ABBREVIATIONS

ADRB	Beta adrenergic receptor
AMM	Autorisation de mise sur le marché
AMPC	Adénosine monophosphate cyclique
Ang	Angiopoietin
ANTXR1	Anthrax toxin recepteur 1
AQP	Aquaporine
ATF	Activating transcription factor
ATP	Adenosine triphosphate
bFGF	Basic fibroblast growth factor
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
CD	Cluster of differentiation
COMT	Catechol-o-methyl transferase
CREB	cAMPC response element binding protein
Ea	Energie d'activation
EGF	Epidermal growth factor
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent
EMT	Epithelial-mesenchymal transition
EPAC	Exchange protein directly activated by cAMP
FAK	Focal adhesion kinase
Flk-1	Fetal liver kinase 1
Flt	Fms Related Receptor Tyrosine Kinase
GLUT-1	Glucose transporter 1
HI	Hémangiome infantile
HIF-1-alpha	Hipoxia-inductible factor 1 alpha
IGF	Insulin-like growth factor
IL	Interleukin
ISSVA	International society for the study of vascular anomalies
KDR	Kinase insert domain receptor

LUMBAR	Lower body hemangioma, Urogenital anomalies, Ulceration, Myelopathy, Bony deformities, Anorectal malformations, Arterial anomalies, and Renal anomalies
MAO	Monoamine oxidase
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein-1
MMP	Matrix metalloproteinase
NFAT	Nuclear factor of activated T-cell
NG2	Neuron-glia 2
NICH	Non involuting congenital hemangioma
NO	Nitric oxide
Oct4	Octamer-binding transcription factor 4
PECAM-1	Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule 1
Pd	Perméabilité diffusionnelle
Pf	Perméabilité osmotique
PDGFR	Platelet-derived growth factor receptor
PHACES	Posterior fossa malformations, Hemangioma, Arterial anomalies, Cardiovascular anomalies, Eye anomalies
PIGF	Placenta growth factor
PKA	Protein kinase A cAMP-dependant
RICH	Rapidly involuting congenital hemangioma
RIO	Oxygen-induced retinopathy
SDF-1α	Stromal cell-derived factor-1 α
TAM	Tumor associated macrophages
TEM8	Tumor endothelial marker 8
TGF	Tumor growth factor
TH	Tyrosine hydroxylase
Tie-2	Tyrosine kinase with immunoglobulin and EGF homology domains-2
TIMP	Tissue inhibitor of metalloproteinase
uPAR	Urokinase plasminogen activator surface receptor
VEGFR	Vascular endothelial growth factor receptor
vWF	von Willebrand factor
VHL	Von Hippel Lindau
α-SMA	Alpha-smooth muscle actin

TABLE DES FIGURES

Figure 1 : Genèse du système vasculaire.....	21
Figure 2 : Les différentes étapes de l'angiogenèse.	23
Figure 3 : Structure des catécholamines avec leur noyau catéchol.....	27
Figure 4 : Voie de biosynthèse des catécholamines.....	29
Figure 5 : Les principales voies du métabolisme des catécholamines	30
Figure 6 : Structure du récepteur bêta-2 adrénergique.....	32
Figure 7 : Voie canonique de signalisation des récepteurs bêta-adrénergiques.....	33
Figure 8 : Schéma représentant la voie de signalisation induite par la noradrénaline dans les cellules de carcinome de l'ovaire.....	34
Figure 9 : La signalisation bêta-adrénergique dans le cancer	36
Figure 10 : Structure du propranolol	38
Figure 11 : Site de fixation des catécholamines et du propranolol sur les récepteurs bêta-adrénergiques	39
Figure 12 : Structure de la peau	40
Figure 13 : Structure de l'épiderme	41
Figure 14 : Tâche blanche anémique de vasoconstriction de l'hémangiome infantile visible à la naissance.....	43
Figure 15 : Localisations anatomiques des hémangiomes infantiles	43
Figure 16 : Phases d'évolution des hémangiomes infantiles	45
Figure 17 : Schéma résumant les voies de signalisation altérées dans l'hémangiome infantile.	48
Figure 18 : Régulation de la stabilité de HIF par l'oxygène.....	50
Figure 19 : Caractérisation des télocytes.....	54
Figure 20 : Angiosarcome du cuir chevelu et du visage	61
Figure 21 : Apparition d'un angiosarcome cutané sous forme de papule rouge et multifocale	62
Figure 22 : Transport passif de l'eau à travers un canal hydrique	68
Figure 23 : Structures des monomères et homotétramères des aquaporines	70

Figure 24 : Représentation schématique de la topologie d'aquaporine 1	70
Figure 25 : Modélisation de la structure d'aquaporine 1 par cristallographie électronique	71
Figure 26 : Distribution spécifique des aquaporines dans les différents tissus humains	72
Figure 27 : Expression et localisation des aquaporines le long d'un néphron rénal	75
Figure 28 : Mécanisme possible de la migration cellulaire dépendante d'aquaporine 1	78
Figure 29 : Mécanisme possible de l'implication d'aquaporine 1 dans la croissance et l'angiogenèse tumorales	79
Figure 30 : Carte des vecteurs utilisés pour moduler l'expression d'ADRB2 et d'AQP1	154
Figure 31 : Protocole de Scratch Assay sur système IncuCyte	162
Figure 32 : Mise au point du test de sphéroïdes	164
Figure 33 : Structure du MTS tetrazolium et son produit, le Formazan	165
Figure 34 : Test de migration par Cell Comb™ Scratch Assay.....	166
Figure 35 : Expression d'AQP1 et des récepteurs ADRB dans l'angiosarcome. ...	168
Figure 36 : Validation des modèles cellulaires utilisés.....	169
Figure 37 : Effet des modulations géniques sur la croissance cellulaire des lignées ISO-HAS et MO-LAS	171
Figure 38 : Etude de la cytotoxicité du propranolol sur les lignées ISO-HAS et MO-LAS.....	172
Figure 39 : Effet du propranolol sur les propriétés tubulogéniques des lignées ISO-HAS et MO-LAS.	174
Figure 40 : Effet du propranolol sur la migration des cellules ISO-HAS et MO-LAS	176
Figure 41 : Effet de la surexpression d'AQP1 sur la migration des cellules MO-LAS et ISO-HAS.....	178
Figure 42 : Effet du propranolol sur la migration des cellules ISO-HAS en fonction de la surexpression d'AQP1	179
Figure 43 : Analyse protéomique des voies de signalisation impactées par le propranolol sur les cellules MO-LAS	181

Figure 44 : Effet du propranolol sur la génération de sphéroïdes tumoraux dans la lignée MO-LAS	183
Figure 45 : Effet du propranolol sur les sphéroïdes tumoraux dans la lignée MO-LAS	184
Figure 46 : Effet du propranolol et de l'aténolol sur les sphéroïdes tumoraux des cellules invalidées pour ADRB2.....	186
Figure 47 : Représentation schématique de vaisseaux normaux et d'hémangiome infantile pour l'expression de GLUT-1, AQP1 et CD34	188
Figure 48 : Modèle proposé de régulation d'AQP1 dans le télocyte d'hémangiome infantile par l'hypoxie et la noradrénaline.....	189
Figure 49 : Modèle proposé de la signalisation vasculaire et périvasculaire dans l'HI et son implication dans la réponse au propranolol.....	191
Figure 50 : Modulation d'AQP1 dans les télocytes d'hémangiome infantiles <i>in vitro</i>	216
Figure 51 : Effet du propranolol sur la formation de sphéroïdes par les cellules ISO-HAS surexprimant AQP1	217

TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Affinité de bêtabloquants courants pour les récepteurs bêta-adrénergiques.....	38
Tableau 2 : Expression des aquaporines dans les tumeurs humaines	73
Tableau 3 : Anticorps primaires et secondaires utilisés pour les immunomarquages	157
Tableau 4 : Liste des oligonucléotides utilisés pour la RT-qPCR.....	158
Tableau 5 : Comparaison des groupes analysés par protéomique.....	166

INTRODUCTION

Avant-propos

Dans le champ des anomalies vasculaires, on distingue deux grands groupes : les malformations vasculaires causées par une altération de la structure des vaisseaux et les tumeurs vasculaires associées à une prolifération anormale des cellules situées sur la paroi interne des vaisseaux. Elles ont été classifiées par l'ISSVA (International Society for the Study of Vascular Anomalies, classification révisée en 2018). Ce projet de recherche s'intéresse aux tumeurs vasculaires, qui comprennent les formes bénignes telles que les hémangiomes infantiles et les hémangiomes congénitaux, et les tumeurs vasculaires malignes telles que les angiosarcomes. Le travail expérimental réalisé au cours de cette thèse porte sur la physiopathologie de la signalisation bêta-adrénergique, et particulièrement sur l'étude du ciblage de cette voie par un bêtabloquant, le propranolol, dans le traitement de deux tumeurs vasculaires cutanées : l'hémangiome infantile et l'angiosarcome.

Contexte de l'étude et objectifs des travaux

La découverte fortuite en 2008 de l'efficacité du propranolol dans le traitement des hémangiomes infantiles (HI) par le docteur Christine Léauté-Labrèze, dermatologue au sein du CHU de Bordeaux, a ouvert le champ d'une nouvelle voie thérapeutique pour d'autres tumeurs à composante vasculaire, en particulier les angiosarcomes. L'angiosarcome est une tumeur vasculaire maligne d'origine endothéliale qui se développe principalement au niveau cutané. C'est une tumeur particulièrement agressive et son faible taux d'incidence rend difficile le développement de nouvelles thérapies efficaces. Elle est associée à un mauvais pronostic et il n'existe actuellement aucun consensus sur le traitement optimal de ce cancer qui résiste à la chirurgie et aux chimiothérapies. Les mécanismes d'action qui sous-tendent les effets anti-tumoraux observés après traitement au propranolol à la fois en clinique pour les HI et les angiosarcomes et dans les études *in vitro* ne sont pas entièrement élucidés. Or, il est nécessaire de mieux comprendre ses mécanismes d'action, à la fois pour identifier

de nouveaux marqueurs prédictifs de réponse et pour pouvoir le proposer dans un schéma thérapeutique pour le traitement d'autres tumeurs vasculaires, notamment les plus agressives.

La voie bêta-adrénergique régule plusieurs processus cellulaires impliqués dans l'initiation et la progression tumorales¹. Dans l'HI, les récepteurs bêta-adrénergiques (ADRB) sont exprimés par différents types cellulaires, les cibles du propranolol dans cette tumeur peuvent donc être multiples². Les travaux de l'équipe ont permis d'une part d'identifier un nouveau type de cellules interstitielles CD34⁺/PDGFR- α ⁺ dans le microenvironnement de l'HI, les télocytes. D'autre part, des souris immunodéficientes ont été xéno greffées, en sous cutané, avec la lignée de glioblastome U87-MG contrôle ou invalidée par shARN pour le récepteur ADRB2 puis traitées par le propranolol. Une étude protéomique réalisée sur les tumeurs induites a permis d'identifier la protéine aquaporine 1 (AQP1) comme cible du propranolol. La surexpression et l'implication d'AQP1 dans des processus tumoraux tels que la migration ou l'angiogenèse sont associées à un mauvais pronostic dans plusieurs cancers. Une étude de sur- et de sous-expression d'AQP1 dans ce modèle murin a confirmé le rôle d'AQP1 dans la croissance tumorale et la réponse au propranolol. De manière surprenante, l'analyse par immunofluorescence d'AQP1 dans l'HI a révélé une localisation histopathologique de la protéine, qui est présente au niveau des télocytes périvasculaires et anormalement absente au niveau des cellules endothéliales.

Les catécholamines, agonistes endogènes des récepteurs ADRB, peuvent être sécrétées et ainsi participer à la modulation de l'angiogenèse tumorale³. Nous avons postulé qu'il pouvait exister une implication des catécholamines dans la physiopathologie de l'HI et la réponse au propranolol.

Les angiosarcomes expriment également les récepteurs ADRB, suggérant un possible effet thérapeutique du propranolol dans ces tumeurs.

L'introduction, structurée en 5 chapitres, présente successivement la morphogenèse vasculaire, les catécholamines et la voie bêta-adrénergique, les deux pathologies étudiées, l'hémangiome infantile et l'angiosarcome, et enfin les aquaporines et leur rôle dans la tumorigenèse, afin de situer le contexte scientifique et les objectifs de ce travail de recherche.

1. MORPHOGENESE VASCULAIRE

Les vaisseaux sanguins forment un réseau vasculaire régulier et organisé selon une hiérarchie qui inclut les artères, les artérioles, les capillaires, les veinules post-capillaires ainsi que des petites et larges veines. La formation de néovaisseaux se déroule au cours du développement embryonnaire mais aussi chez l'adulte. C'est un processus complexe qui a lieu à la fois en conditions physiologiques et pathologiques et qui nécessite une fine régulation de l'équilibre des facteurs pro- et anti-angiogéniques. L'endothélium contrôle plusieurs fonctions vasculaires telles que le tonus vasculaire, la perméabilité vasculaire et l'angiogenèse.

Sont détaillés ci-dessous les deux mécanismes qui supportent la formation des vaisseaux : la vasculogenèse et l'angiogenèse.

1.1. VASCULOGENESE

La vasculogenèse embryonnaire désigne le processus de formation du premier réseau vasculaire primitif. Ce processus a lieu lors de la gastrulation embryonnaire et est initié par la différenciation de progéniteurs endothéliaux, les hémangioblastes, pour donner naissance à un réseau vasculaire primitif⁴. Les hémangioblastes dérivent du mésoderme de l'embryon et forment des agrégats appelés îlots sanguins. Ces îlots sanguins migrent puis se différencient. Les cellules situées à l'intérieur des îlots se différencient en cellules hématopoïétiques, tandis que les cellules situées en périphérie, appelées angioblastes, se différencient en cellules endothéliales⁵ (Figure 1). La différenciation du mésoderme en angioblastes puis en cellules endothéliales est à l'origine de la formation de vaisseaux sanguins primitifs *in situ*. Les angioblastes précoces sont définis par l'expression de marqueurs endothéliaux tels que PECAM-1 (molécule d'adhésion endothéliale plaquettaire-1 ou CD31), de marqueurs de cellules souches tels que CD34, des récepteurs au VEGF (VEGFR-1 et VEGFR-2) et de molécules d'adhésion cellulaire telle que VE-cadhérine².

Le bFGF, le VEGF et ses récepteurs sont nécessaires à la vasculogenèse. VEGFR-2 exprimé à la surface des angioblastes initie leur différenciation en cellules endothéliales *via* l'action paracrine du VEGF produit par l'endoderme⁴. Le VEGF est également nécessaire au maintien de la différenciation et de la survie des angioblastes

car la délétion d'une copie de son gène entraîne la mort *in utero* de la souris associée à une formation anormale de vaisseaux⁶.

D'autres facteurs comme la fibronectine et son récepteur $\alpha 5\beta 1$ ont un rôle déterminant dans la vasculogénèse au point que leur délétion induit aussi une altération vasculaire létale précoce⁵.

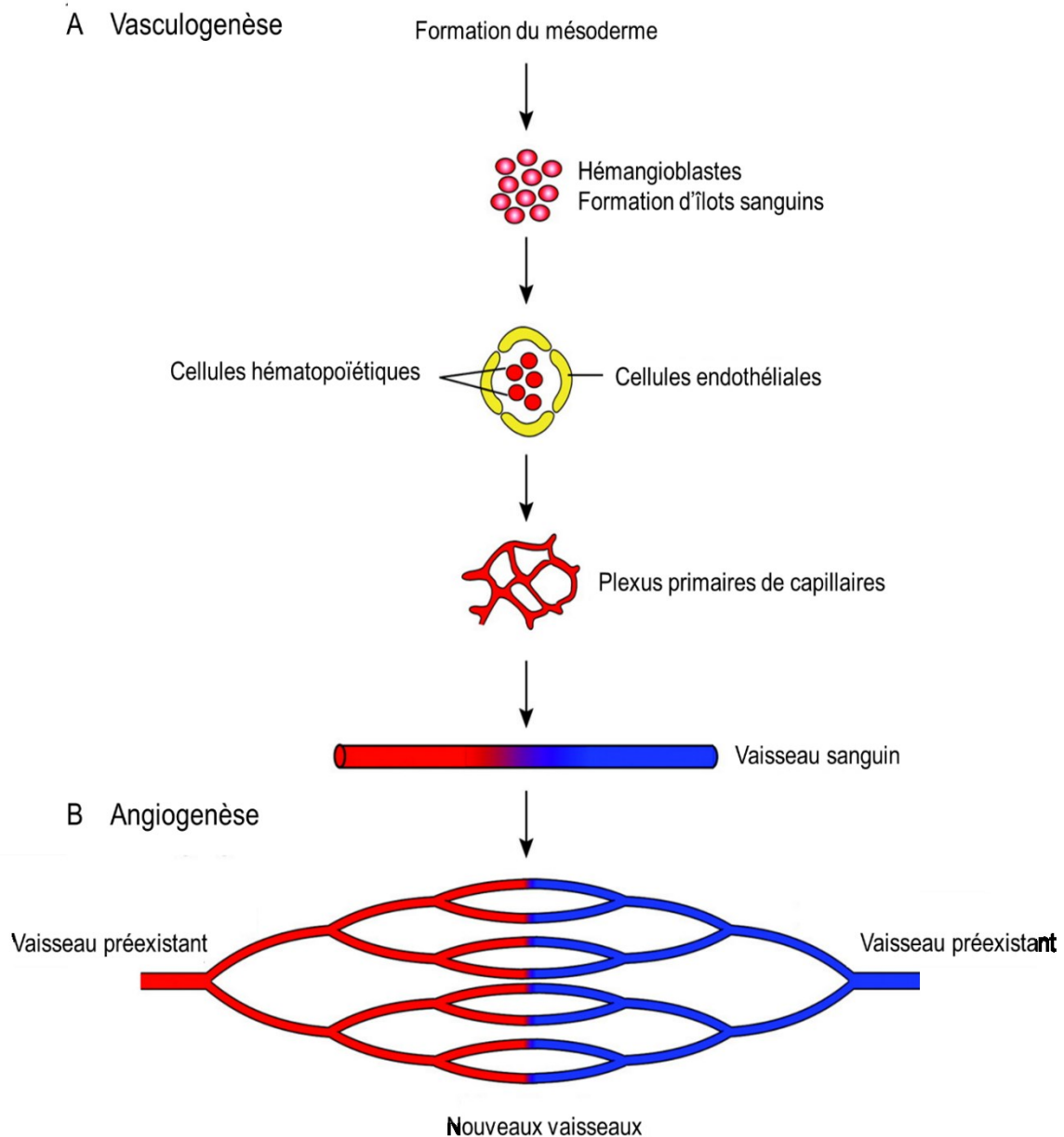


Figure 1 : Genèse du système vasculaire. (A) Au cours du développement embryonnaire, les cellules du mésoderme se différencient en hémangioblastes qui induisent la formation d'agrégats appelés îlots sanguins primitifs. Les cellules situées en périphérie de ces îlots se différencient en angioblastes, qui sont les précurseurs des cellules endothéliales. La migration des cellules endothéliales permet la fusion des îlots sanguins et la formation vasculogénique de plexus primaires de capillaires, dont le remodelage conduit à la formation de vaisseaux plus larges. **(B)** L'angiogenèse permet la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux préexistants. D'après Lamalice, 2007¹³.

Des études suggèrent que la vasculogénèse n'est pas restreinte au développement embryonnaire et peut également survenir chez l'adulte. Dans le sang et la moelle osseuse, la présence de précurseurs endothéliaux appelés EPC (*endothelial progenitor cells*) similaires aux angioblastes embryonnaires, qui peuvent être recrutés sur les sites de néovascularisation, a été détectée⁷. Ces précurseurs possèdent des propriétés de cellules endothéliales car ils expriment les marqueurs endothéliaux classiques, dont VEGFR-2, Tie-1, Tie-2, CD34 et VE-cadhérine⁷. En réponse à des stimuli tels qu'une diminution de l'oxygénation dans un tissu ischémié, les EPC qui résident dans la moelle osseuse peuvent être mobilisées dans la circulation et coloniser les sites de formation de nouveaux vaisseaux sanguins pour permettre une meilleure reperfusion du tissu. Enfin, la vasculogénèse médiée par les EPC a un rôle dans le développement tumoral et l'essaimage métastatique. Les EPC peuvent être recrutées au niveau des sites tumoraux en réponse à des facteurs sécrétés par les cellules tumorales tels que le VEGF et le SDF-1 α (*stromal cell-derived factor-1 α*), supportant ainsi la formation de néovaisseaux⁸. Le ciblage des EPC dans le développement de molécules anti-vasculaires pour le traitement de cancers présente ainsi un potentiel bénéfique thérapeutique.

1.2. ANGIOGENESE

L'angiogénèse est un processus de néovascularisation qui prend naissance à partir d'un réseau vasculaire préexistant. Elle est impliquée dans de nombreux processus physiologiques indispensables tels que la cicatrisation et la reproduction, mais intervient aussi dans de nombreux contextes pathologiques comme l'hémangiome et le cancer.

1.2.1. Angiogenèse physiologique

L'angiogénèse est le processus par lequel de nouveaux vaisseaux se développent à partir de vaisseaux sanguins préexistants. Elle requiert plusieurs mécanismes, incluant la dégradation de la membrane basale, la migration des cellules endothéliales et la tubulogénèse, suivi du recrutement de cellules périvasculaires⁹. Plus précisément, au

cours du bourgeonnement ou « sprouting », quelques cellules endothéliales sont activées, ce qui induit la libération de métalloprotéases (MMP) qui dégradent la membrane basale et la matrice extracellulaire environnante. Les cellules endothéliales entament une migration orientée, suivie d'une étape de prolifération puis d'une différenciation en structures capillaires matures et quiescentes (Figure 2).

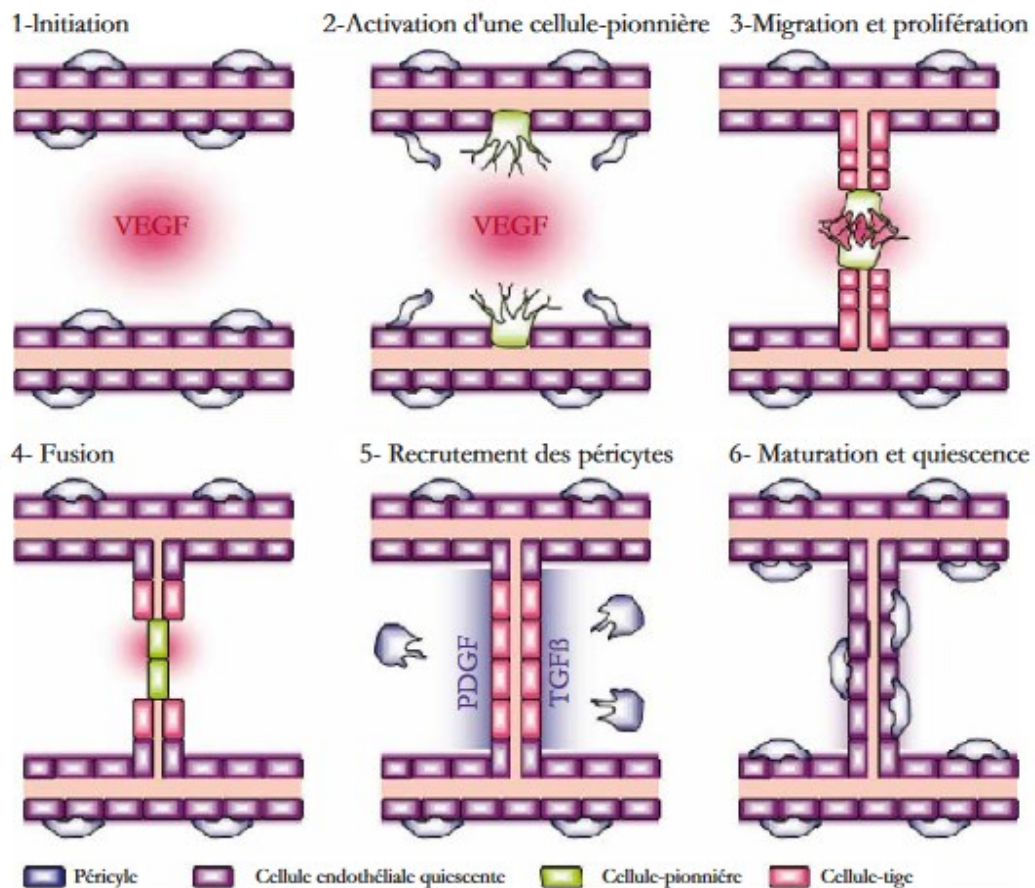


Figure 2 : Les différentes étapes de l'angiogenèse. L'angiogenèse normale comprend deux phases principales : une phase d'activation (1-4) et une phase de maturation (5 et 6). La phase d'activation est initiée suite à une hypoxie locale qui génère un gradient de VEGF (tâche rouge) (1). Ce gradient induit le détachement des péricytes puis la migration d'une cellule pionnière, ou cellule front, sélectionnée en direction de la source de VEGF en émettant des filopodes (2-3). Les cellules tiges prolifèrent en suivant la cellule pionnière et allongent ainsi le bourgeonnement (3). La rencontre de deux cellules pionnières conduit à la fusion de deux bourgeonnements puis à la formation d'un nouveau vaisseau (4) qui permet la circulation sanguine et l'oxygénation du tissu. Les cellules endothéliales sécrètent des facteurs de maturation qui stimulent le recrutement des péricytes et le dépôt d'une matrice extracellulaire (5). Les péricytes recrutés recouvrent et stabilisent le nouveau vaisseau, qui entre en quiescence (6). D'après Feige, 2010⁹.

L'angiogenèse intervient entre autres dans la réparation tissulaire et dans la fonction reproductive chez l'adulte. En condition normale, l'angiogenèse résulte d'un équilibre entre les facteurs pro-angiogéniques et anti-angiogéniques et est régulée par deux principales voies de signalisation :

- Voie du VEGF : le VEGF-A ou VEGF a un rôle clé dans l'angiogenèse. Il module la migration des cellules endothéliales pour l'expansion et l'architecture du réseau vasculaire. La famille des glycoprotéines VEGF inclut VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E ainsi que les facteurs de croissance placentaires (PIGF). Ils représentent les principaux facteurs impliqués dans l'angiogenèse normale¹⁰. Les protéines VEGF se fixent avec différentes affinités sur les récepteurs à activité tyrosine kinase VEGFR-1 (Flt-1), VEGFR-2 (Flk-1/KDR) et VEGFR-3 (Flt-4). VEGF-A interagit avec une forte affinité avec les récepteurs VEGFR-1 et VEGFR-2. La fixation de VEGF-A sur VEGFR-2 stimule l'angiogenèse. VEGF-C et VEGF-D se lient préférentiellement au VEGFR-3 pour réguler le développement du système lymphatique¹¹. La fixation de VEGF-A sur VEGFR-2 stimule la prolifération, la migration et la survie des cellules endothéliales¹². La signalisation médiée par VEGFR-2 joue ainsi un rôle important dans les réponses pro-angiogéniques du VEGF-A. VEGFR-1, récepteur à faible activité kinase, est exprimé par les cellules endothéliales et non endothéliales. Il assure un rôle anti-angiogénique en exerçant une fonction de « piège » de VEGF-A. Cet effet est lié à une forte affinité de VEGFR-1 pour VEGF-A par rapport au récepteur VEGFR-2. La perte du gène codant VEGFR-1 entraîne une létalité embryonnaire associée à une forte croissance vasculaire, résultat de la prolifération accrue des cellules endothéliales¹³. Cela suggère un rôle de modulation négative de VEGF-A par VEGFR-1 au cours du développement.
- Voie des angiopoïétines : Il existe quatre angiopoïétines, codées par les gènes *ANGPT1*, *ANGPT2*, *ANGPT3*, *ANGPT4*. L'angiopoïétine-1 (Ang-1) et l'angiopoïétine-2 (Ang-2) sont particulièrement importantes dans la régulation de l'angiogenèse. Elles se fixent aux récepteurs tyrosine kinase Tie, avec Tie-

2 comme récepteur primaire¹⁴. Tie-2 est constitutivement exprimé par les cellules endothéliales, mais aussi par les cellules hématopoïétiques. L'Ang-1 est produite par les cellules périvasculaires (péricytes et cellules musculaires lisses). Sa fixation sur Tie-2 permet la stabilisation des vaisseaux en augmentant la survie des cellules endothéliales, leur maintien dans un phénotype de quiescence et en favorisant les jonctions serrées entre les cellules endothéliales et les cellules périvasculaires¹⁴. L'Ang-2 a initialement été identifiée comme facteur anti-angiogénique en exerçant un rôle d'antagoniste naturel du récepteur Tie-2, sur lequel elle se fixe avec la même affinité que l'Ang-1¹⁵. Cependant, son rôle dans l'angiogenèse est plus complexe et dépend du contexte. L'Ang-2 est produite par les cellules endothéliales. En excès et en présence de VEGF, sa liaison sur Tie-2 antagonise les effets de l'Ang-1 en favorisant la déstabilisation capillaire par augmentation de la plasticité, de la migration et de la prolifération des cellules endothéliales, ce qui conduit à un remodelage vasculaire¹³.

En résumé, l'état quiescent de la cellule endothéliale dépend du récepteur Tie-2, du rapport de concentration entre l'agoniste (Ang-1) et l'antagoniste (Ang-2) et de la présence de VEGF.

1.2.2. Angiogenèse tumorale

L'angiogenèse pathologique peut survenir dans plusieurs contextes tels que le cancer, les maladies cardiovasculaires ischémiques, la cicatrisation ou l'inflammation. L'angiogenèse est une étape critique dans la croissance et le développement des tumeurs. Les tumeurs solides ne peuvent croître au-delà de 2-3 mm³ sans un support vasculaire qui permet, en outre, la création d'un passage pour la dissémination de la tumeur. Des anomalies génétiques telles que des mutations de p53, Ras ou VHL (von Hippel-Lindau) entraînent l'apparition de contextes pro-angiogéniques anormaux, qui se manifestent par une très forte sécrétion de facteurs de croissance pro-angiogéniques stimulant une formation chaotique de vaisseaux immatures.

Au sein de la tumeur, la régulation équilibrée des facteurs pro- et anti-angiogéniques est aussi perdue, donnant lieu à une formation accrue et anormale de néovaisseaux

caractérisés par un défaut de structure et de fonction (perméabilité accrue)^{9,16}. La formation d'un nouveau capillaire sanguin à partir d'un vaisseau sanguin préexistant est déclenchée par la mise en place d'un gradient de facteurs pro-angiogéniques tels que VEGF. En effet, au-delà de quelques millimètres cube, le centre de la tumeur devient hypoxique. Cette hypoxie locale induit la sécrétion de VEGF par les cellules tumorales, qui stimule la croissance des cellules endothéliales (Figure 2). Certaines cellules tumorales acquièrent une surexpression constitutive de VEGF.

Les thérapies anti-tumorales actuelles visent à inhiber la croissance et la progression des tumeurs malignes en ciblant le microenvironnement, support de leur croissance. La recherche de nouvelles molécules anti-angiogéniques reste une voie de choix pour développer de nouvelles thérapies ciblées.

2. CATHECOLAMINES ET VOIE BETA-ADRENERGIQUE

2.1. CATECHOLAMINES

2.1.1. Physiologie des catécholamines

La noradrénaline, l'adrénaline et la dopamine sont les trois catécholamines physiologiques. Ce sont des neurotransmetteurs endogènes et hormonaux monoaminés qui sont à l'origine de diverses réponses physiologiques et métaboliques avec un rôle important dans la transmission de l'information dans le cerveau¹⁷. En effet, un déséquilibre dans leur concentration peut entraîner des maladies neurodégénératives telles que la maladie de Parkinson¹⁸. Les catécholamines interagissent avec les récepteurs alpha et bêta-adrénergiques dans plusieurs tissus tels que le système nerveux central, le cœur et les poumons. La noradrénaline (norépinephrine) et l'adrénaline (épinéphrine) sont les agonistes naturels des récepteurs alpha- et bêta-adrénergiques. La dopamine est le ligand endogène de deux types de récepteurs spécifiques : la fixation sur le récepteur D1 augmente l'AMPc intracellulaire tandis que la fixation sur le récepteur D2 inhibe l'AMPc intracellulaire.

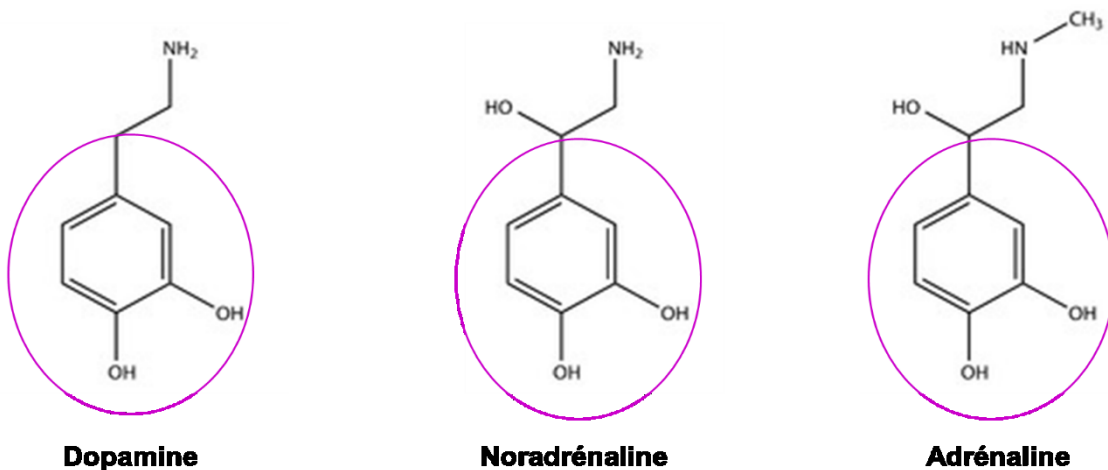


Figure 3 : Structure des catécholamines avec leur noyau catéchol.

2.1.2. Synthèse des catécholamines

Les catécholamines sont sécrétées dans le système nerveux central, en périphérie au niveau des terminaisons nerveuses des fibres sympathiques ainsi que par les cellules chromaffines des glandes surrénales, les cellules intestinales et les lymphocytes¹⁷. Les catécholamines sont synthétisées à partir d'un acide aminé précurseur, la L-tyrosine et possèdent de ce fait des structures chimiques similaires (Figure 3). L'alimentation ainsi que l'hydroxylation de la phénylalanine dans le foie sont les deux principales sources de L-tyrosine pour l'organisme. La synthèse comprend quatre réactions enzymatiques successives, chacune des réactions nécessitant une enzyme et un cofacteur spécifiques¹⁹ (Figure 4) :

- La tyrosine hydroxylase (TH) soluble et cytoplasmique convertit la L-tyrosine à son entrée dans la cellule chromaffine surrénale ou dans les terminaisons nerveuses catécholaminergiques cérébrales en dihydroxyphénylalanine (DOPA). L'activité de la TH dépend de la disponibilité du cofacteur tétrahydrobioptérine (BH₄), qui a donc un rôle important dans la régulation de la synthèse des catécholamines.
- L'acide L-aminé aromatique décarboxylase ou DOPA décarboxylase (AAAD ou DDC), dont l'activité dépend du niveau de son cofacteur pyridoxal phosphate, convertit la L-DOPA en dopamine.
- La dopamine β-hydroxylase (DBH), enzyme dépendante de l'acide ascorbique, convertit la dopamine, qui passe du cytoplasme dans les vésicules de stockage, en noradrénaline.
- La phényléthanolamine N-méthyltransférase (PNMT) inductible par les glucocorticoïdes utilise le cofacteur S-adénosyl-méthionine pour convertir la noradrénaline en adrénaline.

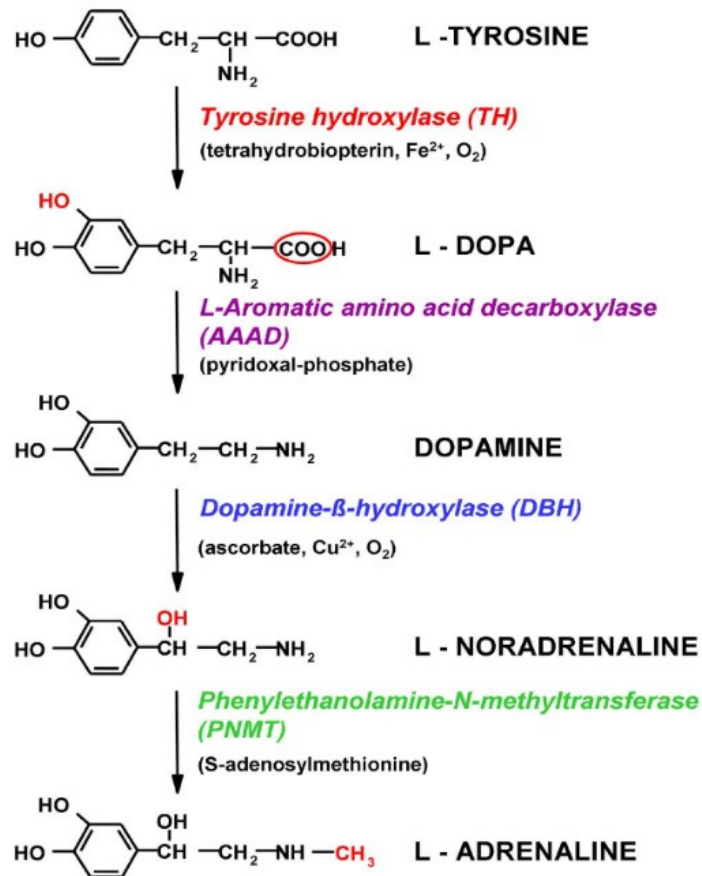


Figure 4 : Voie de biosynthèse des catécholamines. D'après Kvetnansky, 2009¹⁹.

2.1.3. Dégradation des catécholamines

La dégradation des catécholamines se fait par voie métabolique. Elles sont métabolisées en métabolites inactifs par le biais des enzymes catéchol-O-méthyltransférase (COMT) qui catalysent la méthylation des catécholamines et monoamine oxydase (MAO) qui catalysent leur désamination oxydative¹⁹. Les métabolites inactifs obtenus sont les métanéphrines conjuguées à l'acide glucuronique ainsi que les acides vanylmandélique (VMA), homovanillique (HVA) et alcools MHPG qui sont normalement éliminés dans les urines (Figure 5).

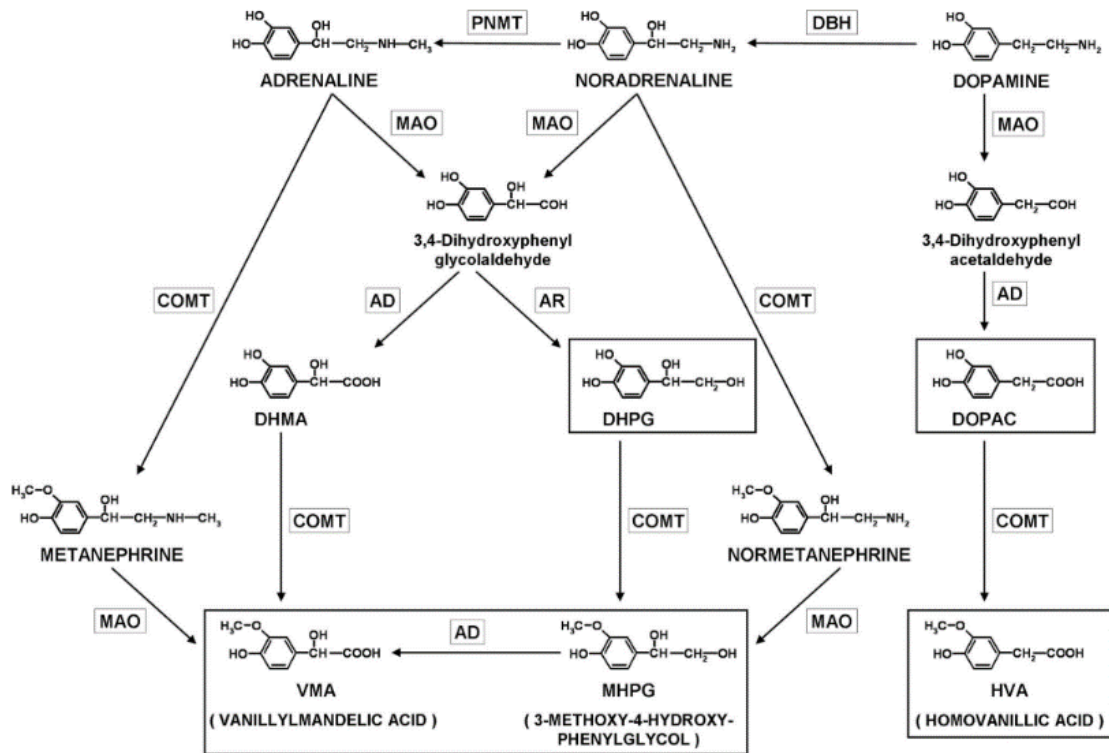


Figure 5 : Les principales voies du métabolisme des catécholamines. D'après Kvetnansky, 2009¹⁹.

2.2. VOIE DE SIGNALISATION BETA-ADRENERGIQUE

2.2.1. Physiologie de la voie bêta-adrénergique

Les fibres du système nerveux central (SNC) innervent tous les organes et sécrètent la noradrénaline (de l'ordre du micro molaire) dans les tissus cibles en réponse à une modulation physiologique, psychologique ou environnementale de l'homéostasie. La concentration des catécholamines dans la circulation sanguine n'est pas continue. Leur sécrétion/dégradation peut varier suite à une activation aiguë du SNC, un stress chronique ou suite à des processus de régulation locaux du système nerveux sympathique. Cela induit une fluctuation des quantités de catécholamines, dont la concentration peut varier entre les tissus solides, la circulation sanguine et les tissus environnants (jusqu'à dix fois plus par rapport au niveau basal et en quelques secondes)¹. La fixation de la noradrénaline et de l'adrénaline sur les récepteurs bêta-

adrénergiques active la protéine $G_{\alpha s}$ qui stimule la synthèse d'AMPc par l'adénylate cyclase. Le flux d'AMPc transitoire régule plusieurs processus cellulaires *via* deux systèmes de signalisation effecteurs en aval (Figure 9) :

- Voie de la PKA : l'activation de la PKA par l'AMPc permet la phosphorylation de protéines cibles sur des résidus sérine ou thréonine. La modulation de ces protéines cibles passe par la phosphorylation et l'activation par la PKA des facteurs de transcription CREB/ATF et de la kinase BARK. Cette dernière active la β -arrestine, qui inhibe la signalisation bêta-adrénergique par désensibilisation transitoire des récepteurs bêta-adrénergiques et active la voie Src/Ras/MAPK, le facteur de transcription STAT3 et la kinase d'adhésion focale FAK²⁰. La voie de la PKA module l'expression de cytokines et facteurs de croissance impliqués dans des processus cellulaires normaux (métabolisme, croissance, différenciation et migration cellulaires) et tumoraux (inflammation, angiogénèse et invasion)²¹.
- Voie de l'EPAC : la protéine EPAC (Exchange Protein Directly Activated by cAMP Type) active la tri-phosphatase Rap1A qui stimule à son tour les effecteurs de la signalisation B-Raf/MAPK qui modulent des processus cellulaires *via* les facteurs de transcription AP-1 et Ets. La voie de l'EPAC régule notamment la morphologie, la motilité et les dynamiques de sécrétion cellulaire²².

2.2.2. Récepteurs de la voie bêta-adrénergique

Il existe deux familles de récepteurs adrénérergiques : les récepteurs alpha1-, alpha2- et les récepteurs bêta-1, bêta-2 et bêta-3-adrénérergiques (ADRB1, ADRB2, ADRB3). Ces récepteurs se distinguent par leur structure, leur prédominance d'expression et leur distribution dans les tissus, les voies biochimiques activées ainsi que par leur préférence d'agonistes. Les récepteurs ADRB sont des récepteurs couplés à la protéine G à sept domaines transmembranaires divisés en trois boucles. Ils possèdent

une extrémité N-terminale extracellulaire et une extrémité C-terminale intracellulaire²³ (Figure 6).

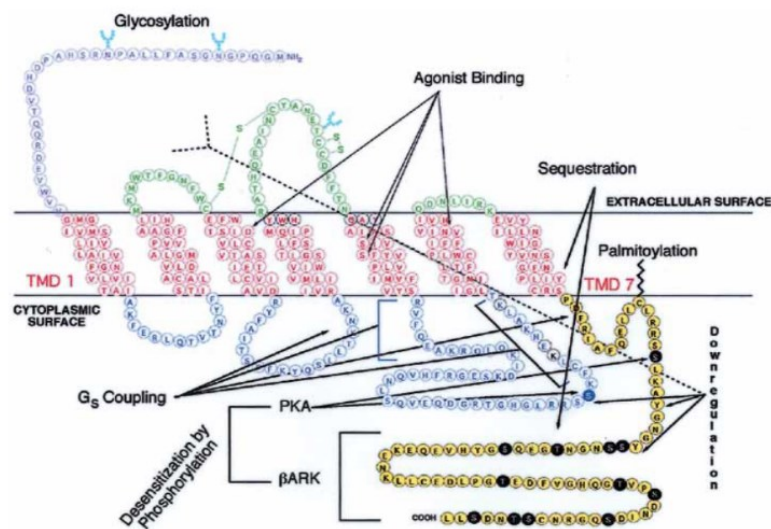


Figure 6 : Structure du récepteur bêta-2 adrénergique. D'après Liggett, 2002²³.

Les récepteurs ADRB1 sont principalement localisés dans le cœur, au niveau de la fente synaptique, et sont stimulés par la noradrénaline. Les récepteurs ADRB2 sont quant à eux présents dans le cœur mais aussi dans le muscle lisse des vaisseaux périphériques et des bronches où ils exercent un effet vaso- ou broncho-dilatateur. Ils sont aussi présents dans la région présynaptique où ils facilitent la sécrétion de noradrénaline. Localisés loin des terminaisons nerveuses adrénergiques, ils sont ainsi stimulés par la noradrénaline circulante. Les récepteurs ADRB3 sont principalement localisés dans le tissu adipeux où leur stimulation induit la lipolyse (Figure 7). La noradrénaline est plus affine pour les ADRB1 tandis que l'adrénaline possède la même affinité pour les deux types de récepteurs (ADRB1 et ADRB2).

Plusieurs facteurs (âge, hormones, contexte pathologique) peuvent moduler l'état physiologique des récepteurs ADRB. Ils sont exprimés dans divers types cellulaires dont les cellules de la peau, les cellules de l'endothélium et les mastocytes²⁴. Le récepteur ADRB2 est le plus exprimé dans les vaisseaux et son activation module la libération d'oxyde nitrique, qui conduit à la dilatation des vaisseaux. Les récepteurs ADRB ont été à l'origine identifiés comme régulateur clé de la contractilité cardiaque et de la relaxation des muscles squelettiques. Aujourd'hui, il leur est associé un rôle

important de senseur de surface cellulaire des catécholamines qui régulent plusieurs processus cellulaires essentiels pour l'angiogenèse comme la prolifération cellulaire, la migration ou l'apoptose.

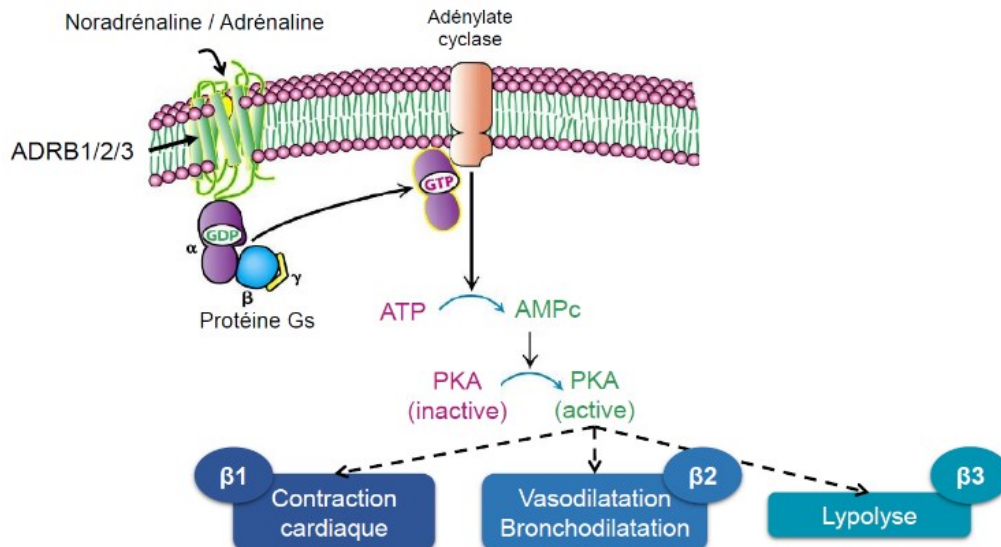


Figure 7 : Voie canonique de signalisation des récepteurs bêta-adrénergiques.

2.2.3. Voie bêta-adrénergique et cancer

2.2.3.1. Implication des catécholamines et de la voie bêta-adrénergique dans la tumorigenèse

Des observations épidémiologiques ont montré un lien entre le stress dû aux facteurs psychosociaux et l'accélération de la progression de cancers²⁵. Les agonistes de la voie bêta-adrénergique accélèrent la progression tumorale/métastase dans des modèles de cancers du sein et de l'ovaire^{26,27}. La signalisation bêta-adrénergique régule plusieurs processus tels que l'inflammation, l'angiogenèse, l'apoptose, la migration et la transition épithélio-mésenchymateuse qui participent à l'initiation et la progression de cancers.

Les récepteurs ADRB1, ADRB2 et ADRB3 sont exprimés dans une large variété de tissus, y compris vasculaires, ainsi que dans les tumeurs, en particulier les tumeurs du pancréas, poumons, ovaires et le mélanome²⁸. Les catécholamines sont des

régulateurs importants de l'angiogenèse tumorale. La noradrénaline et l'adrénaline en se fixant aux récepteurs ADRB dans les carcinomes de l'ovaire et du nasopharynx humains stimulent la sécrétion de facteurs pro-angiogéniques tels que VEGF, MMP-2 et MMP-9, le VEGF se fixant sur les récepteurs VEGFR-2 à la surface des cellules endothéliales tumorales^{27,29,30}. La noradrénaline peut également se fixer sur les récepteurs présents à la surface des macrophages associés aux tumeurs (TAM) et stimuler la production de MMP-9, favorisant ainsi l'angiogenèse tumorale³¹.

La signalisation bêta-adrénergique tumorale est régulée par le système nerveux sympathique *via* la sécrétion de noradrénaline et/ou d'adrénaline circulantes mais surtout *via* la noradrénaline synthétisée localement par les fibres nerveuses. Dans le carcinome de l'ovaire, la concentration de noradrénaline sécrétée localement est plus élevée dans le tissu tumoral que dans la circulation sanguine³². Une autre voie de signalisation, qui conduit à la néovascularisation dans le cancer de l'ovaire, implique la régulation par la noradrénaline de l'expression de la molécule pro-angiogénique interleukine-6 (IL-6), après sa phosphorylation par la kinase Src³³ (Figure 8).

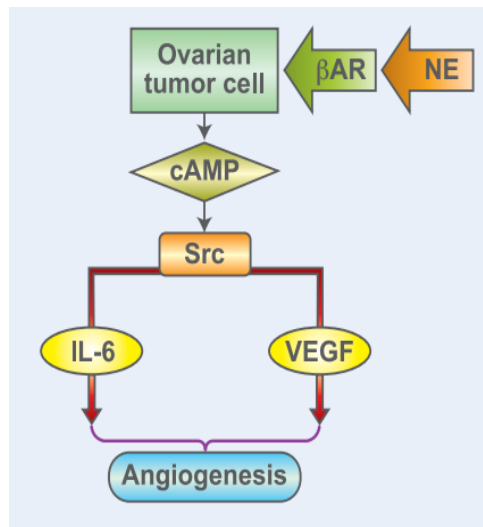


Figure 8 : Schéma représentant la voie de signalisation induite par la noradrénaline dans les cellules de carcinome de l'ovaire. NE : norépinephrine = noradrénaline. D'après Chakroborty, 2009³.

Des études ont montré un effet inhibiteur de la dopamine, *via* son récepteur D2, sur l'angiogenèse tumorale induite par le VEGF dans les cellules endothéliales et les progéniteurs endothéliaux dans les cancers^{34,35}.

Les catécholamines pourraient ainsi agir comme un « *switch* » angiogénique dans le microenvironnement tumoral : la noradrénaline en activant les récepteurs ADRB2 stimule l'angiogénèse tumorale alors que l'action de la dopamine sur ses récepteurs l'inhibe.

Ces études soulignent l'intérêt de la dopamine et des bêtabloquants, déjà utilisés en clinique dans d'autres pathologies, dans les thérapies anti-angiogéniques, en particulier dans les cancers.

2.2.3.2. Mécanismes d'action possibles

Plusieurs processus cellulaires et moléculaires contribuent à la progression tumorale induite par la voie bêta-adrénergique dans les cellules tumorales et les cellules du microenvironnement tumoral exprimant les récepteurs ADRB (telles que les cellules vasculaires et macrophages). Ces processus impliquent notamment (Figure 9) :

- L'inflammation *via* le recrutement de macrophages dans la tumeur primaire²⁶ et l'augmentation de l'expression et de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-6 et l'IL-8 par les cellules tumorales et immunitaires^{33,36}.
- L'angiogénèse *via* la production accrue de facteurs pro-angiogéniques dont le VEGF, les MMP, l'IL-6 et l'IL-8 qui stimulent l'angiogénèse et l'invasion^{27,29,37}. La surexpression d'ADRB2 par transfection dans l'endothélium de rat au niveau des artères fémorales améliore la perfusion sanguine en augmentant la densité capillaire dans un modèle d'ischémie chronique du membre inférieur³⁸.
- La résistance à l'anoikis (apoptose induite par détachement cellulaire) *via* l'activation des Focal adhesion kinases (FAK)³⁹.
- L'invasion et formation de métastases *via* la sécrétion de MMP-2 et MMP-9, facilitant la motilité et la migration des cellules tumorales.

- L'inhibition par la voie bêta-adrénergique de la réparation de l'ADN par p53⁴⁰ et des réponses cytotoxiques des lymphocytes T et des cellules NK⁴¹.

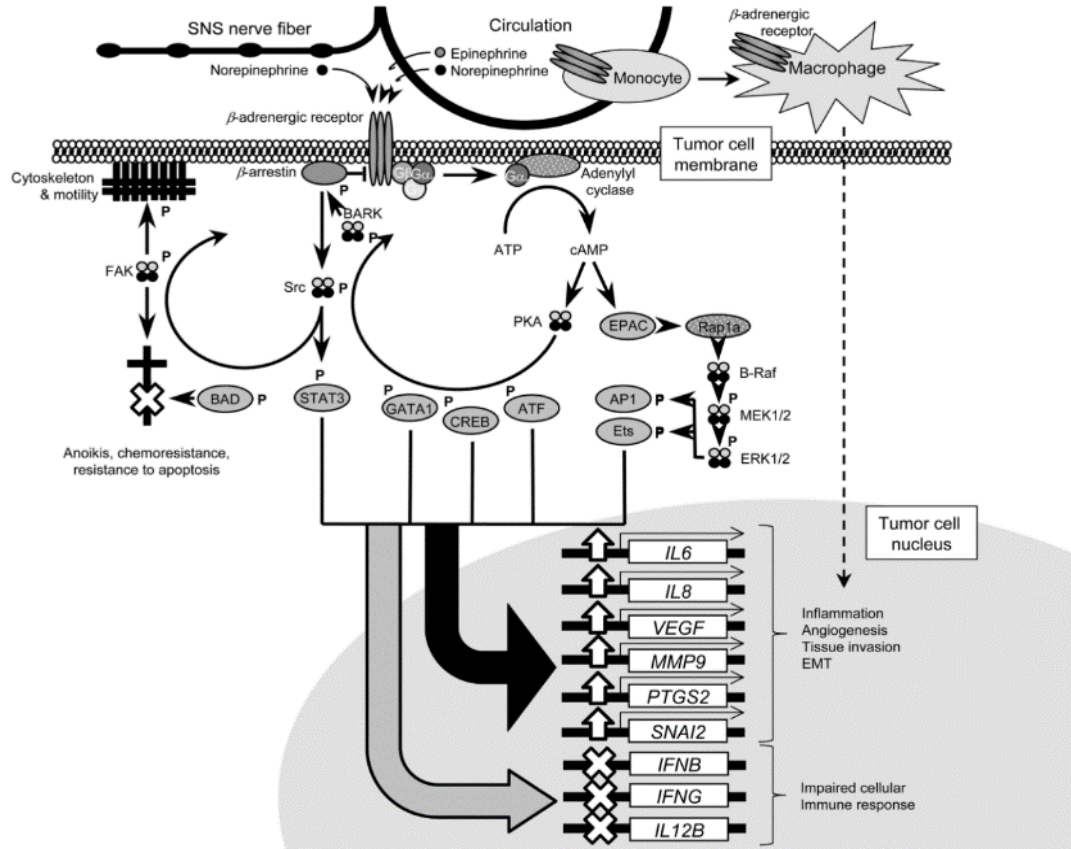


Figure 9 : La signalisation bêta-adrénergique dans le cancer. D'après Cole et Sood, 2012¹.

2.3. ANTAGONISTES DE LA VOIE BETA-ADRENERGIQUE

Plusieurs études précliniques ont montré le potentiel thérapeutique des bêtabloquants dans le traitement de cancers^{42,43}. Ils représentent une alternative disponible, peu coûteuse, avec peu d'effets secondaires et leur pharmacologie est bien maîtrisée. Cependant, leur utilisation en thérapie adjuvante dans les traitements anti-tumoraux doit être approuvée par des essais cliniques randomisés.

2.3.1. Modes d'action des bêtabloquants

Les bêtabloquants sont largement utilisés pour le traitement des maladies cardiovasculaires (ex : hypertension, arythmies), neurologiques (ex : migraines), gastroentérologiques (ex : hypertension portale), ophtalmologiques (ex : glaucomes, rétinopathie du prématuré ROP)^{44,45}.

Les bêtabloquants sont des antagonistes compétitifs des récepteurs ADRB. Ils se lient à ces derniers et empêchent la fixation des agonistes endogènes (adrénaline et noradrénaline) du fait de leur similarité structurale, et bloquent ainsi les effets de ces agonistes. On distingue les bêtabloquants selon leur affinité pour les récepteurs et selon la présence ou non d'une activité d'agoniste inverse. L'affinité détermine la sélectivité des bêtabloquants : les antagonistes sélectifs comme l'aténolol ont une affinité élevée pour les récepteurs ADRB1 et sont dits cardio-sélectifs, les antagonistes non sélectifs comme le propranolol et le timolol bloquent plusieurs types de récepteurs avec une affinité proche et sont dits non-cardio-sélectifs (Tableau 1). Les bêtabloquants sont aussi classés selon leur nature lipophile ou hydrophile : les molécules lipophiles telles que le propranolol sont capables de traverser la barrière hémato-encéphalique et sont éliminées par le métabolisme hépatique et les molécules hydrophiles telle que l'aténolol sont éliminées par voie rénale⁴⁶.

Récepteur	Localisation prédominante	Effet	Agoniste prédominant	Antagoniste prédominant (constante d'affinité $K_D \cdot 10^{-9}$)		
				Aténolol	Propranolol	Timolol
β_1	Cœur (Fente synaptique)	Augmente RC et contractilité	Noradrénaline/Adrénaline	218,78	6,91	5,37
β_2	Vaisseaux périphériques Bronches	Vasodilatation Bronchodilatation	Adrénaline	1023,29	0,83	0,21
β_3	Tissu adipeux	Lipolyse	Noradrénaline	234,42	117,49	158,49

Tableau 1 : Affinité de bêtabloquants courants pour les récepteurs bêta-adrénergiques. RC : rythme cardiaque. D'après Reiter, 2004⁴⁵.

2.3.2. Le propranolol

Le propranolol hydrochloride est un bêtabloquant synthétique compétitif non sélectif des récepteurs ADRB1 et ADRB2 et pourvu d'une activité d'agoniste inverse. Son nom chimique est (\pm) -1-Isopropylamino-3-(1-naphthyloxy) -2-propanol hydrochloride ($C_{16}H_{21}NO_2$) (Figure 10) et son poids moléculaire est de 295,8 g.mol⁻¹.

Le propranolol a été découvert par le scientifique britannique James Black en 1965 pour le traitement de l'angine de poitrine ; il a reçu le prix Nobel de Physiologie et de Médecine en 1988 pour ses travaux sur le propranolol et la cimétidine.

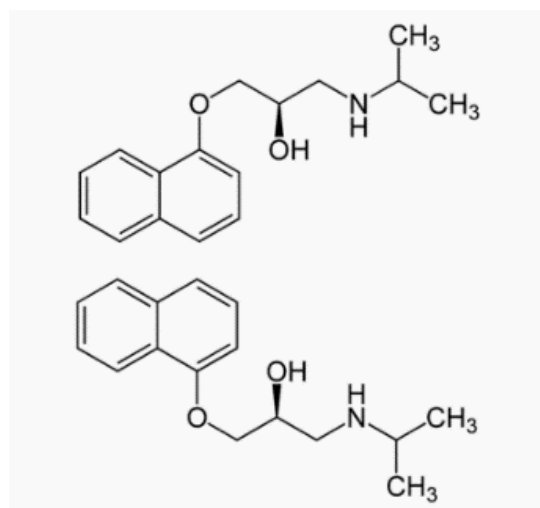


Figure 10 : Structure du propranolol (énantiomère R en haut et S en bas).

C'est l'une des premières drogues antagonistes de la signalisation bêta-adrénergique développée pour une utilisation thérapeutique. Il agit *via* un effet compétitif avec les agonistes bêta-adrénergiques endogènes (adrénaline ou noradrénaline) sur les sites des récepteurs ADRB1 ou ADRB2. Les formules commerciales sont un mélange racémique des deux énantiomères, le S-propranolol et le R-propranolol. Le propranolol, comme les catécholamines endogènes, se fixe sur les récepteurs ADRB *via* leurs groupes hydroxyle (-OH) et amine (-NH) (Figure 11).

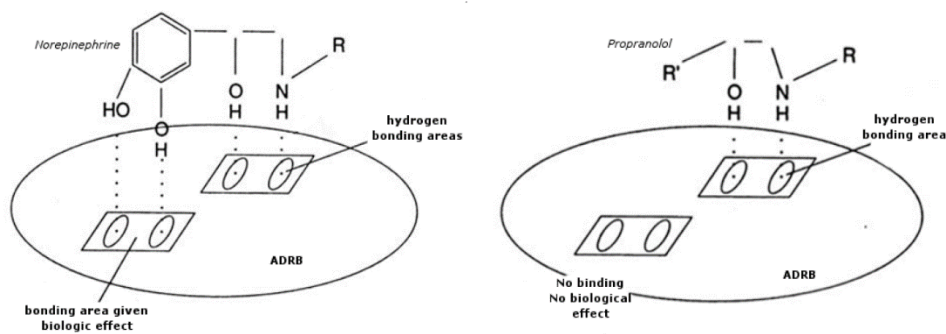


Figure 11 : Site de fixation des catécholamines et du propranolol sur les récepteurs bêta-adrénergiques Source : S.Prey.

3. L'HEMANGIOME INFANTILE : TUMEUR VASCULAIRE CUTANEE BENIGNE

Près de 90% des hémangiomes infantiles sont localisés dans la peau, dont 60% sur le visage et le cou. La peau offre donc un microenvironnement permissif et propice à la croissance de l'HI, qui est due à une prolifération accrue des cellules endothéliales des capillaires sanguins cutanés.

3.1. STRUCTURE DE LA PEAU

La peau comprend trois régions superposées qui sont, de la surface vers la profondeur, l'épiderme, le derme et l'hypoderme (Figure 12). Il existe une quatrième zone appelée jonction dermo-épidermique, qui sépare le derme de l'épiderme.

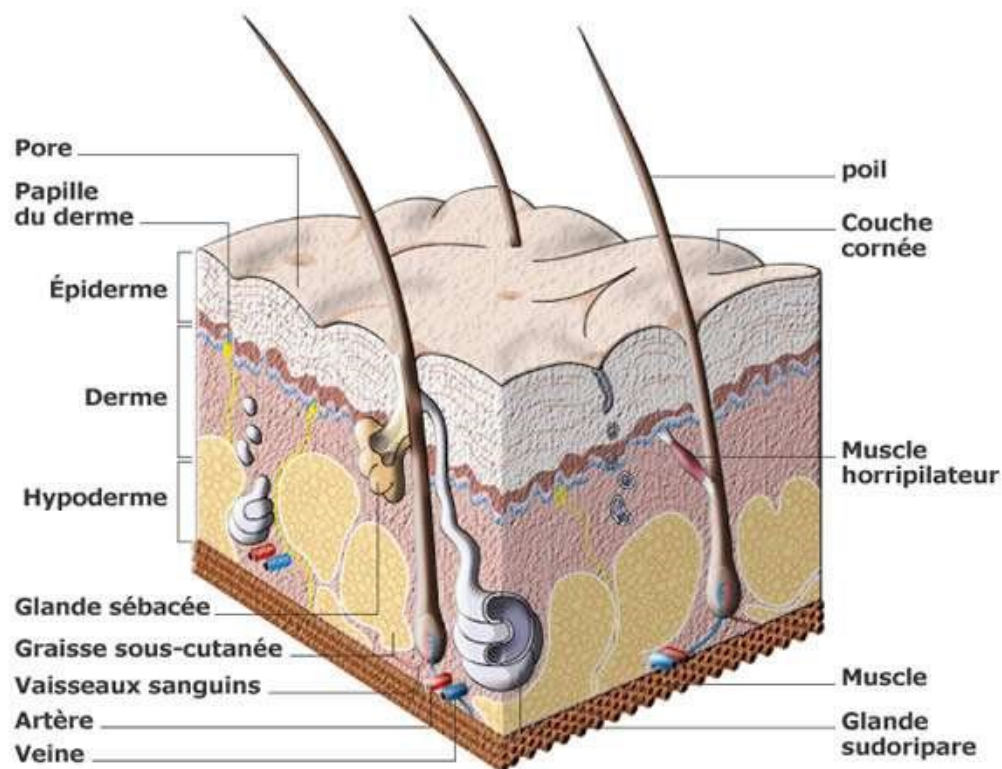


Figure 12 : Structure de la peau. Extrait de www.futura-sciences.com.

- L'épiderme

L'épiderme est un épithélium stratifié et non vascularisé composé de quatre types cellulaires : les kératinocytes, les mélanocytes, les cellules de Langerhans et les cellules de Merkel (Figure 13). Les kératinocytes représentent 90 à 95% des cellules épidermiques. Ils prolifèrent dans l'assise basale puis se différencient et migrent de la profondeur vers la surface pour former les différentes couches de l'épiderme. Les mélanocytes synthétisent la mélanine. Les cellules de Langerhans sont des cellules présentatrices d'antigène qui ont un rôle dans la réponse immunitaire. Enfin, les cellules de Merkel sont des mécanorécepteurs qui assurent des fonctions neuroendocrines.

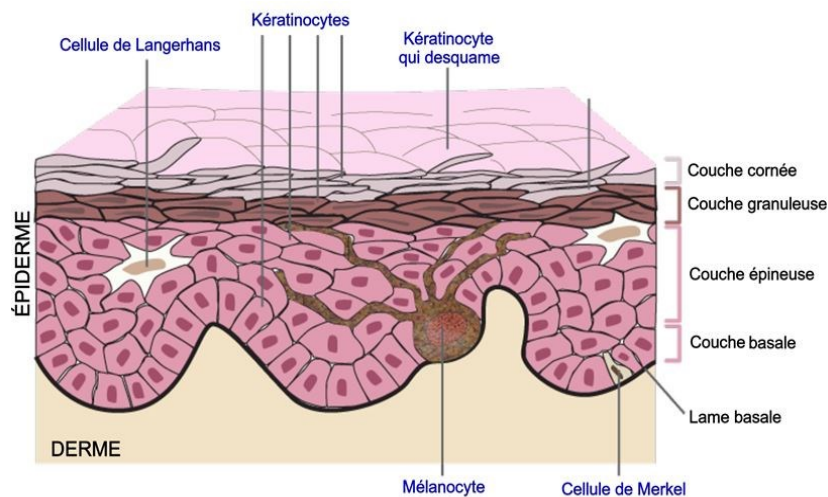


Figure 13 : Structure de l'épiderme. D'après cosmeticofficine.com.

- Le derme

Le derme est constitué de deux zones : l'une superficielle dite « derme papillaire » formé de tissu conjonctif lâche, l'autre plus profonde appelée « derme réticulaire » formé de tissu conjonctif plus dense. Le derme est composé majoritairement de fibroblastes, mais aussi de mastocytes et de macrophages. Le derme est richement vascularisé et innervé. Il assure un rôle de nutrition de l'épiderme, intervient dans le métabolisme, la cicatrisation et l'élimination de produits toxiques.

- **L'hypoderme**

L'hypoderme, ou tissu adipeux sous cutané, est formé de tissu conjonctif et est composé principalement d'adipocytes. Ces cellules sont riches en acides gras et en triglycérides et sont un support de réserves énergétiques.

3.2. PRESENTATION DE LA PATHOLOGIE

3.2.1. Définition et généralités

L'hémangiome infantile (HI) est la tumeur la plus fréquente chez les nouveau-nés. C'est une tumeur vasculaire bénigne qui survient quelques jours après la naissance et se manifeste par une croissance rapide et désorganisée de la masse tumorale durant les premières semaines. La tumeur finit par involuer spontanément au bout de quelques mois/années. Il existe d'autres tumeurs vasculaires plus rares appelées hémangiomes congénitaux, qui comprennent trois types de tumeurs classées selon leur involution (Hémangiomes Congénitaux Rapidement Involutifs, dits « RICH », Non-Involutifs « NICH », « Partiellement Involutifs « PICH »).

3.2.2. Caractéristiques cliniques

L'hémangiome infantile présente une dynamique de croissance particulière. La tumeur se présente à la naissance sous forme d'une lésion précurseur pâle sur la peau dite « macule anémique », signe d'une zone de vasoconstriction (Figure 14). L'HI évolue généralement quelques jours après en macule rougeâtre. Cliniquement, les hémangiomes sont classifiés selon leur morphologie et leur localisation anatomique dans la peau⁴⁷ (Figure 15) :

- *Hémangiomes infantiles cutanés superficiels* : localisés dans le derme supérieur, ils apparaissent comme des papules/nodules rouges ou violets à la surface de la peau.
- *Hémangiomes infantiles sous cutanés profonds* : localisés dans le derme profond et dans l'hypoderme, ils s'étendent aux tissus adipeux, avec une tumeur d'aspect bleuâtre et aux bordures non distinctes.

- *Hémangiomes infantiles mixtes* : localisés à la fois dans le derme superficiel et dans le derme profond.

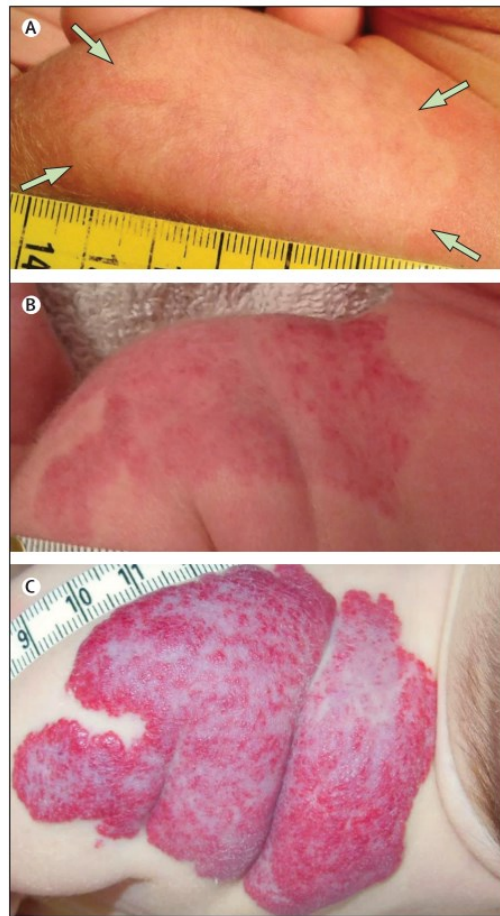


Figure 14 : Tâche blanche anémique de vasoconstriction de l'hémangiome infantile visible à la naissance. (A) Jour 3. (B) Jour 21. (C) Jour 90. D'après Léauté-Labrèze, 2017⁴⁷.



Figure 15 : Localisations anatomiques des hémangiomes infantiles. (A) Hémangiome superficiel. (B) Hémangiome profond. (C) Hémangiome mixte. D'après Léauté-Labrèze, 2017⁴⁷.

Une seconde classification permet de distinguer les HI selon la zone de la peau concernée :

- *HI localisés* : situés majoritairement sur le visage, ils représentent les formes les plus fréquentes.
- *HI segmentaires* : localisés sur un segment particulier de la peau, peuvent être associés à des anomalies sur d'autres organes. Il s'agit par exemple du syndrome PHACES, qui associe des HI segmentaires sur le visage à des malformations de la fosse postérieure, des hémangiomes capillaires, des anomalies artérielles et cardiovasculaires et autres anomalies oculaires, et du syndrome LUMBAR/SACRAL/PELVIS, associant des HI lombaires ou périnéaux à des anomalies urogénitales, ulcérations, myélopathies, malformations anorectales et anomalies artérielles et rénales.
- *HI multifocaux* : plus rares et associés à des risques de maladies non cutanées telles que des maladies hépatiques et viscérales et un hypothyroïdisme.

L'HI présente un schéma de croissance tumorale unique. La croissance de la tumeur est non linéaire et comprend une phase proliférative et une phase involutive (Figure 16). Elle est rapide durant les 4 premiers mois (80% de sa croissance), se stabilise puis régresse spontanément sur plusieurs années, avec 90% d'involution vers l'âge de 4 ans⁴⁸.

- *Phase proliférative* :

La phase proliférative marque les premières semaines/mois après la naissance, avec un pic de croissance tumorale entre 9 et 15 mois⁴⁷. L'HI à ce stade est une tumeur à composante majoritairement cellulaire, avec des *clusters* de masses cellulaires d'endothélium sans architecture vasculaire clairement définie. La tumeur à cette phase est donc formée de cellules qui expriment des marqueurs endothéliaux, de petits capillaires et des cellules interstitielles fortement prolifératives. Le marqueur de cellules souches ou progénitrices CD133 est détecté dans la majorité des cellules, preuve du statut indifférencié et immature des cellules dans la phase proliférative. Les

facteurs pro-angiogéniques tels que VEGF-A et Ang-2, et les récepteurs VEGFR-1, VEGFR-2 et Tie-2 sont également exprimés et sont le support de l'émergence d'un nouvel endothélium durant cette phase ^{49,50}.

- *Phase involutive* :

La phase proliférative est suivie d'une phase d'arrêt de la croissance et de stabilisation de la tumeur puis d'une étape involutive. Cette étape marque la régression spontanée de la tumeur qui débute peu après la première année de naissance et s'étend à quelques mois/années. L'involution s'accompagne d'un changement de morphologie et de diamètre des vaisseaux sanguins, qui sont plus élargis et entourés de péricytes NG2⁺ ⁴⁹. Il y a également une diminution du nombre de cellules interstitielles qui s'accompagne d'un dépôt de matrice extra-cellulaire. Le tissu d'hémangiome involué est principalement composé d'adipocytes et de tissu conjonctif drainé par de larges vaisseaux sanguins⁵¹.

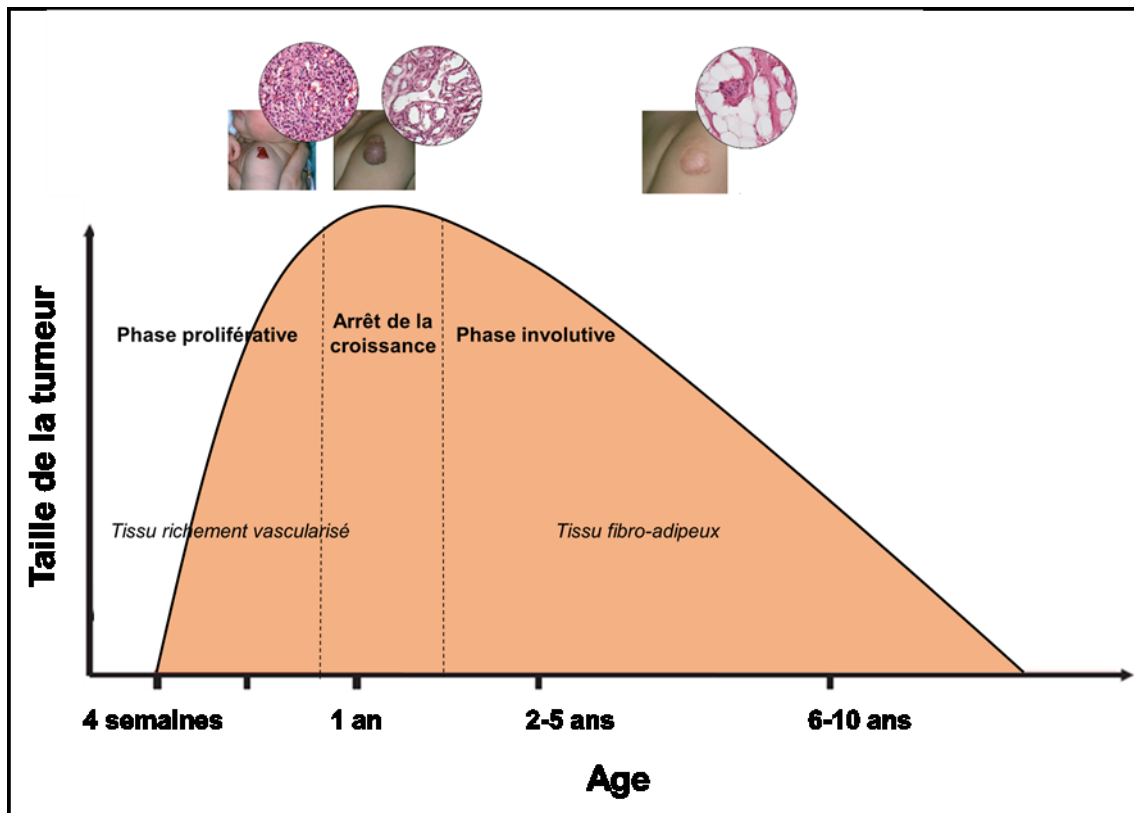


Figure 16 : Phases d'évolution des hémangiomes infantiles. D'après C.H. Storch, P.H. Hoeger, 2010⁴⁸.

3.2.3. Epidémiologie

Avec une prévalence de 5-10%, l'HI est la tumeur la plus commune du nourrisson. Elle a une plus grande prédominance chez les enfants de sexe féminin (2,3 à 2,9 fois plus élevée) et d'ascendance caucasienne⁴⁷. La prévalence augmente également chez les prématurés et les nouveaux nés de faible poids, avec plus de 23% des nouveaux nés de moins de 1 kg présentant un hémangiome infantile. Il existe également d'autres facteurs de risque connus tels que des antécédents familiaux d'HI, des complications intra-utérines ou encore des anomalies placentaires pouvant expliquer le développement de la tumeur^{52,53}.

3.2.4. Diagnostic

Le diagnostic des hémangiomes infantiles est généralement basé sur les caractéristiques cliniques de la tumeur. D'un point de vue histologique, le transporteur de glucose GLUT-1 (transporteur de glucose de type érythrocyte) exprimé à la surface de l'endothélium vasculaire de l'HI est un marqueur qui permet de les distinguer des autres tumeurs vasculaires cutanées telles que les hémangiomes congénitaux⁵⁴.

3.3. ORIGINES POSSIBLES

L'origine cellulaire de l'HI et les signaux biologiques qui induisent la croissance incontrôlée de la tumeur restent encore largement à déterminer. Différentes hypothèses existent sur le développement de l'HI, dont l'origine semble multifactorielle. Il a été proposé que des mutations somatiques d'un ou plusieurs gènes contrôlant la prolifération des cellules endothéliales soient responsables de la formation de la tumeur. Cette hypothèse suggère que les cellules endothéliales d'HI dérivent d'une cellule souche ou d'un progéniteur commun et possèdent donc un phénotype clonal. Dans ce sens, une étude portant sur les profils de méthylation dans les cellules endothéliales d'HI a montré un profil similaire d'inactivation du chromosome-X dans les cellules, supportant l'hypothèse d'un progéniteur unique⁵⁵.

Des mutations somatiques en faveur de l'hypothèse d'une origine génétique ont été identifiées dans l'HI. C'est le cas d'une mutation faux-sens identifiée dans le gène

codant le récepteur VEGFR-2⁵⁶. Des mutations faux-sens des gènes codant le marqueur de tumeur endothélial TEM8 (*ANTXR1*) et VEGFR-2 (*KDR*) ont également été identifiées dans les cellules endothéliales d'HI grâce à une approche ciblée de gène candidat et contribueraient au développement de l'HI⁵⁷. Cela n'a cependant pas été confirmé depuis cette étude datant de 2008.

Une autre théorie de l'apparition de l'HI repose sur une origine placentaire impliquant un progéniteur fœtal placentaire comme cellule à l'origine de l'HI. Des études immunohistochimiques ont montré une similarité d'expression de plusieurs marqueurs incluant GLUT-1, l'antigène Lewis Y, la mérosine, l'enzyme iodothyronine deiodinase de type III et le récepteur Fcγ-IIb entre les vaisseaux d'HI et les vaisseaux placentaires^{58,59}. Ces marqueurs ne sont pas exprimés par les vaisseaux normaux cutanés ni par les autres tumeurs vasculaires bénignes.

3.4. PATHOGENESE

La pathogenèse de l'HI reste à ce jour peu élucidée, mais de nombreuses voies ont été investiguées.

3.4.1. Dérégulation de la voie angiogénique

Dans un contexte physiologique, il y a un équilibre entre les facteurs pro- et anti-angiogéniques sécrétés par les voies du VEGF et des angiopoïétines. La perte de cet équilibre lors de l'étape proliférative de l'HI peut expliquer la prolifération accrue des capillaires immatures.

3.4.1.1. Voie de signalisation du VEGF

L'HI peut être considéré comme une pathologie des vaisseaux à cause de la masse désorganisée de vaisseaux sanguins qui composent la tumeur. La détection de facteurs pro-angiogéniques comme le VEGF-A ou le bFGF supportent cette hypothèse^{60,61}. Les niveaux de VEGF-A sont plus élevés dans les sérums de patients atteints d'HI en phase proliférative comparés aux sérums de patients atteints d'HI en phase involutive⁶². Cette sécrétion accrue de VEGF-A par les cellules endothéliales

est possiblement liée à l'environnement hypoxique de la tumeur en phase proliférative, qui induit la stabilisation du facteur HIF-1 α . *In vitro*, la sécrétion de VEGF-A par les cellules souches dérivées d'HI est inhibée par le traitement des cellules aux corticostéroïdes⁶³.

Comme dit précédemment, la balance entre les facteurs pro- et anti-angiogéniques est altérée dans l'HI. Il a été montré que ce déséquilibre pouvait résulter d'une mutation dans les gènes *TEM8* et *VEGFR-2* qui rend non fonctionnel le complexe TEM8, intégrine $\beta 1$ et VEGFR-2 (Figure 17). En effet, ce complexe est nécessaire à la fixation du facteur de transcription NFAT sur le promoteur de *VEGFR-1* pour moduler son expression. Ces mutations répriment donc l'activité de NFAT et empêchent l'expression de VEGFR-1, favorisant ainsi la fixation de VEGF-A sur VEGFR-2 et, *in fine*, la stimulation de la prolifération et de la survie des cellules endothéliales⁵⁷.

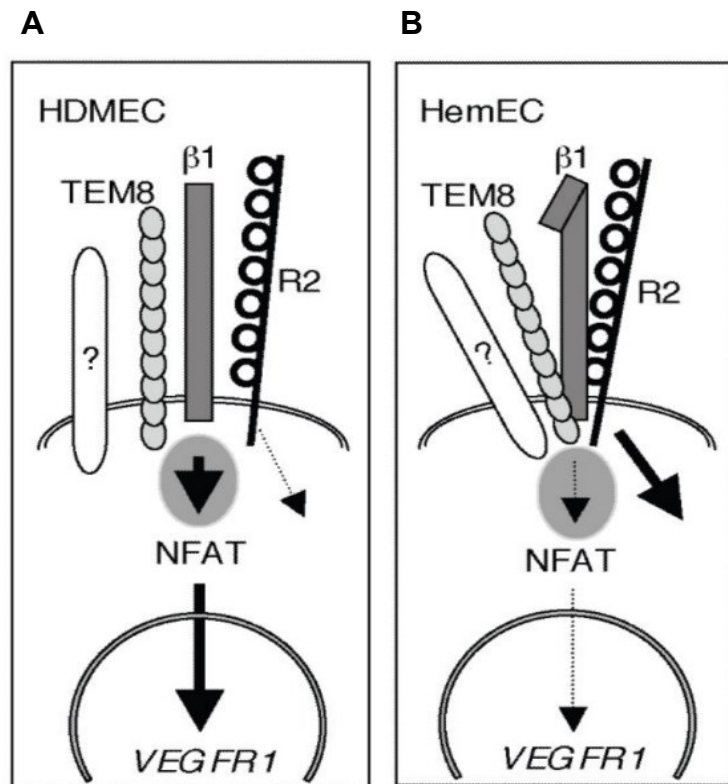


Figure 17 : Schéma résumant les voies de signalisation altérées dans l'hémangiome infantile. Dans les cellules endothéliales contrôles des micro-vaisseaux humains dermiques (HDMEC, **A**), l'activation de l'expression de NFAT et de VEGFR-1 est contrôlée par des interactions fonctionnelles entre l'intégrine $\beta 1$, le domaine extracellulaire de VEGFR-2 et TEM8, qui induit une forte expression de VEGFR-1. Dans les cellules endothéliales d'HI (HemEC, **B**), l'activation de NFAT est réprimée et résulte en une faible expression de VEGFR-1, favorisant ainsi l'activation de VEGFR-2 par VEGF-A et facilitant la prolifération et la migration cellulaires. D'après Jinnin, 2008⁵⁷.

3.4.1.2. Voie de signalisation des angiopoïétines et Tie-2

L'Ang-1 et l'Ang-2 régulent des processus de remodelage vasculaire, la maturation et l'inflammation vasculaire^{64,65}. L'Ang-1 est exprimée par les péricytes et sa fixation sur le récepteur endothélial Tie-2 inhibe la prolifération des cellules endothéliales et favorise leur recouvrement par les péricytes, permettant la formation de vaisseaux fonctionnels durant l'angiogenèse. L'ARNm et le niveau protéique de Tie-2 sont augmentés dans les cellules endothéliales d'HI et dans les tissus d'HI ainsi que la réponse cellulaire à l'Ang-1⁵⁰. L'Ang-2 est augmentée dans l'endothélium de l'HI alors que l'Ang-1 est inhibée dans les péricytes d'HI⁶⁶. Le blocage pharmacologique de l'Ang-2 dans un modèle tumoral de l'endothélium diminue la croissance tumorale⁶⁷.

A contrario, pendant l'involution de l'HI, l'expression des facteurs pro-angiogéniques diminue et les cellules d'HI expriment des facteurs anti-angiogéniques comme le TGF- β et des inhibiteurs de métalloprotéases TIMPs qui empêchent la dégradation de la matrice extracellulaire et inhibent ainsi l'angiogenèse⁶⁰.

3.4.2. Autres voies de signalisation impliquées

D'autres mécanismes sont impliqués dans la pathogenèse de l'HI.

JAGGED1, ligand des récepteurs de la voie Notch, est fortement exprimé par les cellules endothéliales et les cellules souches de l'HI. Il a été montré que JAGGED1 endothélial favorise la différenciation des cellules souches en péricytes dans un modèle murin d'HI, ainsi que la communication juxtacrine entre les cellules endothéliales et les péricytes⁶⁸.

Enfin, il a été montré que le système rénine-angiotensine est impliqué dans la pathogenèse de l'HI. Un fort taux de rénine circulante a été observé cliniquement chez les nouveau-nés prématurés de type caucasien⁶⁹. Ce taux physiologique élevé de rénine crée un environnement qui facilite le développement et la différenciation des cellules souches de l'HI en un endothélium de type vasculogénique. Des marquages immunohistochimiques ont montré une expression de l'enzyme de conversion de l'angiotensine et du récepteur à l'angiotensine 2 dans les HI, d'où l'hypothèse d'un rôle du système rénine-angiotensine dans la régulation de la croissance de l'HI⁷⁰.

3.4.3. Rôle de l'hypoxie

L'hypoxie, conséquence d'événements autour de la naissance du nourrisson, pourrait être impliquée dans le développement et la croissance de l'HI.

Le développement d'une lésion d'HI est couramment précédé de changements précurseurs sur la peau, sous forme d'une tâche anémique pâle ou d'une ecchymose au niveau du site pré-lésionnel. Cela suggère une vasoconstriction initiale conduisant à une diminution des apports de sang et d'oxygène. Cette vasoconstriction serait à l'origine d'une ischémie tissulaire qui constitue le stimulus pour une néovascularisation à l'origine de l'HI⁷¹. Il a été suggéré qu'une vascularisation anormale de certaines zones dermiques du fœtus induise une hypoxie localisée à la naissance. Cette hypoxie serait responsable du recrutement et de la prolifération de cellules souches et/ou de cellules progénitrices au niveau de la tumeur, capables de se différencier en différents types cellulaires de l'HI⁷².

HIF est un facteur de transcription marqueur de l'hypoxie. En normoxie, la sous unité α de HIF est dégradée par ubiquitination par le facteur Von Hippel Lindau (VHL). En condition hypoxique, HIF est donc stabilisé et transloqué dans le noyau où il stimule l'expression de plusieurs facteurs pro-angiogéniques⁷³ (Figure 18).

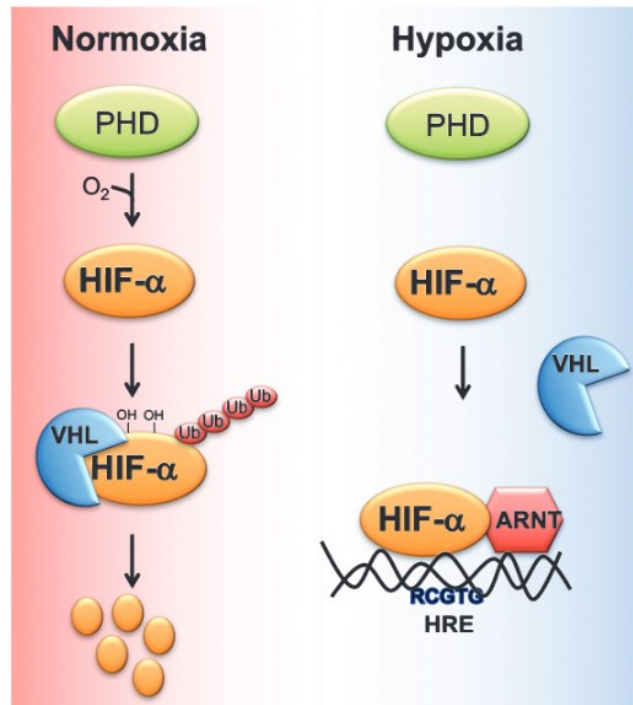


Figure 18 : Régulation de la stabilité de HIF par l'oxygène. D'après Ramakrishnan, 2017⁷³.

HIF-1 α est fortement exprimé par les cellules endothéliales de l'HI prolifératif et son expression décroît au cours de l'involution. L'hypothèse d'une implication de l'hypoxie dans l'HI est renforcée par les observations cliniques (tâche anémique pâle sur le site pré-lésionnel) et par l'expression ARN/protéique de nombreuses cibles de HIF-1 α , dont VEGF-A, GLUT-1, MMP-9 et le facteur de croissance à l'insuline IGF-2 dans les HI prolifératifs. L'hypoxie stabilise HIF-1- α , lequel augmente la sécrétion des facteurs pro-angiogéniques tels que VEGF, suggérant un rôle des facteurs induits par l'hypoxie dans la vasculogénèse et l'angiogénèse de l'HI⁶².

3.5. HISTOLOGIE ET COMPOSANTS CELLULAIRES

Le développement de l'HI à partir de cellules souches progénitrices est l'une des théories possibles de l'origine de la tumeur. L'étude histologique de la tumeur ainsi que la purification *in vitro* des différents types cellulaires qui composent la masse tumorale ont permis d'améliorer la compréhension de la complexité cellulaire de l'HI.

3.5.1. Les cellules progénitrices endothéliales

Des cellules mésenchymateuses primitives ont été isolées à partir de tissu d'HI en phase proliférative à l'aide d'un anticorps anti-CD133 couplé à des billes magnétiques, le CD133 étant une glycoprotéine de surface exprimée par les cellules souches et les cellules progénitrices⁷⁴. Ces cellules isolées représentent une faible portion de la tumeur (0.1-1%) et possèdent des propriétés essentielles de cellules souches (auto-renouvellement et différenciation)⁷⁵. Les cellules CD133⁺ xénogreffées en sous cutané dans des souris immuno-déficientes produisent des vaisseaux GLUT-1⁺ et se différencient en cellules endothéliales, péricytes et adipocytes^{68,74}. Cette différenciation est aussi observée dans les cellules *in vitro*. La propriété de vasculogénèse de ces cellules progénitrices endothéliales supporte l'idée d'une contribution de ce processus dans la pathogénèse de l'HI.

3.5.2. Les cellules endothéliales

L'endothélium de l'HI exprime de façon constante le transporteur de glucose GLUT-1, ce qui en fait un marqueur histologique largement utilisé pour le diagnostic et qui permet de distinguer l'HI des autres tumeurs et malformations vasculaires⁵⁴.

L'endothélium durant la phase proliférative est fortement métabolique et recouvre des capillaires de très petit diamètre, suggérant un phénotype immature de ces derniers. Des cellules endothéliales isolées à partir de résections d'HI prolifératifs montrent un phénotype clonal, associé à des capacités proliférative et migratoire accrues⁵⁵. D'un point de vue morphologique et d'expression protéique, les cellules endothéliales d'HI ont les mêmes caractéristiques que les cellules endothéliales des micro-vaisseaux embryonnaires. En effet, *in vitro*, les cellules endothéliales d'HI présentent un aspect fusiforme similaire aux cellules endothéliales fœtales et expriment faiblement la glycoprotéine de surface CD31. Ceci suggère un phénotype peu différencié de ces cellules, et ainsi, un défaut de différenciation et de maturation de l'endothélium dans l'HI^{76,77}. Les cellules endothéliales expriment aussi CD34 (fortement), CD105, les récepteurs VEGFR-1 et VEGFR-2, le facteur von Willebrand (vWF) et la VE-cadhérine⁷⁸.

3.5.3. Les péricytes

Des cellules périvasculaires entourent les vaisseaux naissants de l'endothélium durant la phase proliférative de l'HI. Il s'agit de cellules musculaires lisses, nommées péricytes. Les péricytes sont hautement prolifératifs durant la phase proliférative et subissent, comme les cellules endothéliales, un processus de maturation durant cette phase. Les péricytes isolés de tissus frais d'HI prolifératifs ou involutifs expriment les marqueurs classiques de cellules musculaires lisses, à savoir NG-2, PDGFR- β , la calponine, α -SMA et NOTCH3⁴⁹. Les péricytes d'HI sont pro-angiogéniques. *In vivo*, dans des xéno greffes de péricytes d'HI et de cellules endothéliales, les péricytes d'HI forment plus de micro-vaisseaux comparés aux péricytes normaux⁷⁹. *In vitro*, ces péricytes prolifèrent plus rapidement, expriment plus fortement VEGF-A et moins d'Ang-1 que les péricytes humains sains. Les cellules souches d'HI injectées dans la souris se différencient en péricytes grâce à JAGGED1, sécrété par les cellules

endothéliales et impliqué dans le développement vasculaire et tumoral⁶⁸. Enfin, les péricytes, par recouvrement de l'endothélium, favorisent la stabilisation des vaisseaux en inhibant la prolifération et la migration des cellules endothéliales. Les péricytes d'HI en co-culture avec des cellules endothéliales saines n'inhibent pas leur prolifération et leur migration, favorisant ainsi la croissance tumorale⁷⁹.

3.5.4. Les télocytes

3.5.4.1. Description et généralités

Les télocytes, précédemment connus sous le nom d'interstitial Cajal-like cells (ICLC), sont des cellules interstitielles dont la localisation, la morphologie, la structure et les fonctions ont été largement étudiées.

Les télocytes se distinguent par leur petit corps cellulaire contenant un large noyau (occupant environ 25% du volume cellulaire total et entouré d'une petite quantité de cytoplasme) et par des prolongements extrêmement longs et minces nommés « télopoles »^{80,81}. Les télopoles mesurent plusieurs dizaines à centaines de micromètres (10-1000 μm), faisant d'eux les plus longs prolongements cellulaires du corps après les axones neuronaux⁸¹. La morphologie des télocytes dépend du nombre de leurs télopoles (allant de 1 à 5) (Figure 19). Ces derniers présentent un aspect moniliforme caractérisé par l'alternance de « podomères » et de « podoms ». Les podomères sont des segments très fins (environ 80 nm), dont la taille est inférieure à la capacité de résolution de la microscopie optique, ce qui explique que les télocytes aient été longtemps négligés⁸². Les podoms sont quant à eux des segments dilatés (250-300 nm) qui accueillent les mitochondries, le réticulum endoplasmique et les cavéoles⁸³. Les télopoles et leurs segments créent de véritables réseaux tri-dimensionnels qui les connectent entre eux et avec les cellules musculaires, les vaisseaux, les fibres nerveuses et les cellules immunitaires⁸⁴. Les télopoles permettent aussi une communication paracrine à travers la sécrétion de vésicules⁸³. CD34 et PDGFR- α sont les principaux marqueurs utilisés pour l'identification des télocytes⁸³.

Les télocytes se distinguent des fibroblastes par leur empreinte miRNA, leurs propriétés électrophysiologiques et leur capacité de sécrétion de vésicules. Ils sont présents dans plusieurs tissus tels que les poumons, le tractus digestif, le foie, le pancréas et la peau⁸⁵.

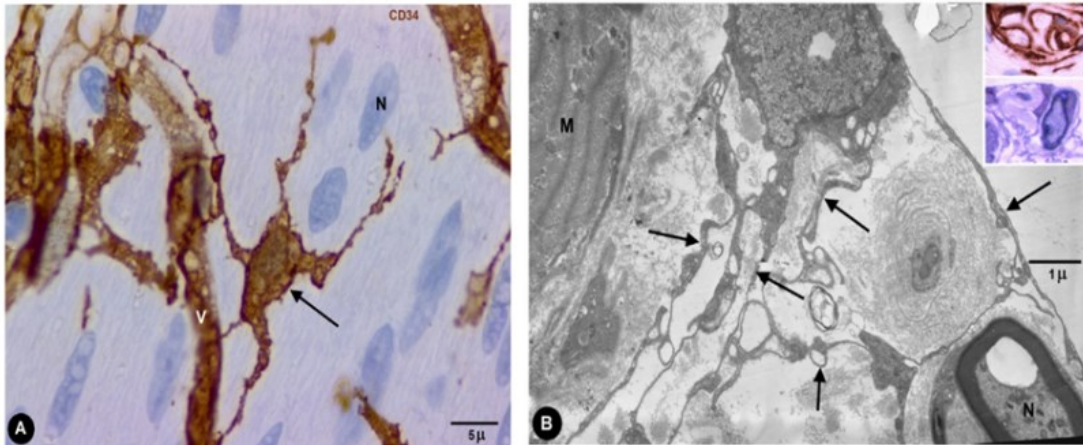


Figure 19 : Caractérisation des télocytes. (A) Télocyte CD34⁺ dans la paroi entérique formé de télopodes connectés à un vaisseau (V) et à une cellule musculaire lisse (N). (B) Caractéristiques ultra-structurales des télocytes dans le fuseau neuromusculaire. Les télopodes (flèches noires) entourent une cellule musculaire striée (M) et un nerf (N) et des fibres de collagène, créant des microenvironnements. D'après Díaz-Flores, 2016⁸⁴.

3.5.4.2. Rôles des télocytes en condition physiologique

Les télocytes sont possiblement impliqués dans plusieurs fonctions physiologiques au sein de leur microenvironnement cellulaire :

- Maintien et modulation de l'homéostasie tissulaire locale : les télocytes participent à l'organisation et au contrôle de la matrice extracellulaire⁸⁶. Ils représentent un support structural par leur capacité de résistance, de déformation et d'étirement⁸⁷. Ils créent des microenvironnements qui délimitent les cellules au sein des tissus et assurent une communication intercellulaire juxtacrine et paracrine, sur de courtes ou longues distances. Cette communication passe par la sécrétion de vésicules et/ou de molécules paracrines telles que VEGF, NO et IL-6^{88,89}. Les télocytes possèdent des propriétés de cellules souches avec l'expression du marqueur de pluripotence Oct-4⁹⁰.

- Morphogenèse et auto-renouvellement : ces fonctions sont basées sur les propriétés des télocytes de modulation des cellules souches et des progéniteurs cellulaires. Au cours du développement, les télocytes peuvent induire la morphogenèse, guider la migration cellulaire et servir de socle pour l'architecture 3D des tissus et des organes^{91,92}.

3.5.4.3. Hyperplasie des télocytes associée à des processus tumoraux

Une hyperplasie des télocytes peut se produire lors de processus tumoraux comme dans les tumeurs bénignes des nerfs périphériques. C'est le cas dans les zones myxoïdes des neurofibromes et des zones Antoni B des neurilemmomes, qui présentent une prolifération accrue et un nombre important de télocytes CD34⁺^{93,94}.

3.5.5. Les mastocytes

Les mastocytes sont observables au sein de l'HI autour des vaisseaux sanguins à tous les stades. Ils sont présents en grand nombre au début de la phase proliférative alors qu'ils sont peu nombreux dans la phase involutive et à la fin de l'involution, ce qui suggère un rôle des mastocytes dans la régression de l'HI⁹⁵. La présence de mastocytes durant la phase proliférative peut être un indicateur de réponse immunitaire, alors que dans la phase involutive, il pourrait être un marqueur d'apoptose et de stimulation par la signalisation des chimiokines, qui expliquerait la diminution du nombre de vaisseaux et la formation de tissu fibro-adipeux.

Les mastocytes sont présents en nombre comparable à l'HI dans plusieurs tumeurs cutanées, telles que le carcinome basocellulaire, le carcinome épidermoïde, le mélanome et le naevus⁹⁶.

3.5.6. Les macrophages

Les macrophages ont un rôle important dans les tumeurs. Les HI sont fortement infiltrés par les macrophages, essentiellement durant la phase proliférative. Ils co-expriment les marqueurs CD68 et CD163, caractéristiques des macrophages associés

aux tumeurs (TAM), dits macrophages M2, possédant des fonctions anti-inflammatoires et pro-angiogéniques⁹⁷. D'autre part, les macrophages dans la phase proliférative expriment Ki-67 et VEGF, indiquant une possible contribution dans la prolifération et l'angiogenèse de l'HI⁹⁷.

3.5.7. Les adipocytes

Lors de la phase involutive, la tumeur régresse et est remplacée par une accumulation de tissu fibro-adipeux, signe de l'adipogenèse lors de l'involution de la tumeur. Les adipocytes sont alors le type cellulaire majoritaire de l'HI. Des études ont montré une contribution des cellules souches mésenchymateuses (MSCs) périvasculaires au cours de l'adipogenèse dans l'HI. Elles ont un potentiel de multi-différenciation en cellules mésodermiques, telles que les ostéoblastes et les adipocytes, qui forment les tissus osseux et adipeux, respectivement. Le facteur de transcription PPAR- γ a un rôle important dans le contrôle de la différenciation des MSCs en adipocytes^{51,98}. Il a également été montré une augmentation durant l'involution de l'expression des gènes codant pour PPAR- γ 2, LPL (Lipoprotein Lipase), CEBPA (CCAAT Enhancer Binding Protein Alpha) et la Périlipine A. Ces gènes sont impliqués dans l'adipogenèse et corrélerent avec l'accumulation de tissu adipeux durant cette phase⁵¹.

3.6. STRATEGIES THERAPEUTIQUES ACTUELLES

Une grande partie des HI régresse spontanément et ne requiert pas de thérapie. Il existe cependant plusieurs indicateurs qui alertent sur la nécessité d'un traitement et d'une prise en charge. C'est le cas de 10 à 15% des hémangiomes infantiles, qui mènent à des complications et présentent un risque pour l'enfant. Ces risques dus à la localisation ou à la taille de la tumeur sont :

- *Risque fonctionnel* : risque d'altération ou complication ophtalmique, gêne à l'alimentation lorsque les HI sont localisés au niveau oculaire ou de la bouche.
- *Risque vital* : risque d'asphyxie lorsque les HI se développent à proximité des voies aériennes et risque cardiaque en cas d'HI multi-cutanés associés à des HI hépatiques.

- *Ulcération* : il s'agit de la complication la plus fréquente, principalement dans les HI en phase proliférative rapide, et source de douleurs pour les patients. Ces HI sont souvent traités par chirurgie lorsque cela est possible.
- *Risque esthétique* : certains HI volumineux induisent des déformations anatomiques, qui peuvent avoir des répercussions psychologiques chez le patient. Ces HI sont souvent traités par chirurgie dans un deuxième temps lorsqu'il s'agit de résidus fibro-adipeux en fin d'involution de la tumeur.

3.6.1. Corticostéroïdes et autres traitements médicaux

Les corticostéroïdes systémiques ont longtemps représenté le traitement de première intention des formes graves d'HI. Cependant, ces drogues sont souvent mal tolérées et génèrent de lourds effets secondaires chez l'enfant tels qu'un retard de croissance, un diabète ou une cardiomyopathie⁹⁹. Ces drogues modulent l'environnement pro-angiogénique de la tumeur, en diminuant la vascularité de cette dernière. Dans un modèle *in vivo* d'HI, les corticostéroïdes incluant la dexaméthasone, la prednisone, la prednisolone et la méthylprednisolone, bloquent la formation de nouveaux vaisseaux en inhibant la sécrétion de VEGF-A par les cellules souches d'HI⁶³. Les corticostéroïdes modulent également l'expression d'autres facteurs pro-angiogéniques fortement exprimés en phase proliférative d'HI tels que MCP-1 (Monocyte chemoattractant protein-1), IL-6, MMP-1 et uPAR (urokinase plasminogen activator surface receptor)⁶³. L'inhibition de la production de ces facteurs pro-angiogéniques dépend de l'activité du facteur de transcription NF-KB¹⁰⁰.

L'interféron alpha et la vincristine, traitements anti-cancéreux connus pour provoquer des effets secondaires sévères comme respectivement des troubles neurologiques ou une cytopénie, sont d'autres traitements alternatifs des formes graves de l'HI en cas d'échecs des autres traitements.

3.6.2. Bêtabloquants : mécanismes d'action du propranolol dans l'hémangiome infantile

Depuis 2008, les bêtabloquants ont émergé comme traitement pharmacologique efficace des HI dits sévères. Le propranolol, antagoniste non sélectif des récepteurs bêta-1 et bêta-2 adrénergiques (ADRB1, ADRB2), est le bêtabloquant le plus couramment utilisé en pédiatrie. Cette utilisation fait suite à l'observation clinique en 2007 de l'efficacité du propranolol par le département de dermatologie du CHU de Bordeaux. En effet, le propranolol avait été administré à un patient atteint d'une cardiomyopathie hypertrophique causée par une dose élevée de corticostéroïdes administrée pour un HI sévère. S'en est suivi une involution rapide de la tumeur qui a débutée seulement quelques heures après l'administration du bêtabloquant. Depuis, après une étude concluante en 2008 sur 11 patients¹⁰¹, un brevet pour une nouvelle indication thérapeutique a été déposé et une licence pour la fabrication et la vente de la molécule en solution pédiatrique a été signée avec les laboratoires Pierre Fabre. Les résultats confirmant cette efficacité lors d'une étude clinique multicentrique internationale sur 460 enfants ont été publiés en 2015¹⁰². Le propranolol est le seul bêtabloquant ayant une AMM (Autorisation de Mise sur le Marché) pour cette indication, sous le nom commercial Hemangiol.

Malgré sa large utilisation en clinique, les mécanismes d'action du propranolol restent mal connus. L'administration de propranolol induit un changement rapide de la couleur et de la consistance de la tumeur. De plus, l'HI exprimant les 3 types de récepteurs bêta-adrénergiques ADRB1, ADRB2, ADRB3¹⁰³, il est supposé par sa rapidité d'action que le propranolol induise en premier lieu une vasoconstriction des vaisseaux sanguins qui drainent et alimentent la tumeur. Le traitement au propranolol induit au bout de quelques mois le remplacement du tissu vasculaire par du tissu adipeux, à l'image de ce qui est observé au bout de quelques années au cours de l'involution naturelle. Plusieurs cellules de l'HI expriment les récepteurs ADRB1 et ADRB2, les cibles cellulaires du propranolol dans la tumeur peuvent donc être multiples². *In vitro*, le propranolol inhibe la production de VEGF induite par la noradrénaline *via* les récepteurs ADRB1 et ADRB2 dans deux lignées tumorales du cancer de l'ovaire et

dans des cultures primaires d'adipocytes de souris^{30,104}. L'isoprénaline, analogue de la noradrénaline, augmente la prolifération des cellules endothéliales d'HI, effet qui est aboli par des antagonistes bêta-1 et bêta-2-sélectifs *via* une sous expression des protéines du cycle cellulaire, cycline D1, CDK-4 et CDK-6 et un arrêt du cycle cellulaire en phase G0/G1¹⁰⁵. L'isoprénaline stimule également la production de VEGF et la phosphorylation de VEGFR-2 *via* la voie bêta-adrénergique et la voie ERK. Ces effets sont inhibés par l'ajout d'un antagoniste ADRB2¹⁰⁵. Cependant, il est à noter que ces effets ont été obtenus à des doses élevées et cytotoxiques de propranolol, qui ne sont donc pas comparables avec les doses réellement utilisées en situation clinique. En effet, la concentration plasmatique de propranolol chez les patients traités avec 1-3 mg/kg/jour oscille entre 0,48 et 1,47 μM , soit environ 383 ng/ml dans le sang, ce qui est au moins 30 fois inférieur aux doses de propranolol utilisées dans la plupart des études *in vitro* publiées¹⁰⁶.

4. L'ANGIOSARCOME : TUMEUR VASCULAIRE MALIGNE

4.1. DEFINITION

L'angiosarcome est un sous type de sarcome des tissus mous. C'est une tumeur vasculaire rare (<1/1 million), de mauvais pronostic et qui dérive de cellules endothéliales provenant du système vasculaire sanguin ou lymphatique¹⁰⁷. Selon la classification de l'ISSVA, l'angiosarcome est classé dans le spectre des tumeurs vasculaires malignes, au même titre que les sarcomes de Kaposi.

4.2. PRESENTATION DE LA PATHOLOGIE

4.2.1. Epidémiologie

Les angiosarcomes représentent 2% des sarcomes des tissus mous et 5.4% des sarcomes des tissus mous cutanés. Ils peuvent apparaître dans n'importe quel tissu mou du corps, avec cependant une prédominance des angiosarcomes cutanés¹⁰⁸. L'incidence des angiosarcomes est indépendante du sexe des patients, la tumeur peut apparaître à n'importe quel âge mais est plus fréquente chez les sujets âgés, avec une prédominance des formes cutanées chez les hommes caucasiens âgés. Classiquement, les angiosarcomes cutanés se développent sur le cou et le visage, en particulier dans le cuir chevelu¹⁰⁷ (Figure 20).

Certains facteurs de risque incluant les lymphœdèmes chroniques, un antécédent de radiation, des carcinogènes environnementaux ou des altérations génétiques peuvent influencer sur l'incidence de l'angiosarcome¹⁰⁹. Cliniquement, les angiosarcomes sont classifiés en trois groupes distincts : les angiosarcomes primaires, les angiosarcomes secondaires associés à un lymphœdème et les angiosarcomes secondaires associés à la radiothérapie, en particulier dans le traitement du cancer du sein.



Figure 20 : Angiosarcome du cuir chevelu et du visage. D'après Chow, 2015¹²⁹.

4.2.2. Caractéristiques cliniques, pathologie et diagnostic

Initialement, l'angiosarcome cutané peut ressembler à une ecchymose ou à une papule violacée multifocale (Figure 21). La croissance de la tumeur s'accompagne d'une infiltration du tissu, d'œdème, d'ulcération et d'hémorragie¹⁰⁷. Les angiosarcomes des tissus plus profonds ou viscéraux se manifestent par une masse croissante, source de douleurs et/ou d'inconfort. Les angiosarcomes non traités peuvent atteindre une taille de 20 cm ou plus et peuvent se propager par dissémination sanguine dans les poumons, site préférentiel de formation de métastases. La dissémination tumorale peut aussi atteindre le foie, les os, d'autres tissus mous ainsi que les ganglions lymphatiques, même après chirurgie^{110,111}.

Les caractéristiques histologiques de l'angiosarcome varient selon les cas et les différences morphologiques sont souvent subtiles. Il peut s'avérer difficile de distinguer par simple microscopie les tumeurs vasculaires malignes des lésions prolifératives

bénignes. Les angiosarcomes sont des tumeurs infiltrantes sans bordures nettes qui séparent la tumeur du tissu sain. La spécificité de l'angiosarcome est marquée par des cellules endothéliales malignes, d'apparence ronde, fusiforme ou épithélioïde. Dans les zones bien différenciées, les cellules endothéliales forment des vaisseaux fonctionnels reliés aux vaisseaux normaux. En phase de croissance agressive de la tumeur, l'architecture de ces vaisseaux devient plus chaotique avec des vaisseaux moins organisés et des espaces vasculaires mal définis. Dans les zones peu différenciées, les cellules endothéliales forment des espaces continus associés à des hémorragies et nécroses qui rendent la distinction avec les carcinomes anaplastiques et les mélanomes compliquée¹⁰⁷. De ce fait, le diagnostic clinique de l'angiosarcome reste difficile. Un examen histologique avec analyse immunohistochimique de la tumeur est nécessaire pour établir le diagnostic. Les cellules endothéliales d'angiosarcome expriment les marqueurs vasculaires et endothéliaux classiques : facteur de von Willebrand (vWF), CD34, CD31 et VEGF.



Figure 21 : Apparition d'un angiosarcome cutané sous forme de papule rouge et multifocale. D'après Young, 2010¹⁰⁷.

4.3. PHYSIOPATHOLOGIE MOLECULAIRE

Les cellules cancéreuses sont caractérisées par plusieurs anomalies moléculaires dont une insensibilité à l'apoptose, une croissance incontrôlée, une augmentation de l'invasion/migration et une activité angiogénique importante. Ces processus sont associés au phénotype agressif de la tumeur.

Une analyse « RNA array » réalisée sur 39 angiosarcomes a montré une surexpression des récepteurs VEGFR-1, VEGFR-2, Tie-1 et Tie-2 et des marqueurs endothéliaux tels que CD31, Ang-2 et le facteur vWF¹¹². D'autres anomalies génétiques telles que des mutations ponctuelles de gènes de l'angiogenèse incluant la phosphatase endothéliale PTPRB et la phospholipase PLCG1, ont un rôle important dans la pathogenèse des angiosarcomes¹¹³. Les mutations de p53 sont fréquentes dans les tumeurs, y compris dans l'angiosarcome. Naka *et al.* ont montré que la moitié d'une série de 33 patients atteints d'angiosarcomes (17/33) a au moins une mutation de p53¹¹⁴. Des mutations du gène K-Ras ont été identifiées chez des patients atteints d'angiosarcomes cardiaques primaires (3/5 patients mutés K-Ras)¹¹⁵.

D'autres altérations génétiques sont corrélées à des phénotypes cliniques dans l'angiosarcome. C'est le cas de l'amplification de l'oncogène MYC dans les angiosarcomes mammaires secondaires radio-induits¹¹⁶. MYC est un facteur de transcription impliqué dans la stimulation de la croissance et de la prolifération cellulaires, avec un rôle clé dans la tumorigenèse. Une étude portant sur 37 angiosarcomes secondaires a montré une amplification de MYC dans 54% de ces patients¹¹⁷. Cette amplification est associée à un taux de survie encore plus faible. L'amplification du gène *FLT4* localisé sur le chromosome 5q35 codant VEGFR-3 est une autre caractéristique cytogénétique des angiosarcomes secondaires¹¹⁸.

Il a été montré une augmentation de l'expression de VEGF-A dans l'angiosarcome, comparée aux tumeurs vasculaires bénignes et aux contrôles normaux¹¹⁹. L'étude de Tokuyama *et al.* a montré l'expression de VEGF-A dans 76% des angiosarcomes cutanés (13/17) comparée à 6% (2/34) dans les tumeurs vasculaires bénignes. De plus, l'expression endothéliale de VEGFR-2 et VEGFR-3 a montré une corrélation positive avec l'expression de Ki-67¹²⁰.

La matrice extracellulaire est un composant structural clé du microenvironnement tumoral. Des dynamiques anormales de la matrice extracellulaire ont lieu dans l'angiosarcome à cause d'un déséquilibre entre synthèse et sécrétion par la matrice extracellulaire de facteurs de croissance, à l'origine de l'invasion et de la migration tumorales. Le facteur de transcription proto-oncogène Ets-1 est exprimé par les cellules tumorales durant l'invasion tumorale. Son expression, stimulée par l'activation de ERK *via* le VEGF et le bFGF, module l'expression des métalloprotéases MMP-1, MMP-3 et de l'urokinase uPA, protéines qui digèrent la MEC. L'expression d'Ets-1 et MMP-1 est augmentée dans l'angiosarcome cutané¹²¹. Cette augmentation de la protéolyse de la matrice extracellulaire dans l'angiosarcome s'accompagne d'une réduction des composants clés de la membrane basale, à savoir la laminine, le collagène type IV, la fibronectine et l'héparine sulfate¹²².

4.4. OPTIONS THERAPEUTIQUES

Les diagnostics souvent tardifs ainsi que la rareté des angiosarcomes contribuent à la difficulté de définir les meilleurs facteurs pronostiques et la stratégie thérapeutique optimale pour la prise en charge de ces tumeurs.

4.4.1. Chirurgie

Jusqu'à présent, la chirurgie totale de la tumeur reste la stratégie optimale pour le traitement des angiosarcomes, lorsque celle-ci a lieu précocement. Des marges non saines de la tumeur peuvent néanmoins rester après la résection, former des métastases et diminuer le taux de survie des patients. Dans les angiosarcomes cutanés du cou et du cuir chevelu, la résection totale est difficile, ce qui induit une récurrence locale de la tumeur ainsi que la formation de métastases dans 30 à 100% des cas^{123,124}. Pour contrôler le risque de récurrence locale, on peut citer la chirurgie de Mohs et la radiothérapie adjuvante après chirurgie.

4.4.2. Radiothérapie

La radiothérapie a montré son efficacité pour le traitement des patients non opérables atteints d'angiosarcomes ainsi que pour minimiser le risque de récurrence post-opératoire. Son efficacité peut néanmoins être influencée par des facteurs tels que le volume, la dose, les modalités ainsi que la technique de traitement. La radiothérapie adjuvante après résection chirurgicale reste la combinaison optimale pour l'amélioration du taux de survie des patients atteints d'angiosarcome¹²⁵.

4.4.3. Chimiothérapie

Le phénotype agressif de l'angiosarcome fait que 50% des patients avec des tumeurs localisées ont une résurgence de la tumeur et une formation de métastases. La chimiothérapie est le traitement principal des angiosarcomes métastatiques. Elle inclut notamment les taxanes, la vincristine, la doxorubicine et l'ifosfamide. Leur utilisation est cependant limitée à cause des comorbidités chez les patients âgés et le risque de toxicité des molécules utilisées^{107,126}.

4.5. THERAPIE CIBLÉE : MODULATION PHARMACOLOGIQUE DE LA VOIE BETA-ADRENERGIQUE

Parmi les thérapie ciblées envisagées, le ciblage du VEGF et l'utilisation d'inhibiteurs de tyrosine kinase se sont révélés prometteurs pour le traitement des angiosarcomes^{127,128}.

Mais l'absence de thérapie satisfaisante pour l'angiosarcome rend nécessaire le développement de nouveaux traitements. Dans ce contexte, le propranolol a émergé comme une nouvelle solution thérapeutique¹²⁹. Des essais cliniques (NCT04518124, Pays-Bas, NCT02732678, France) ainsi que plusieurs études *in vitro* ont évalué l'efficacité dans l'angiosarcome des bêtabloquants, dont le propranolol, seul ou en combinaison aux chimiothérapies.

Les récepteurs ADRB sont largement exprimés dans l'angiosarcome, ce qui pourrait expliquer la sensibilité de cette tumeur aux bêtabloquants et justifier l'inclusion du propranolol dans le traitement de l'angiosarcome²⁸.

L'association d'un traitement quotidien par propranolol (40mg, deux fois par jour) et hebdomadaire par vinblastine (6mg/m²) testée sur 7 patients atteints d'angiosarcome a montré 100% de réponse et une amélioration du taux de survie de 11 mois¹³⁰.

Sur un patient atteint d'angiosarcome cardiaque primaire métastasé au niveau du foie et des poumons, un traitement de 12 mois par 40 mg/jour de propranolol en monothérapie a montré une diminution de la taille et de la masse tumorale ainsi qu'une stabilisation des métastases¹³¹.

Le blocage de la voie bêta-adrénergique dans des modèles *in vitro* d'angiosarcome par des bêtabloquants sélectifs ou non sélectifs inhibe entre autres la viabilité des cellules tumorales et la signalisation mitogénique¹³². Ces effets inhibiteurs passent par l'activation de médiateurs de stress et de survie cellulaire comme AKT et p53 et l'inhibition de médiateurs de la voie des MAPK comme p42, p44, JNK et p39¹³². Il a également été montré que les antagonistes bêta-adrénergiques améliorent l'effet anti-angiogénique des chimiothérapies¹³⁰, suppriment la progression du cycle cellulaire ainsi que la motilité chimiotactique des cellules endothéliales¹³³.

D'autres études ont également montré un effet thérapeutique du propranolol en combinaison avec les chimiothérapies classiques dans l'angiosarcome. *In vitro* sur une lignée humaine d'angiosarcome, le propranolol potentialise l'effet du docétaxel sur la viabilité et la prolifération cellulaires et diminue l'activation des voies NF-kB et COX-2¹³⁴. Sur des lignées humaine et canine d'angiosarcome, le bêtabloquant augmente l'effet anti-prolifératif de la doxorubicine en réduisant son accumulation dans les lysosomes et son efflux cellulaire et en augmentant sa concentration intracellulaire¹³⁵. L'effet du propranolol a été étudié dans d'autres cancers dont le cancer du sein. Le bêtabloquant en monothérapie dans un stade avancé de cancer du sein induit l'apoptose en activant p53, diminue l'expression de l'index de prolifération ki-67 et du marqueur de survie Bcl-2¹³⁶ et potentialise les effets anti-tumoraux du 5-fluorouracile et du paclitaxel en augmentant la survie dans un modèle *in vivo* de cancer du sein¹³⁷. L'ensemble de ces études suggère donc un effet anti-angiogénique de ces molécules, qui pourraient fournir de nouvelles options thérapeutiques pour certaines tumeurs d'origine vasculaire, sachant que seuls 10 à 20% des patients atteints d'angiosarcome métastatique répondent aux chimiothérapies et thérapies ciblées disponibles actuellement.

5. LES AQUAPORINES

5.1. DEFINITION ET ISOFORMES

Les aquaporines (AQP) sont des protéines transmembranaires qui permettent le transport passif et facilité d'eau, d'ions et de glycérol à travers les membranes cellulaires. Elles sont exprimées dans de nombreux tissus humains et forment une famille composée de 13 isoformes, AQP0 - AQP12, sous divisée en deux groupes selon le matériel transporté. Par exemple, AQP1, AQP2, AQP4, AQP5, AQP6 et AQP8 sont exclusivement sélectives à l'eau, aux ions et flux gazeux (ex : O₂, CO₂, oxide nitrique) alors qu'AQP3, AQP7, AQP9 et AQP10, également appelées aquaglycéroporines, transportent à la fois l'eau et des petits solutés comme le glycérol¹³⁸. La plupart des AQP sont situées au niveau des membranes biologiques pour permettre le transport d'eau selon les gradients osmotiques. D'autres AQP comme AQP11 et AQP12, dites aquaporines subcellulaires, sont exprimées dans le cytoplasme où elles régulent les flux d'eau intracellulaires, le volume des organelles ainsi que l'homéostasie intra-vésiculaire.

5.2. STRUCTURE ET DISTRIBUTION DES AQUAPORINES

5.2.1. Perméabilité hydrique

Le transport d'eau a lieu au travers de toutes les membranes biologiques. Les membranes plasmiques sont des structures complexes principalement lipidiques qui délimitent les compartiments intra- et extracellulaires. De par leur structure et leur composition, les membranes cellulaires sont naturellement hydrophobes.

La perméabilité d'une barrière est définie en nombre de molécules traversant par unité de temps et de surface. La perméabilité d'une membrane biologique dépend de deux paramètres : sa perméabilité diffusionnelle (Pd), liée à la diffusion de molécules à travers une barrière en l'absence d'un gradient de concentration, et sa perméabilité osmotique (Pf), mesurée à partir du flux de volume net produit par un gradient osmotique défini et des forces motrices hydrostatiques¹³⁹. La perméabilité osmotique

à l'eau d'une membrane plasmique est faible. P_f est un index qui détermine si le transport d'eau est facilité par la présence de pores comme les aquaporines : si P_f est supérieure à $0,01 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$, le transport d'eau se fait par le biais de canaux hydriques, alors que si P_f est inférieure à $0,005 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$, il s'agit d'une diffusion d'eau à travers la membrane plasmique. La loi Arrhenius, qui est l'énergie d'activation E_a déterminée par l'équation $P_f = F \cdot [e^{-(E_a/RT)}]$, est aussi utilisée pour mesurer l'énergie nécessaire au système pour le transit de l'eau à travers une membrane. Plus la valeur de cette énergie est élevée, plus l'énergie d'activation nécessaire au transit de l'eau à travers la membrane est élevée, et plus cette dernière est imperméable. Dans le cas d'une présence de canal au sein de la membrane plasmique et en présence d'un gradient osmotique, le nombre de molécules qui traversent la membrane augmente et le coût énergétique diminue^{139,140}. Il s'agit d'une diffusion facilitée (Figure 22). Ainsi, les propriétés biophysiques des membranes contenant des pores hydriques sont une P_f élevée et une énergie d'activation E_a faible.

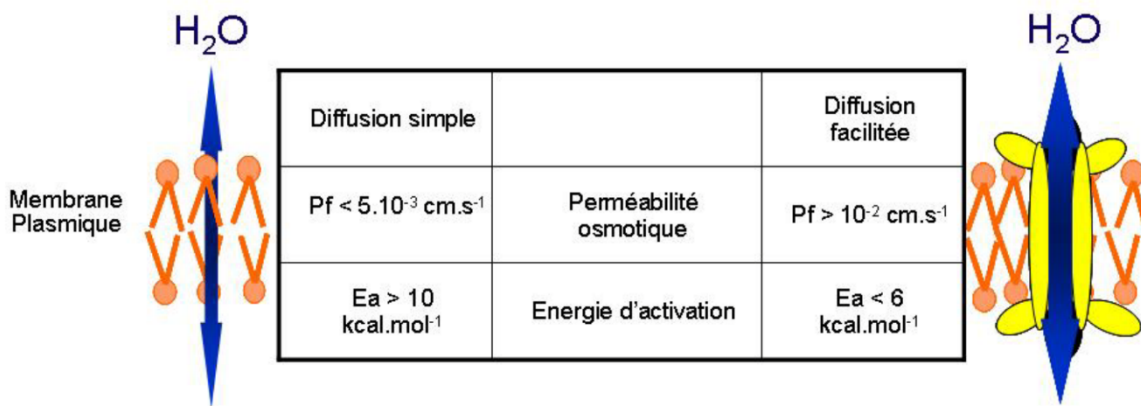


Figure 22 : Transport passif de l'eau à travers un canal hydrique. D'après M. Jamot, 2011¹⁴⁰.

5.2.2. Structure des aquaporines

Les AQP sont structurées en monomères de 28 à 30 kDa qui sont composés de six hélices α transmembranaires connectées par cinq boucles (boucles A-E) et de deux séquences signatures hautement conservées de trois acides aminés : asparagine, proline et alanine (NPA) situées dans les boucles B et E (Figure 23, 24)¹⁴¹. La structure polypeptidique est formée de 270 acides aminés et des extrémités amino (N) et carboxyl (C) cytoplasmiques. La haute conservation de ce double triplet d'acides aminés est une des caractéristiques majeures des aquaporines et la liaison de ces deux séquences NPA au sein du monomère forme le canal hydrique fonctionnel (Figure 24). Les AQP sont sensibles au mercure car celui-ci peut se fixer sur le résidu cystéine (Cys189) proche du motif NPA au niveau de la boucle E et ainsi empêcher le passage de l'eau par obstruction du pore hydrique¹⁴². Individuellement, les monomères constituent des canaux transportant l'eau et les solutés et ils s'assemblent en homotétramères pour former un pore central sélectif aux ions et aux gaz (Figure 23). C'est le cas d'AQP1 qui forme des tétramères au sein desquels chaque monomère est indépendamment fonctionnel¹⁴³. Pour les AQP sélectives à l'eau comme AQP1, les structures NPA par le biais d'interactions électrostatiques permettent le transport des molécules d'eau en file indienne selon un gradient. Il s'agit d'un transport passif et facilité. Le diamètre du pore passe de 20 Å au niveau de la surface à 2.8 Å à son point le plus étroit, limitant le passage aux molécules d'eau suffisamment petites pour passer¹⁴³. Le cœur des AQP est hydrophobe et permet donc un transit rapide des molécules d'eau sans formation de liaison hydrogène. Les aquaglycéroporines ont un pore plus large avec un diamètre de 3.4 Å à leur point le plus étroit qui laisse passer le glycérol¹⁴⁴. Enfin, les AQP peuvent être glycosylées et peuvent s'oligomériser.

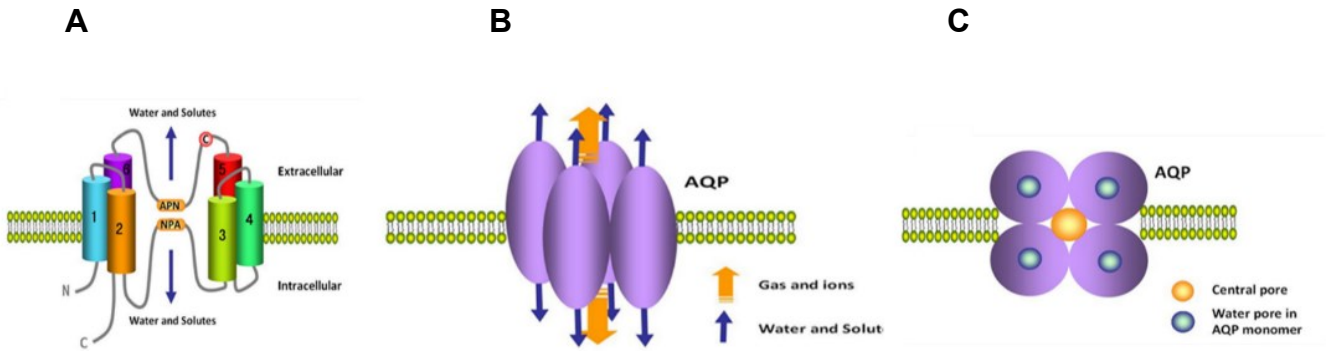


Figure 23 : Structures des monomères et homotétramères des aquaporines. (A) Chaque monomère forme un pore perméable à l'eau. La liaison des séquences NPA permettent la formation du canal hydrique. **(B, C)** Homotétramère formant le pore vu de face et de dessus. D'après Wang, 2015¹⁴⁴.

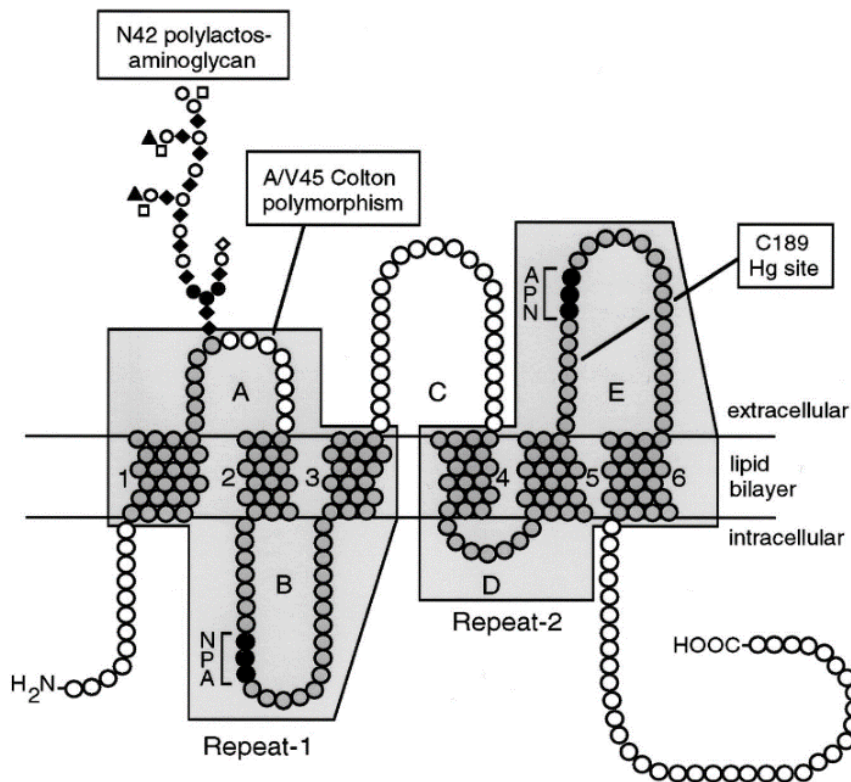


Figure 24 : Représentation schématique de la topologie d'aquaporine 1. D'après Borgnia, 1999¹⁴¹.

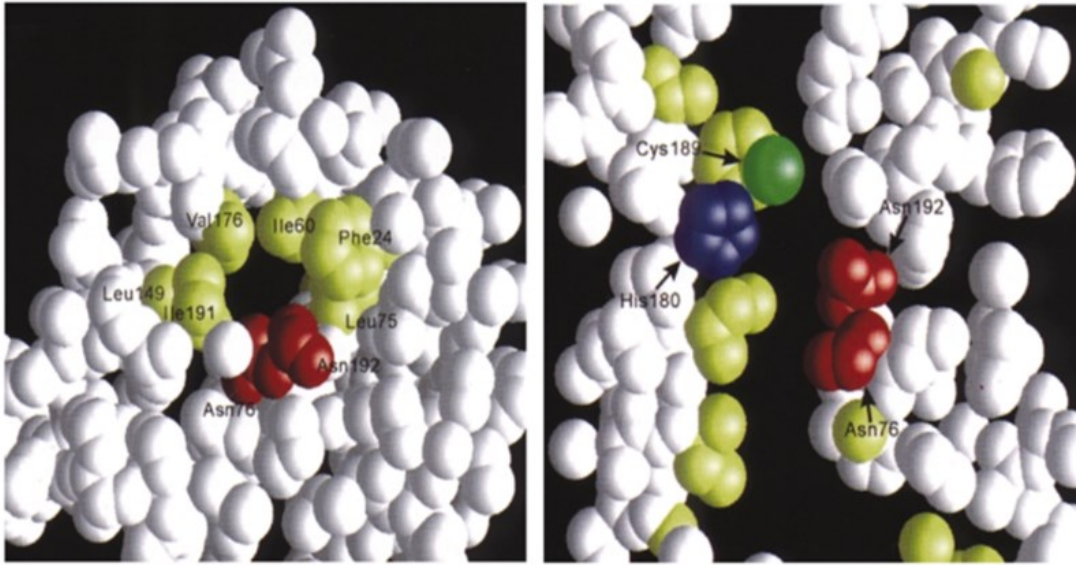


Figure 25 : Modélisation de la structure d'aquaporine 1 par cristallographie électronique. En jaune les résidus hydrophobes permettant le passage facilité de l'eau, en rouge les résidus asparagine Asn 76 et Asn 192 de la séquence NPA, en vert la cystéine 189 dans la boucle E qui permet l'inhibition de la perméabilité hydrique d'AQP1 par le mercure et en bleu l'histidine 180. D'après Murata, 2000¹⁴³.

5.2.3. Distribution des aquaporines

5.2.3.1. Tissus sains

Les AQP sont exprimées dans plusieurs tissus humains¹⁴⁵ (Figure 26). Elles sont principalement localisées au niveau des épithéliums et de l'endothélium, mais aussi dans certains types cellulaires tels que les érythrocytes, les astrocytes, les adipocytes et le muscle squelettique¹³⁸. L'aquaporine 1 (AQP1) est la première AQP de mammifère à avoir été observée dans les érythrocytes et dans les tubules rénaux. Elle est aussi exprimée dans les cellules épithéliales du plexus choroïde où elle contribue à la formation du fluide cérébrospinal et dans les neurones primaires sensoriels où elle est impliquée dans la perception à la douleur¹⁴¹. AQP4 est largement exprimée dans les membranes cellulaires astrocytaires¹⁴⁶ et a un rôle dans l'élimination des solutés du fluide interstitiel dans le cerveau. AQP0 est exprimée dans l'œil et participe au maintien de la transparence de la cornée et des lentilles et de l'homéostasie rétinienne¹⁴⁷. AQP3 est exprimée dans différents tissus dont les reins, l'œsophage, le colon et la peau où elle contribue au maintien de l'hydratation et de l'élasticité ainsi

qu'à la cicatrisation¹⁴⁸. AQP2 et AQP6 sont principalement exprimées dans les reins où elles régulent la concentration urinaire¹⁴⁹. AQP5 est majoritairement exprimée dans les poumons, le tractus gastrointestinal et les glandes sécrétrices¹⁴⁸ et AQP7 dans les adipocytes où elle contrôle les mouvements cellulaires de glycérol, le muscle squelettique, le cœur et les reins¹⁴⁴. L'AQP8 est exprimée dans le foie, le pancréas, les testicules et le cœur et a un rôle dans la sécrétion biliaire. Enfin, l'AQP9 est exprimée dans le foie, les globules blancs, les testicules et le cerveau¹⁴⁸.

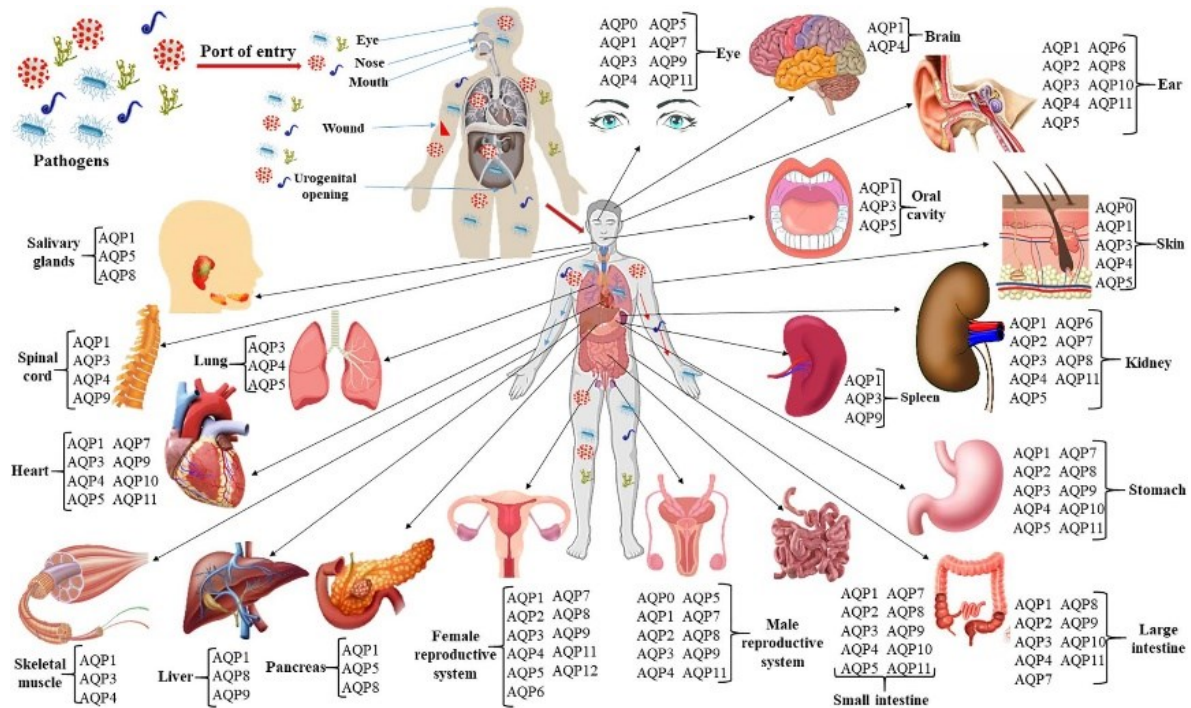


Figure 26 : Distribution spécifique des aquaporines dans les différents tissus humains. D'après Azad, 2021¹⁴⁵.

5.2.3.2. Dans les tumeurs

Les aquaporines sont exprimées dans plus de 20 types de cancers humains et leur taux élevé est corrélé à la gravité de la tumeur (grade, prolifération, migration, angiogenèse associés à la tumeur) (Tableau 2)¹⁵⁰.

Les cellules tumorales surexpriment généralement les AQP qui sont normalement exprimées dans la cellule d'origine mais aussi d'autres AQP qui ne sont pas présentes

dans la cellule d'origine. Leur expression dans les cellules tumorales est à la fois membranaire et cytoplasmique.

Le niveau d'expression des AQP est fortement lié au grade de certaines tumeurs, comme dans l'astrocytome. L'astrocytome est une tumeur infiltrante du cerveau d'origine astrocytaire classifié en grades II, III ou IV, stade le plus agressif correspondant à un glioblastome. Des analyses immunohistochimiques ont montré une forte expression d'AQP1 et d'AQP4 dans l'astrocytome, dont les niveaux d'expression sont corrélés au grade de la tumeur^{151,152}. D'autres cancers surexpriment les AQP. C'est le cas du cancer ovarien, dont les niveaux protéiques des aquaglycéroporines AQP7 et AQP9 sont fortement élevés et il existe une corrélation positive entre l'expression d'AQP9 et le grade tumoral¹⁵³.

Les AQP peuvent donc être considérées comme des marqueurs de diagnostic et des cibles thérapeutiques potentielles dans la mise au point de traitements anti-cancéreux.

AQP expression in human tumors.

Tumor type	Aquaporins	AQP level
Astrocytoma	AQP1, 4, 7, 8, 9	high
Breast cancer	AQP5	high
	AQP1	high
	AQP4	low
	AQP1	low
Cholangiocarcinoma	AQP1	high
	AQP1, 3, 5	high
Colorectal cancer	AQP8	low
	AQP1, 3	high
Cervical cancer	AQP5	high
	AQP1	high
Choroid plexus tumor	AQP1	high
Hemangioblastoma	AQP1	high
Laryngeal cancer	AQP1	high
Leukaemia	AQP5	high (CML)
Liver cancer	AQP3, 5	high
	AQP8, 9	low
Lung cancer	AQP1, 3, 5	high
	AQP1, 4	high
Meningioma	AQP4	high
Nasopharyngeal cancer	AQP1	high
Oesophageal cancer	AQP3, 5	high
Ovarian cancer	AQP1, 5, 9	high
Renal	AQP3	high
Skin, SCC	AQP3	high
Stomach cancer	AQP5	high
	AQP4	low
	AQP3	high
	AQP4	high (papillary)
Thyroid cancer	AQP3, 4	low (undifferentiated)
	AQP7	high
Tongue cancer	AQP3, 5	high (SCC)
Urinary bladder	AQP3	low

Tableau 2 : Expression des aquaporines dans les tumeurs humaines. D'après Papadopoulos 2015¹⁵⁰.

5.3. FONCTIONS DES AQUAPORINES

5.3.1. Le transport d'eau

Cette partie illustrera l'importance physiologique des flux d'eau au niveau rénal, le rein étant l'organe central de la régulation de l'homéostasie hydrique dans l'organisme. En condition physiologique, le rein adulte filtre en moyenne 180 litres de fluide plasmatique par jour et sécrète seulement 0,5-2 litres d'urine. Le rein est composé d'environ 1 million de néphrons, unités fonctionnelles du rein, dont le rôle est de filtrer le sang et de réabsorber les substances utiles. Il comporte deux régions distinctes : le cortex et la médullaire. Le tube proximal et la branche descendante de Henle assurent la réabsorption de 85% du filtrat tandis que la branche ascendante et le tube distal ont une perméabilité hydrique beaucoup plus faible¹⁴⁹. La grande partie de la réabsorption d'eau dans le néphron est réalisée par les AQP. Sept isoformes d'AQP sont exprimées dans les différents segments du néphron et les cellules rénales : les aquaporines 1,2,4,5 et 6 et les aquaglycéroporines 3 et 7 (Figure 27)¹⁴⁹.

AQP1, localisée dans les membranes apicales et basolatérales du tubule proximal et de la branche descendante de l'anse de Henle, a pour fonction la réabsorption passive d'eau. Elle assure la perméabilité de l'eau des membranes apicale et basale des cellules épithéliales du néphron proximal. AQP7 est également exprimée dans le tubule proximal et exerce une fonction métabolique *via* la réabsorption du glycérol. AQP1 exerce un rôle clé dans la formation de l'hypertonie rénale et les souris KO AQP1 ont un défaut de la perméabilité hydrique¹⁵⁴. Un défaut d'expression d'AQP7 impacte faiblement la perméabilité hydrique mais est associé à des pathologies métaboliques telles que l'obésité et la résistance à l'insuline¹⁵⁵.

La seconde étape de la régulation de la concentration urinaire a lieu au niveau du tube collecteur et implique trois AQP : AQP2, AQP3 et AQP4. AQP2 est localisée dans la membrane apicale des cellules du tube collecteur. AQP3 et AQP4 sont exprimées au niveau basolatéral de ces cellules. AQP2 a une fonction centrale dans la régulation de la concentration urinaire. Elle est principalement régulée par l'hormone antidiurétique arginine vasopressine (AVP) qui, en se fixant à son récepteur V2, augmente la production intracellulaire d'AMPc, l'activation de la kinase PKA et ainsi, la phosphorylation d'AQP2 sur les sérines 269 et 256. AQP2 est alors transloquée du cytoplasme (où elle forme un *pool* de réserve en cas de besoin d'augmentation de la perméabilité hydrique) vers la membrane plasmique apicale du tube collecteur. Après fusion des vésicules avec la membrane plasmique, l'AQP2 augmente la perméabilité hydrique apicale et réabsorbe l'eau depuis la lumière du tube collecteur. L'eau ressort des cellules par le côté basal à travers AQP3 et AQP4¹⁵⁶. L'inactivation des gènes codant AQP2, AQP3 et AQP4 est associée à un défaut de concentration urinaire plus ou moins sévère¹⁵⁷.

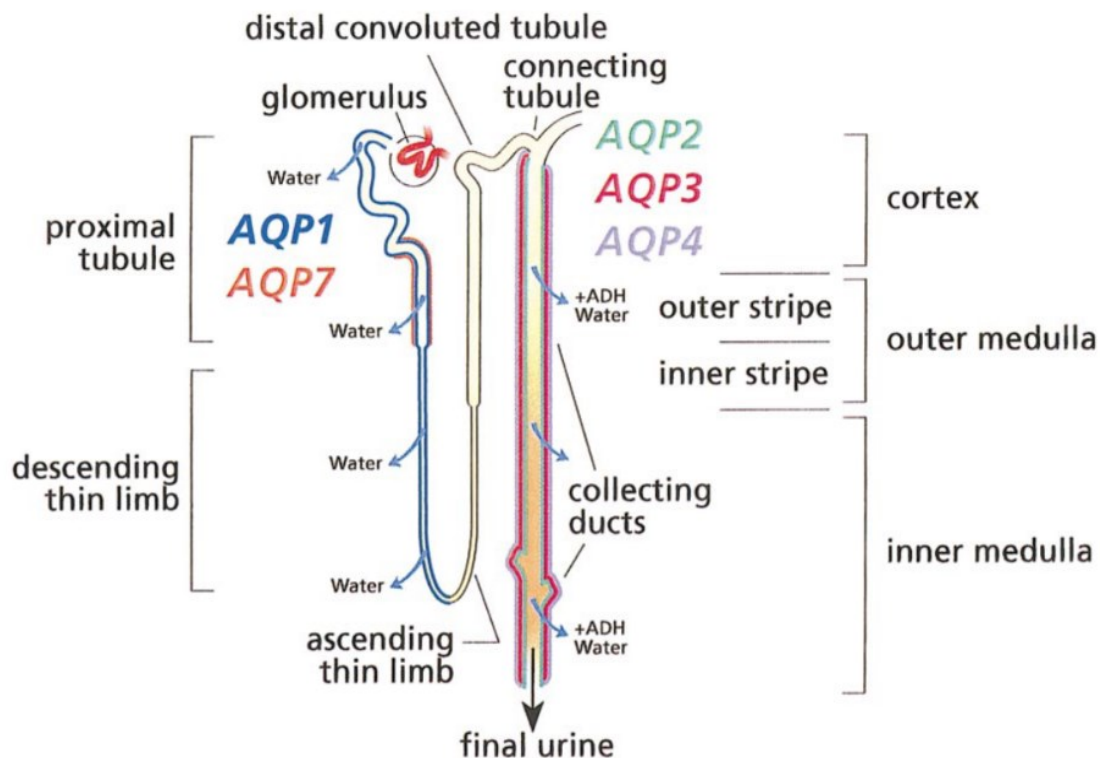


Figure 27 : Expression et localisation des aquaporines le long d'un néphron rénal. AQP1 est localisée dans le tubule proximal, la branche descendante de l'anse de Henle. AQP2, AQP3 et AQP4 dans le tube collecteur et AQP7 dans le tubule proximal. D'après Nielsen, 2002¹⁴⁹.

5.3.2. Le transport de glycérol

Les aquaglycéroporines (AQP3, AQP7 et AQP9) sont largement distribuées à travers les tissus de l'organisme et ont un rôle important dans le transport et le métabolisme du glycérol. Le glycérol entre dans la glycolyse et permet un lien entre les métabolismes lipidique et glucidique.

AQP3 est abondamment exprimée dans la peau où elle exerce un rôle important d'hydratation de l'épiderme. Elle module la prolifération et la différenciation des kératinocytes *via* le transport facilité d'eau et de glycérol¹⁵⁸. Elle est aussi présente dans les membranes plasmiques des cellules principales du tube collecteur rénal où elle assure l'expulsion de l'eau qui rentre par AQP2 au niveau apical. Une stimulation prolongée par la vasopressine augmente le niveau d'expression d'AQP3 au niveau basolatéral, ce qui augmente la perméabilité hydrique de ces cellules. AQP3 peut également transporter de l'H₂O₂ et participer ainsi à l'initiation de signaux intracellulaires de migration et de progression tumorale^{159,160}.

AQP7 est abondamment exprimée dans le tissu adipeux où elle facilite l'efflux de glycérol nouvellement produit dans les adipocytes vers le sang. Le tissu adipeux est la source de glycérol plasmatique la plus importante. Un défaut de régulation de glycérol est un facteur clé de développement de pathologies métaboliques et une déficience d'AQP7 est associée à une résistance à l'insuline et à une obésité¹⁵⁵.

AQP9 est fortement exprimée dans la membrane plasmique des hépatocytes où elle permet l'absorption de NH₃, l'efflux d'urée synthétisée et facilite l'absorption par le foie du glycérol libéré par les adipocytes dans le sang¹⁵⁵.

5.3.3. Autres fonctions des aquaporines

Les aquaporines ont de nombreux autres rôles physiologiques, notamment la migration cellulaire nécessaire à l'angiogenèse et la cicatrisation, la régulation de l'homéostasie hydrique cérébrale, la transduction de signaux neuronaux, l'hydratation de la peau et la prolifération cellulaire dans la cicatrisation.

5.4. MECANISMES D'ACTION D'AQUAPORINE 1 DANS LA PROGRESSION TUMORALE

Malgré les avancées majeures des dernières décennies dans la compréhension de la pathogenèse du cancer ainsi que l'émergence de nouveaux traitements anti-cancéreux, il reste néanmoins nécessaire d'identifier de nouveaux biomarqueurs de progression métastatique et des nouvelles cibles thérapeutiques supportant la progression tumorale, notamment l'angiogenèse. Plusieurs molécules inhibitrices des AQP ont été développées, mais des essais cliniques sont nécessaires pour vérifier la toxicité et l'efficacité de ces drogues.

5.4.1. Modulation de la migration et invasion tumorales

Le phénotype invasif repose principalement sur deux processus clés à l'origine de métastases : la migration et l'invasion des cellules tumorales.

AQP1 a un rôle significatif dans la migration et l'invasion tumorale. Sa surexpression dans les cancers du sein, poumons, colon et le mélanome induit l'accélération de la migration et l'extravasation des cellules tumorales ainsi que la formation de métastases^{161,162}. Ces cellules tumorales ont une altération de la perméabilité hydrique osmotique et expriment de manière polarisée AQP1 au niveau du front de migration. Cette modulation de la migration est due au flux osmotique d'eau à travers la membrane plasmique induit par AQP1 en réponse à un gradient osmotique créé par la dépolymérisation de l'actine et l'influx d'eau au niveau du front de migration des cellules tumorales¹⁴⁶. L'influx d'eau localisé à travers AQP1 augmente la pression hydrostatique et cause une expansion locale de la membrane plasmique, suivie d'une repolymérisation de l'actine pour stabiliser la protrusion ainsi formée dans la membrane (Figure 28). Un autre mécanisme expliquant le rôle d'AQP1 dans la migration implique un changement de forme et de volume des cellules durant leur passage dans des microenvironnements étroits, qui s'ajoute aux forces hydrostatiques générées par AQP1 et à la polymérisation/dépolymérisation de l'actine.

Les canaux ioniques et les transporteurs tels que les AQP, canaux K^+ , pompes Na^+/H^+ , co-transporteur Na^+ /glucose ont un rôle clé dans la cascade de formation de métastases tumorales, qui inclut une perte des interactions cellule-cellule, l'invasion du stroma ainsi que l'intra- et l'extravasation vasculaire. En effet, ces canaux ioniques et transporteurs sont responsables de la migration polarisée des cellules et des flux d'eau osmotiques à travers la membrane, qui requièrent une régulation coordonnée du $[Ca^{2+}]$ intracellulaire, du pH intra- et extracellulaire, du volume et du potentiel membranaire^{163,164}.

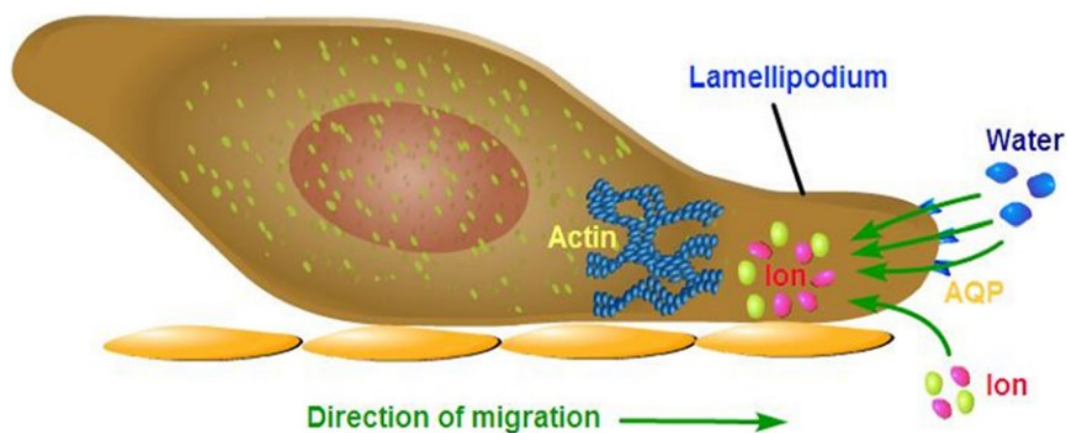


Figure 28 : Mécanisme possible de la migration cellulaire dépendante d'aquaporine 1. D'après Wang, 2015¹⁴⁴.

5.4.2. Modulation de l'angiogénèse tumorale

L'angiogénèse tumorale est la formation de nouveaux vaisseaux sanguins pour le drainage de la tumeur et l'entrée des cellules tumorales dans la circulation. La protéine AQP1 est fortement exprimée dans les micro-vaisseaux prolifératifs de tumeurs malignes du cerveau¹⁵¹ et des myélomes¹⁶⁵ chez l'homme.

L'extinction génique ou par siARN (ARN interférence) de la protéine AQP1 dans un modèle murin de mélanome a corrélé avec une diminution de la densité des micro-vaisseaux tumoraux, un retard dans la croissance tumorale et une meilleure survie des souris¹⁶⁶. Cette altération angiogénique s'accompagne d'une diminution d'expression

du marqueur endothélial facteur VIII¹⁶⁷. *In vitro*, les cellules issues de souris KO AQP1 ou les cellules humaines endothéliales saines AQP1 négatives ou de mélanomes AQP1 négatifs ont un défaut de migration, forment des vaisseaux anormaux, montrent une altération dans la polarisation de l'actine au niveau du front de migration de la membrane plasmique et sont incapables de former des réseaux de cordes¹⁶⁶. AQP1 a donc un double rôle dans la progression tumorale : elle facilite la migration à la fois des cellules tumorales et des cellules endothéliales, induisant ainsi l'angiogenèse tumorale¹⁶⁸.

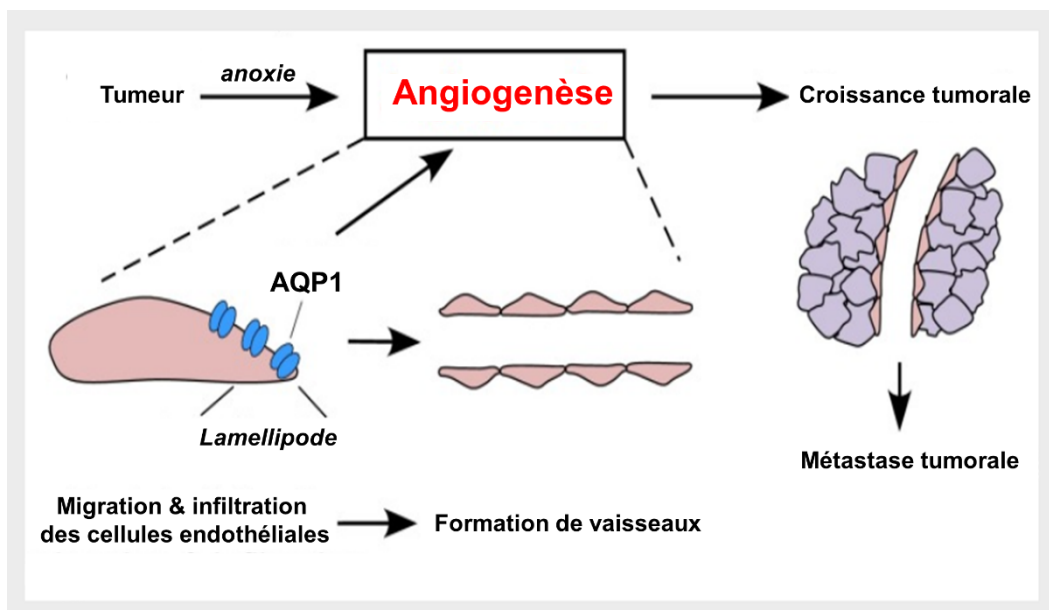


Figure 29 : Mécanisme possible de l'implication d'aquaporine 1 dans la croissance et l'angiogenèse tumorales. AQP1 facilite le transport de l'eau au niveau des lamellipodes des cellules endothéliales, favorisant leur migration et invasion, et participe ainsi à l'angiogenèse tumorale. D'après Esteva-Font, 2013¹⁶⁸.

5.4.3. Modulation de la prolifération tumorale

Certaines études ont montré une contribution d'AQP1 dans la stimulation de la prolifération des cellules, notamment dans des fibroblastes murins embryonnaires dont la surexpression *in vitro* d'AQP1 a augmenté la prolifération. A contrario, une inhibition de la prolifération cellulaire a été observée dans des lignées d'ostéosarcome dépourvues d'AQP1^{169,170}.

PRESENTATION DU TRAVAIL EXPERIMENTAL

Le 1^{er} objectif de cette thèse a été de mettre au point un modèle d'étude *in vitro* d'hémangiome infantile qui répond à des doses cliniques de propranolol, afin de déterminer la ou les cibles cellulaires et moléculaires dans l'hémangiome infantile. En effet, en clinique, le propranolol a démontré son efficacité uniquement dans l'hémangiome infantile, ce qui fait de cette tumeur un modèle idéal pour l'étude mécanistique de son effet anti-tumoral. Le modèle développé dans ce travail comprend les trois types cellulaires majeurs de l'hémangiome infantile : les cellules endothéliales, les péricytes et les télocytes. Ce modèle a permis d'étudier le rôle des télocytes et de la protéine AQP1.

Le 2nd objectif de l'étude, réalisé en collaboration avec le Dr Priscilla Kaulanjan-Checkmodine, a été d'évaluer l'implication des catécholamines dans la pathogenèse de l'hémangiome infantile et la réponse au propranolol. Pour cela, ont été analysés au niveau tissulaire et au niveau cellulaire l'expression des enzymes de synthèse et les niveaux des catécholamines (Adrénaline, Noradrénaline et Dopamine) dans l'hémangiome infantile. Les observations nous ont amené à tester l'impact de la noradrénaline sur la tubulogénèse avec le modèle d'hémangiome infantile développé en objectif 1.

Le 3^{ème} objectif a été de tester *in vitro* les effets du propranolol sur des mécanismes clés de la tumorigénèse dans deux lignées humaines d'angiosarcome : la prolifération, la migration, l'interaction cellule-cellule et la formation de sphéroïdes. L'effet « on » ou « off » target du propranolol a été évalué en éteignant les récepteurs bêta-adrénergiques à l'aide de shARN. Nous avons également testé AQP1 comme cible moléculaire dans ce modèle. Enfin, une étude protéomique a été réalisée sur l'une des deux lignées traitée au propranolol pour identifier de nouveaux marqueurs/cibles et proposer le développement de nouvelles approches thérapeutiques.

RESULTATS

PARTIE 1 : ROLE CRITIQUE D'AQUAPORINE 1 ET DES TELOCYTES DANS LA REPONSE DE L'HEMANGIOME INFANTILE AU PROPRANOLOL

Article 1 : Critical role of Aquaporin-1 and telocytes in infantile hemangioma response to propranolol beta blockade.

Article publié dans Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS) le 8 février 2021.

Critical role of Aquaporin-1 and telocytes in infantile hemangioma response to propranolol beta blockade

François Moisan^{a,1}, Sandra Oucherif^a, Priscilla Kaulanjan-Checkmodine^a, Sorilla Prey^{a,b}, Benoît Rousseau^c, Marc Bonneau^d, Stéphane Claverol^d, Etienne Gontier^e, Sabrina Lacomme^e, Lea Dousset^{a,b}, Thierry Couffinhaf^b, Jerome Toutain^g, Maya Loot^h, Muriel Cario-André^{a,i}, Marie-Laure Jullié^j, Christine Léauté-Labrèze^{a,b,i}, Alain Taieb^{a,b,i}, and Hamid Reza Rezvani^{a,i}

^aInserm, Biothérapie des Maladies Génétiques Inflammatoires et Cancers (BMGIC), UMR 1035, University of Bordeaux, F-33076 Bordeaux, France; ^bService de Dermatologie Adulte et Pédiatrique, Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Bordeaux, F-33000 Bordeaux, France; ^cAnimalerie A2, University of Bordeaux, F-33000 Bordeaux, France; ^dPlateforme de protéomique, Centre de Génomique Fonctionnelle de Bordeaux, University of Bordeaux, F-33076 Bordeaux, France; ^eBordeaux Imaging Center (BIC)–Electron Microscopy Unit, University of Bordeaux, F-33076 Bordeaux, France; ^fInserm U 1034, University of Bordeaux, F-33600 Pessac, France; ^gService de Génétique Médicale, CHU de Bordeaux, F-33000 Bordeaux, France; ^hService de Chirurgie Pédiatrique, CHU de Bordeaux, F-33000 Bordeaux, France; ⁱCentre de Référence pour les Maladies Rares de la Peau, CHU Bordeaux, F-33000 Bordeaux, France; and ^jService d'anatomopathologie, CHU de Bordeaux, F-33000 Bordeaux, France

Edited by Napoleone Ferrara, University of California San Diego, La Jolla, CA, and approved December 15, 2020 (received for review September 14, 2020).

Propranolol, a nonselective β -adrenergic receptor (ADRB) antagonist, is the first-line therapy for severe infantile hemangiomas (IH). Since the incidental discovery of propranolol efficacy in IH, preclinical and clinical investigations have shown evidence of adjuvant propranolol response in some malignant tumors. However, the mechanism for propranolol antitumor effect is still largely unknown, owing to the absence of a tumor model responsive to propranolol at nontoxic concentrations. Immunodeficient mice engrafted with different human tumor cell lines were treated with anti-VEGF bevacizumab to create a model sensitive to propranolol. Proteomics analysis was used to reveal propranolol-mediated protein alteration correlating with tumor growth inhibition, and Aquaporin-1 (AQP1), a water channel modulated in tumor cell migration and invasion, was identified. IH tissues and cells were then functionally investigated. Our functional protein association networks analysis and knockdown of ADRB2 and AQP1 indicated that propranolol treatment and AQP1 down-regulation trigger the same pathway, suggesting that AQP1 is a major driver of beta-blocker antitumor response. Examining AQP1 in human hemangioma samples, we found it exclusively in a perivascular layer, so far unrecognized in IH, made of telocytes (TCs). Functional *in vitro* studies showed that AQP1-positive TCs play a critical role in IH response to propranolol and that modulation of AQP1 in IH-TC by propranolol or shAQP1 decreases capillary-like tube formation in a Matrigel-based angiogenesis assay. We conclude that IH sensitivity to propranolol may rely, at least in part, on a cross talk between lesional vascular cells and stromal TCs.

hemangioma | propranolol | telocyte | aquaporin-1 | angiogenesis

Infantile hemangioma (IH), the most frequent tumor of infancy affecting 1 to 5 out of 100 newborns, is a noncongenital benign vascular tumor. Although most IHs are small, inconsequential, and regress spontaneously in many cases, medical treatment is needed in at least 15% of cases. The current first-line therapy for severe IH is systemic propranolol, a nonselective β -adrenergic receptor (ADRB) antagonist (1). Three subtypes of ADRBs (ADRB1, ADRB2, and ADRB3), which are coded by three distinct genes, belong to the superfamily of G protein-coupled receptors. They are characterized by a pocket containing binding sites for agonists (e.g., adrenaline and noradrenaline) and competitive antagonists (e.g., propranolol and timolol) (2). Although a role for ADRB in cancer progression was suggested long ago (3), our serendipitous observation of the efficacy of propranolol in treating IH (4) prompted many researchers to explore the anticancer properties of β -blockers.

Although the therapeutic effect of propranolol is thought to be due to its ability to affect vasoconstriction, endothelial cell (EC) apoptosis, and/or inhibition of angiogenesis by modulating

vascular endothelial growth factors (5, 6), the precise mechanism of its action is still under debate and largely unknown. Propranolol has been shown to have a growth inhibitory effect as a monotherapy on hemangioma cells *in vitro* (7–9). Nevertheless, growth inhibition was observed at doses 100- to 1,000-times higher than the plasmatic dose measured in treated IH patients (i.e., never above 0.5 μ M) (10). It is then difficult to make the assumption that the effect of propranolol in IH can be mimicked and studied with such unrealistic doses. Indeed, the absence of an *in vivo* IH model that has shown a tumor growth inhibition induced by propranolol as well as difficulties in accessing IH patient samples before and after treatment have jointly hindered the quest to reveal its mechanism of action. Although several attempts have been made to create an *in vivo* IH model, a convincing antitumor effect of propranolol is still lacking (11–15). Of note, Lee et al. showed an effect of propranolol on vascular volume in a model of hemangioma cell-formed vessels in mice but without studying the effect on tumor growth (15). Considering this global effort and given the potential interest to identify a biomarker of malignant tumors sensitive to propranolol, we decided to explore the antitumor effect of propranolol in

Significance

Although a role for β -adrenergic receptor (ADRB) in cancer progression was suggested a long time ago, our serendipitous observation of the propranolol efficacy in treating infantile hemangioma (IH) has driven attention in exploring the anti-tumor properties of β -blockers. We identified Aquaporin-1 (AQP1) as a player in antitumor propranolol response and as a histological marker of IH vascular structures including telocytes, which are dendritic cells that form a distinctive peripheral layer in IH. We conclude that IH sensitivity to propranolol may rely, at least in part, on a cross talk between lesional vascular cells and stromal telocytes.

Author contributions: F.M., A.T., and H.R.R. designed research; F.M. and S.O. performed research; P.K.-C., S.P., B.R., M.B., S.C., E.G., S.L., L.D., T.C., J.T., M.L., M.C.-A., M.-L.J., and C.L.-L. contributed new reagents/analytic tools; and F.M., S.O., A.T., and H.R.R. analyzed data and wrote the paper.

Competing interest statement: A patent has been granted for the use of beta-blockers in infantile capillary hemangiomas, with A.T. and C.L.-L. as inventors and Bordeaux University and Bordeaux University Hospital as owners of the patent. None of the authors have any other financial interests related to this work.

This article is a PNAS Direct Submission.

Published under the PNAS license.

¹To whom correspondence may be addressed. Email: francois.moisan@u-bordeaux.fr.

This article contains supporting information online at <https://www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.2018690118/-DCSupplemental>.

Published February 8, 2021.

different tumor types in vivo. Retrospective clinical studies have shown that β -blocker use for hypertension is associated with improved cancer-specific survival compared with patients using other types of antihypertensive medications. For instance, a beneficial effect on survival was seen in breast cancer patients receiving the nonselective β -blocker propranolol but not with the β -1 antagonist atenolol (16). Additional studies showed a benefit of β -blocker use in patients with colorectal (17, 18) and pancreatic cancer (19). A prospective nonrandomized study of propranolol in the adjuvant setting for resected melanoma found an 80% reduction in melanoma recurrence (20). However, prospective clinical evidence supporting a role for propranolol in cancer treatment or prevention is limited. It is unlikely that beta blockade becomes an anticancer drug as a monotherapy, but combination therapy seems more promising (21). In this work, our hypothesis was that the antitumor effect of propranolol in malignant tumors was related to some common feature with the IH microenvironment. Since the increase of hypoxia-induced mediators has been shown in children with hemangioma (22, 23), we speculated that a hypoxic microenvironment could trigger the propranolol antitumor effect. We therefore chose a model of human malignant tumor cells xenografted in immunocompromised mice with continuous treatment of anti-vascular endothelial growth factor-(VEGF-A) bevacizumab (Avastin), hereafter abbreviated as Bev, in order to obtain a hypoxic tumor model (24). Tumor hypoxia induced by sunitinib and bevacizumab has already been used in mouse models in order to study specific drug sensitivity induced by up-regulation of HIF-1- α hypoxia (25). Sunitinib has also been used to assess propranolol antitumor efficacy in a melanoma model (26); nonetheless, bevacizumab is a more specific antiangiogenic drug than sunitinib.

Using human malignant cell lines xenografted into immunodeficient mice as a model, we show in this study that propranolol induced the down-regulation of aquaporin-1 (AQP1), a transmembrane protein forming a channel for water and small solutes (27–30), and has a very pronounced effect on tumor growth in our mouse model (31–34). Looking for AQP1 expression in IH, we describe a special peripheral vascular layer made of dendritic cells named telocytes (TCs) with highly specific expression of AQP1, suggesting a key role in the exquisite sensitivity of IH to propranolol, which was verified in vitro with patients' cells.

Results

Propranolol Efficiently Reduces the Growth of U87 Tumors in Bev-Treated Mice. To explore propranolol antitumor efficacy in a Bev-treated mouse model, four human malignant cell lines, A375 (melanoma), A431 (skin carcinoma), CAPAN-2 (prostate cancer), and U87-MG (glioblastoma), were subcutaneously engrafted into immunocompromised NOD-SCID gamma (NSG) mice. The effect of propranolol in the Bev-treated mouse model was evaluated on tumor growth.

Antitumor activity of propranolol was evaluated in Bev-treated mice by the T/C ratio, which was calculated according to the following equation: T/C ratio = tumor weight of propranolol treated mice/mean tumor weight of placebo-treated control mice. While propranolol showed no significant antitumor activity in xenografts of A375 (melanoma), A431 (skin carcinoma), or CAPAN-2 (prostate cancer), a significant growth inhibitory effect of propranolol was measured in U87-MG (glioblastoma) xenografts. (Fig. 1A).

We then tested antitumor efficacy of three different doses of propranolol (i.e., 2, 10, and 50 mg/kg per day) on U87-MG xenografts in Bev-treated and non-Bev-treated mice (Fig. 1B). Results showed that propranolol treatment as monotherapy (without Bev) had no significant effect on U87 tumor growth (Fig. 1B). On the contrary, Bev alone (without propranolol) had a very pronounced antitumor effect during the first month. However, a reacceleration of tumor growth occurred afterward

(Fig. 1B), perhaps due to the development of resistance to Bev. Interestingly, the addition of propranolol enhanced the antitumor effect of Bev and significantly inhibited reacceleration of tumor growth for the three different doses of propranolol (Fig. 1B and C). For example, tumors treated with Bev and 2 mg/kg/day of propranolol were 42% smaller than those treated with Bev/placebo ($P < 0.0001$) (Fig. 1B). Of note, the high dose of propranolol (50 mg/kg/day) was less efficient than low doses (2 and 10 mg/kg/day) in inhibiting tumor growth, with only 30% smaller tumors (Fig. 1B and C and *SI Appendix, Fig. S1A*), which did not correlate with VEGF expression (*SI Appendix, Fig. S1B*). This might be because propranolol has been found to have an inverse agonist activity in addition to its ADRB antagonist activity in a concentration-dependent manner (35–37). For the rest of the experiments, we used 2 mg/kg/day of propranolol to minimize this observed paradoxical effect.

Antitumor Effect of Propranolol Is Associated with AQP1 Down-Regulation in U87 Model. We used the U87 Bev-treated model to investigate the propranolol antitumor mechanism. To this end, we performed a differential proteomics analysis to characterize the proteins differentially expressed between xenografts treated with Bev + propranolol versus Bev + placebo versus untreated. Differential proteomics analysis revealed nine overexpressed and eight down-regulated proteins in Bev-treated xenografts compared with untreated tumors as seen in the volcano plot (Fig. 2A and *SI Appendix, Table S1*) (38). When U87 tumors treated with Bev + propranolol versus Bev + placebo were compared, differential protein expression profiling revealed 6 up-regulated and 10 down-regulated proteins (Fig. 2B and *SI Appendix, Table S1*) (38). The two volcano plots show the common modulated proteins AQP1 and α -1 type 1 collagen (COL1A1), with AQP1 being the most significantly altered when propranolol is added. Of note, AQPs are a family of transmembrane proteins with 13 members (39). They are different in their tissue distribution, although the majority are located in the epithelium and specialized cells such as erythrocytes, astrocytes, adipocytes, and ECs (39). AQPs have various known physiological roles, such as urine concentration in kidney, cell migration required for angiogenesis and wound healing, regulation of brain water homeostasis, neural signal transduction, skin moisturization, and cell proliferation in wound healing (40). We therefore focused on the role of AQP1 in tumor response to propranolol for the following reasons: First, while AQP1 protein level was up-regulated in Bev-treated U87 xenografts, its level was decreased to baseline in the Bev + propranolol group. Second, there was a significant positive correlation between tumor weight and AQP1 protein abundance in the Bev-treated group ($R^2 = 0.4279$ and $P = 0.0402$) (i.e., the higher the level of AQP1 protein, the larger the tumors on the day of euthanasia) (Fig. 2C). These results suggest that AQP1, whose overexpression has been recently associated with many types of cancers as a distinctive clinical prognostic factor (29, 30, 41–46), could be a promising downstream target for the beta blockade antitumor effect. To establish potential relationships between ADRB2 and AQP1, STRING functional protein association analysis (47) was performed on proteomics data. It showed that ADRB2 could be linked to AQP1 through calmodulin-2, SRC, caveolin-1, and β -catenin (Fig. 2D). Interestingly, carbonic Anhydrase IX (CA9), MMP10, and collagen 1, three of the nine up-regulated proteins in the Bev-treated group (Fig. 2A and *SI Appendix, Table S1*), were found downstream of this ADRB2/AQP1 signaling network (Fig. 2D).

AQP1 Is Regulated by Beta Adrenergic Pathway. We first examined the expression of both ADRB2 and AQP1 in U87 xenografts compared to propranolol-unresponsive tumors A375, A431, and CAPAN-2 (*SI Appendix, Fig. S1C*). Of note, among the three

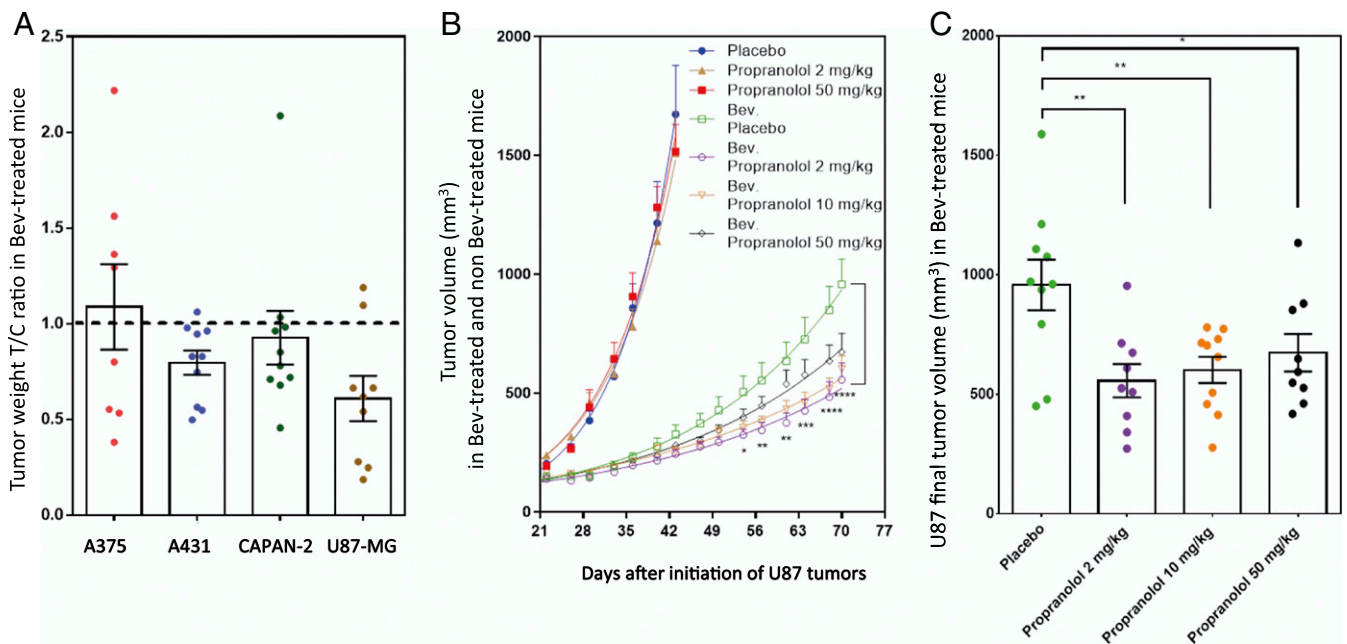


Fig. 1. Propranolol antitumor efficacy in a bevacizumab-treated mouse model. (A) A375 (melanoma), A431 (skin carcinoma), CAPAN-2 (prostate cancer), and U87-MG (glioblastoma) cell lines were subcutaneously transplanted into NSG mice. Antitumor growth activity of propranolol (2 mg/kg/day) was evaluated by the T/C ratio in mice under continuous treatment with 10 mg/kg twice a week of Bev. The T/C ratio was calculated according to the following equation: T/C ratio = tumor weight of propranolol treated mice/mean tumor weight of placebo-treated control mice. (B) U87-MG propranolol dose response (2, 10, or 50 mg/kg/day) in Bev-treated mice compared with non-Bev-treated mice. Tumor volumes were measured (mean \pm SEM) at indicated times. Statistical analysis (two-way ANOVA with uncorrected Fisher's Least Significant Difference (LSD) test) compared tumor volumes in mice treated with 2 mg/kg/day of propranolol to placebo-treated mice in a Bev-treated mouse model. (C) The distribution of tumor volumes at day 75 after U87-MG cell transplantation into mice. Statistical analysis (two-tailed unpaired *t* test) is expressed as mean \pm SEM. *n* = 10 mice per group; **P* < 0.05, ***P* < 0.005, ****P* < 0.0005, and *****P* < 0.00005.

ADRBs, U87 cells have undetectable expression of ADRB1 and ADRB3 by qPCR (*SI Appendix, Fig. S1D*). We then verified whether down-regulation of ADRB2 could affect the tumorigenic properties of U87. To this end, endogenous ADRB2 protein expression in U87 cells was inhibited using lentivirus-mediated expression of short hairpin RNA (shRNA) against ADRB2. Five different shRNA targeting ADRB2 were tested; all experiments were performed with the most efficient one (later called shADRB2), which inhibited the mRNA expression of ADRB2 by 75% (*SI Appendix, Fig. S2A*). Both shCT- and shADRB2-transduced U87 were subcutaneously transplanted into NSG mice. In mice subjected to intraperitoneal injections of Bev (10 mg/kg, twice a week), periodic measurements of tumor volume indicated that knockdown of ADRB2 resulted in significantly decreased tumor growth. Indeed, in Bev-treated mice, the mean volume of tumors derived from shADRB2-transduced cells on day 75 after transplantation was $1,221 \text{ mm}^3 \pm 199$ compared to $2,304 \text{ mm}^3 \pm 375$ for tumors derived from shCT-transduced U87 (*P* = 0.031) (Fig. 3A). The study of tumor-specific growth rate (SGR) in non-Bev and Bev-treated mice (following the equation $\text{SGR} = \text{Ln}2/\text{doubling time}$) confirms that shADRB2 inhibits tumor growth in Bev-treated mice only (*SI Appendix, Fig. S2B*).

Differential proteomics analysis among groups revealed that the AQP1 protein level was significantly lower in tumors formed by shADRB2-transduced cells compared with those formed by shCT-transduced cells in Bev-treated mice (*P* = 0.0258) but not in phosphate-buffered saline (PBS)-treated control mice (Fig. 3B).

ADRB2/AQP1 Axis in Propranolol Antitumor Effect. To determine whether the observed antitumor effect of propranolol relies on the ADRB2/AQP1 axis, we tested the effect of AQP1 down-regulation in the U87 bev-treated model. Both shCT- and

shAQP1-transduced U87 were transplanted into NSG mice. As in the previous experiments, treatments with placebo or propranolol were started the day after cell transplantation in Bev-treated mice. Western blotting revealed that lentivirus-mediated expression of shAQP1 stably inhibited by 77% the AQP1 expression in tumors formed by shAQP1-transduced U87 (*SI Appendix, Fig. S2E*). In accordance with the previous experiments, propranolol enhanced the antitumor growth effect of Bev, reflected by a twofold decrease in the weight of tumor T/C ratio compared with placebo-treated tumors (Fig. 3C). Likewise, AQP1 down-regulation sensitized U87 tumors to Bev treatment. Indeed, the mean weight of tumor T/C ratio composed of shAQP1-transduced cells was twofold lower compared with tumors composed of shCT-transduced cells in Bev-treated mice (Fig. 3C and *SI Appendix, Fig. S2E*). Of note, while the addition of propranolol or down-regulation of AQP1 improved the antitumor growth effect of Bev (*P* = 0.0336 and *P* = 0.0149, respectively), the combination of propranolol and shAQP1 had no additive effect on tumor growth in Bev-treated mice, with a mean tumor weight similar to that obtained by the addition of propranolol or of shAQP1 (Fig. 3C). This suggests that AQP1 down-regulation and propranolol treatment modulate tumor growth through the same pathway.

To further examine this hypothesis, the effect of AQP-1 up-regulation was then tested. The results showed that the volume of tumors in Bev-treated mice was higher when AQP1 expression was up-regulated (pAQP1) (Fig. 3D and *SI Appendix, Fig. S2C*). However, this increase in tumor volume was not observed when shADRB2-transduced U87 was used (Fig. 3D and *SI Appendix, Fig. S2D*), confirming that AQP1/ADRB2 axis and propranolol treatment modulate tumor growth through the same pathway. Moreover, in both pAQP1 and control tumors (pCT), there was no additive effect of ADRB2 down-regulation (shADRB2) and

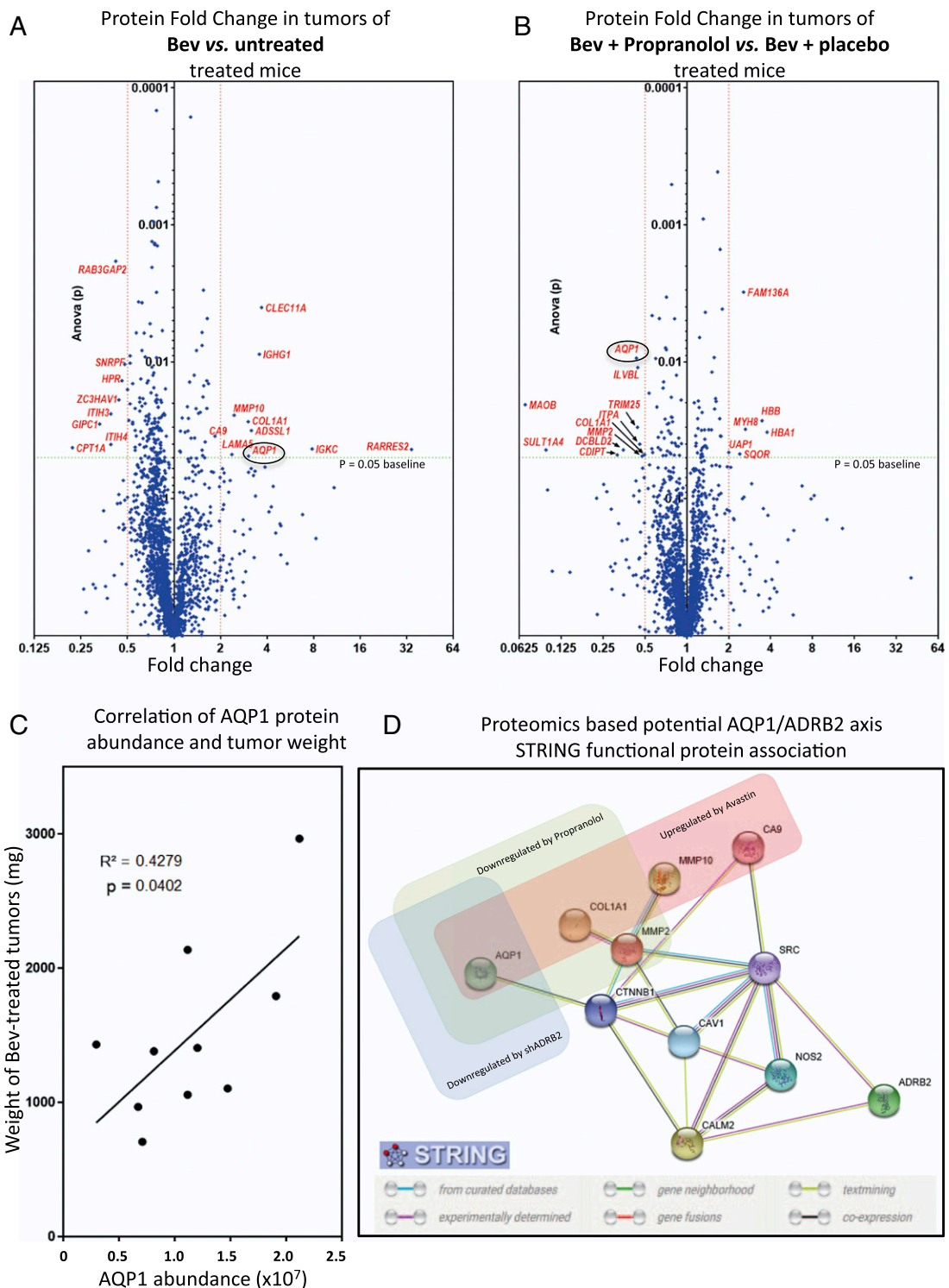


Fig. 2. AQP1 is up-regulated in Bev-treated tumors but down-regulated when propranolol is added. (A and B) U87-MG tumor xenografts treated with placebo only, Bev + placebo, or combined Bev and propranolol were subjected to proteomic analysis. Volcano plots show a comparison of fold change protein levels between placebo- and Bev-treated xenografts (A) and Bev + placebo- and combined (Bev + propranolol)-treated xenografts (B). Proteins with a mean protein abundance altered by a factor of two or more and $P > 0.05$ (ANOVA) have their name in red. The protein with the most statically different mean abundance when propranolol was added was AQP1. (C) Pearson correlation analysis showing a significant positive correlation between AQP1 protein abundance and tumor weight (milligrams) in Bev-treated mice. The calculation of protein abundance (sum of the volume of corresponding human peptides) is shown. (D) Potential ADRB2-AQP1 interaction network. STRING functional protein association, based on proteome data of nontreated, Bev-treated, Bev plus propranolol-treated U87 tumors, as well as proteomic data from Bev-treated xenografts, formed by shCT- and shADRB2-transduced U87. Proteins significantly up-regulated in Bev-treated U87 tumors are boxed in red. Proteins significantly down-regulated in xenografts treated with Bev plus propranolol are boxed in green. Proteins significantly down-regulated in Bev-treated xenografts formed by transplantation of shADRB2-transduced U87 are boxed in blue. MMP10 = matrix metalloproteinase 10; MMP2 = type IV collagenase (angiogenesis); CTNNB1 = β -catenin; CAV1 = Caveolin-1; CALM2 = Calmodulin-2; NOS2 = nitric oxide synthase, inducible. The STRING consortium database 2017 of known and predicted protein-protein interactions was used for interaction network prediction.

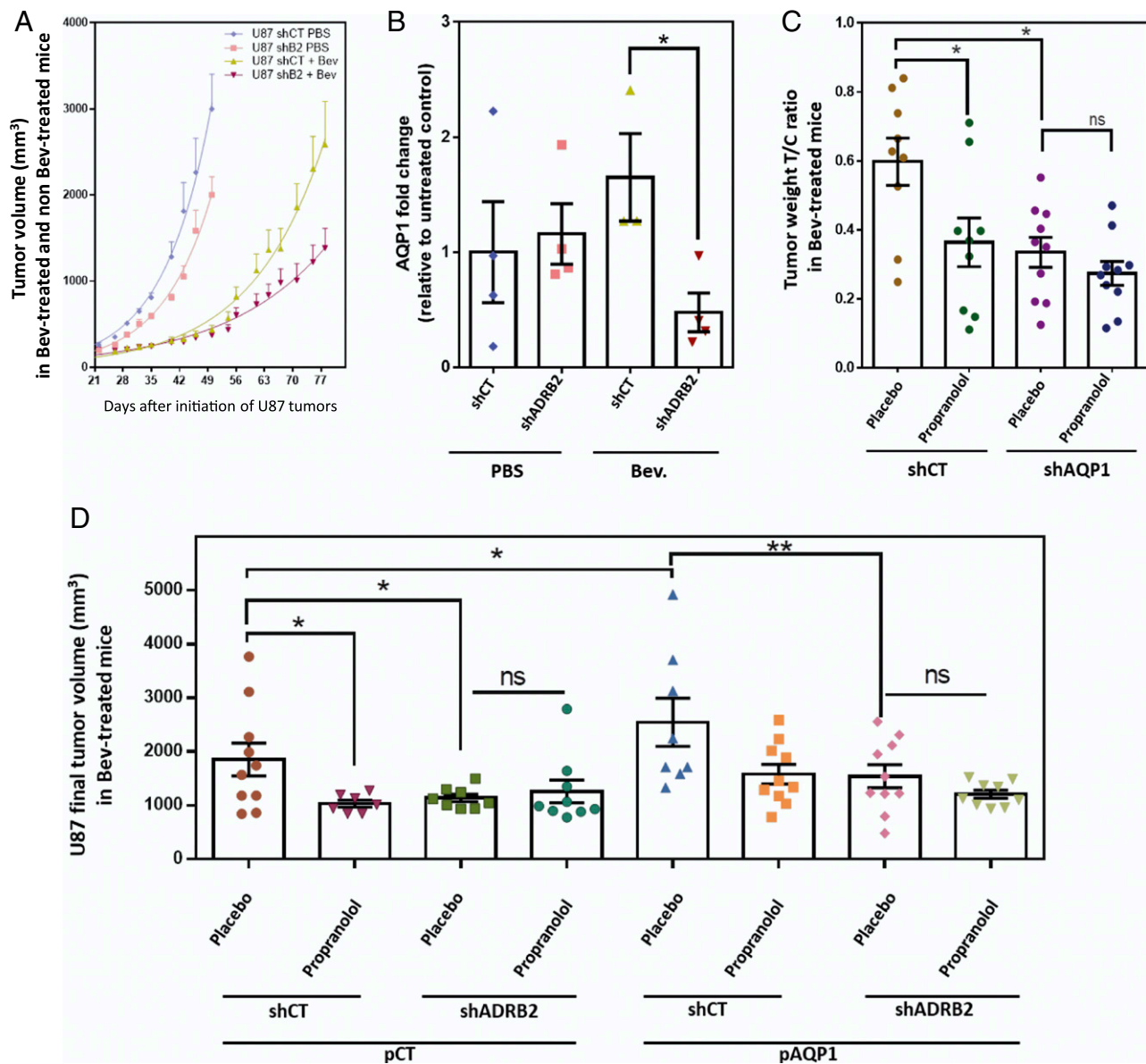


Fig. 3. ADRB2-AQP1 axis in propranolol antitumor response using U87 cells. U87 cells transduced with shCT, shADR B2, shAQP1, pCT, and pAQP1 were transplanted into NSG mice. (A) Xenograft tumors of shCT or shADR B2 U87-transduced cells were subjected to periodic measurements of tumor volume in Bev- and non-Bev-treated mice. (B) Collected tumors from shCT or shADR B2 U87-transduced cells were subjected to proteomic analysis. The AQP1 level was compared among the groups. Data are presented as mean with SEM relative to untreated control abundance. The calculation of protein abundance (sum of the volume of corresponding human peptides) is shown. (C) Xenograft tumors of U87-transduced cells with shCT or shAQP1. Antitumor growth activities of propranolol and shAQP1 were evaluated by the T/C ratio, which was calculated according to the following equation: T/C ratio = tumor weight of Bev-treated mouse/mean tumor weight of counterpart non-Bev-treated control mice (same shRNA). (D) Xenograft tumors of U87 cells transduced with shCT or shADR B2 and pCT or pAQP1 overexpression vector. Final tumor volumes were compared at day 85, expressed as mean \pm SEM. Statistical analysis was performed with one-way ANOVA with uncorrected Fisher's LSD. $n = 10$ mice per group; * $P < 0.05$, ** $P < 0.005$; ns, not significant.

propranolol treatment, confirming that propranolol effect is at least partially due to an on-target beta blockade effect.

AQP1 Has a Unique Histologic Profile in IHs Revealing a Specific Implication of Human TCs. Following the identification of AQP1 as a downstream target of propranolol in our U87 mouse model, we wondered whether AQP1 could be a marker of propranolol response in IH. To this end, the AQP1 expression profile was assessed using immunofluorescence staining on a panel of IHs; congenital hemangiomas such as noninvolutive congenital hemangiomas (NICH), partially involutive congenital hemangiomas (PICH), and rapidly involutive congenital hemangiomas (RICH) (which are typically nonresponsive to propranolol treatment);

and infant normal foreskin dermis (Fig. 4 and *SI Appendix, Figs. S3, S4, and Table S2*). The results showed that IH has a unique AQP1 profile compared to nonpropranolol-responsive congenital hemangiomas or normal skin. Although IH is a capillary tumor, during the natural evolution of the tumor, vascular structures acquire bigger lumen and three layers. Indeed, while CD31⁺/CD34⁺ EC (tunica intima) and alpha smooth muscle actin (α -SMA⁺) smooth muscle cells or pericytes (PER) (tunica media) in IHs were negative for AQP1, CD31⁻/CD34⁺ perivascular cells of the innermost layer of tunica adventitia stained positively for AQP1 (Fig. 4 *A–C* and *E* and *SI Appendix, Figs. S3 and S5*). On the contrary, ECs and perivascular cells were respectively positive and negative for AQP1 in infant normal dermis (Fig. 4*D*)

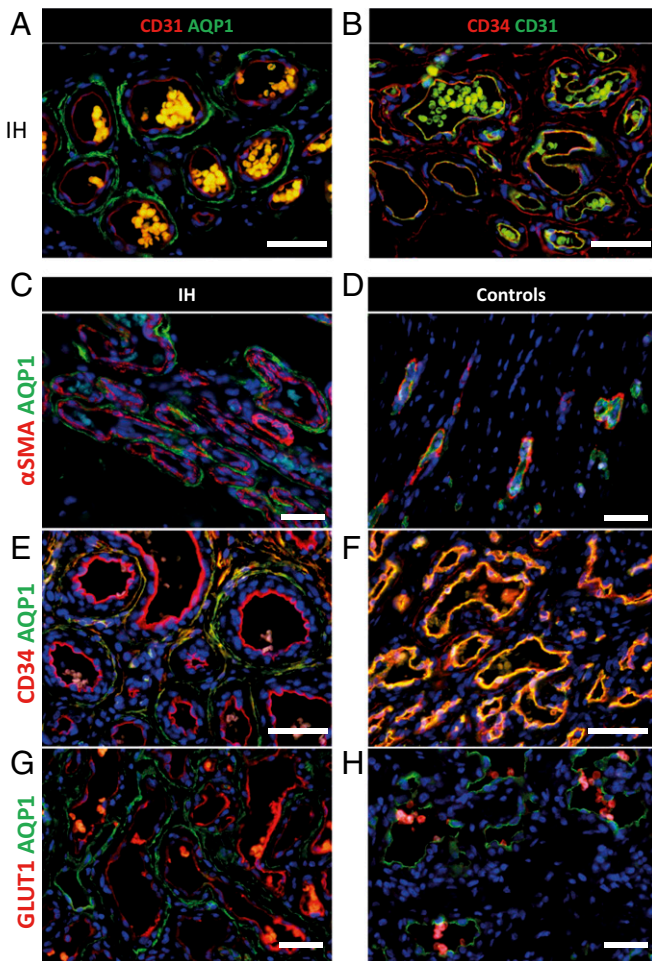


Fig. 4. AQP1 unique expression profile differentiates IHs from congenital hemangiomas. (A) ECs in IH are positive for CD31 marker (red staining) but negative for AQP1 (green staining). Perivascular stromal cells are positive for AQP1 but negative for CD31. (B) ECs in IH are positive for CD31 marker (green staining) and co-stain with CD34 (red staining). Perivascular stromal cells are positive for CD34 but negative for CD31. (C) PERs in IH are positive for α -SMA (red staining) but negative for AQP1 (green staining). Perivascular stromal cells are negative for α -SMA but positive for AQP1. (D) PERs in normal dermis are positive for α -SMA (red staining) but negative for AQP1 (green staining). ECs are negative for α -SMA and positive for AQP1. (E) ECs in IH are positive for CD34 marker (red staining) but negative for AQP1 (green staining). Perivascular stromal cells are positive for CD34 and co-stain with AQP1. (F) ECs in RICH congenital hemangioma are positive for CD34 marker (red staining) and co-stain with AQP1 (green staining). Perivascular stromal cells are positive for CD34 but negative or low for AQP1. (G) ECs in IH are positive for GLUT1 marker (red staining) but negative for AQP1 (green staining). Perivascular stromal cells are positive for AQP1 but negative for GLUT1. (H) ECs in RICH congenital hemangioma are negative for GLUT1 marker (red staining) but positive for AQP1 (green staining). Perivascular stromal cells are negative for GLUT1 and negative or low for AQP1 (red blood cells coexpress GLUT1 and AQP1).

or congenital hemangiomas (NICH, PICH, and RICH) (Fig. 4 F and H and *SI Appendix*, Figs. S3, S4, and S7). Thus, the AQP1 profile expression is a differential marker between IHs and NICH/PICH/RICH in addition to GLUT1 EC positivity; indeed, IH lesional GLUT1⁺ ECs are found to be AQP1⁻, and GLUT1⁻ ECs are found to be AQP1⁺ (48) (Fig. 4 G and H and *SI Appendix*, Figs. S7, S8, and Table S2). To further determine whether these cells could be a potential target of propranolol in IHs, their expression of ADRB2 was analyzed. Immunostaining showed that AQP1-positive perivascular cells were also positive for ADRB2 (*SI Appendix*, Fig. S8C).

Finally, we further characterized these perivascular cells. The specific shape of these cells with very long prolongations, a perivascular location, and CD34-positive staining suggest that they belong to a particular cell type, TCs. Morphologically, TCs have a small cell body and specific long prolongations (telopodes), with thin segments (podomers) alternating dilations (podoms) (49). TCs have been described in the interstitium of many organs. In the dermis, TCs are located around the blood vessels, sweat glands, and nerves (50) and have been defined in skin as CD34⁺/PDGFR- α ⁺/vimentin⁺ and CD31⁻/CD68⁻/CD163⁻/c-KIT⁻/ α -SMA⁻ cells (51). Importantly, vesicle-shedding properties have been noted in the vicinity of other interstitial cells such as mast cells (52) that are abundant and of an interesting nature in IH pathophysiology (53, 54). So far, only electron microscopy can confirm a TC cell type. Therefore, their characterization in IH was performed using transmission electron microscopy. Their very long (tens to hundreds of micrometers) and very thin podomers and telopodes as well as their stromal synapses with mast cells (Fig. 5 A–C and *SI Appendix*, Fig. S9) confirmed that AQP1-positive perivascular cells in IH are TCs. We tested AQP1-positive perivascular cells in IH for markers expressed by dermal TCs. In addition to CD34, TCs in IHs were positive for PDGFR- α and vimentin (Fig. 5C). They were partially positive for VEGF-A and K_i-67, indicating that TCs in IHs are proliferative and proangiogenic (Fig. 5C). Finally, they were negative for c-KIT, Tryptase, CD133, CD68, and CD163 (Fig. 5C).

IH Sensitivity to Propranolol Relies on a Cross Talk between Vascular Cells and Perivascular TCs. Given the potential importance of TCs in pathophysiology of IH, we wondered whether propranolol could affect the level of AQP1 in IH-TC. To answer this question, IH-TC were isolated from IH patients. We first checked the expression of the different markers. The results showed that the isolated cell populations were homogeneously positive for PDGFR- α , AQP1, and CD34 but negative for CD31 (Fig. 5D). Of note, in culture, IH-TC maintained very long and very thin prolongations typical morphology (Fig. 5E) as well as higher AQP1 protein levels than CH-TC or foreskin control-TC (Fig. 5F).

To examine the functional importance of TC in the pathophysiology of IH, we next developed a Matrigel-based angiogenesis assay, in which three cell types of interest were incorporated (i.e., IH-EC, IH-PER, and IH-TC). To this end, all three cell types were isolated from the IH fresh tissues using magnetic beads coupled with antibodies against CD31, CD34, and CD146 (as explained in *Materials and Methods* and *SI Appendix*, Fig. S10). These sorted cells were then labeled with three different fluorescent dyes: EC in red, TC in green, PER in blue. The cells were then homogeneously seeded on microslide wells covered with a thin layer of Matrigel. Tube formation was imaged 4 h later, and several angiogenesis parameters (including total tubes, total tube length, and the tube-covered area) were then analyzed. The results showed that propranolol significantly decreased the total number of tubes (27% less tubes when 3 μ M propranolol was added) (Fig. 6 A and B). Similar results were obtained when 10 μ M propranolol was added (Fig. 6 A and B) ($n = 3$; confirmed with cells from three different patients, including multiple angiogenesis parameters).

Then, we investigated the relationship between propranolol response and IH-TC-specific properties; we first replaced them with primary foreskin-TC. The results showed that the antiangiogenic effect of propranolol was lost using foreskin-TC (Fig. 6 A and B). Finally, to see whether propranolol can affect angiogenesis parameters when IH-TC is used alone, a single cell-type angiogenesis assay was used. Of interest, no major effect of propranolol on tubulogenesis were found when IH-EC, IH-PER, and IH-TC cells were used separately (*SI Appendix*, Fig. S11A). Altogether, these results suggest that the sensitivity of IH to propranolol relies on a cross talk between IH-EC, IH-

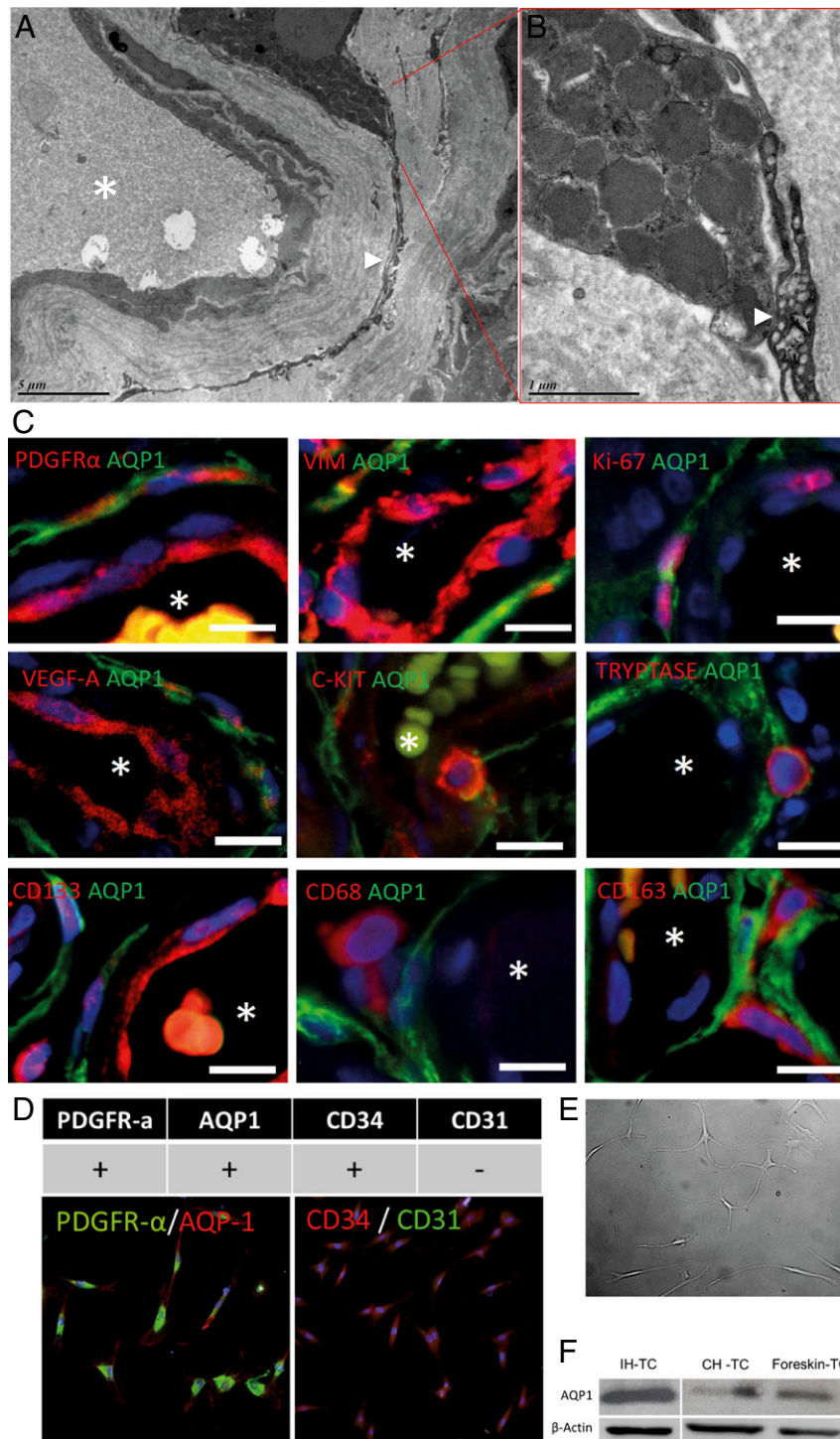


Fig. 5. AQP1-positive in IH are TCs. (A) Transmission electron microscopy shows a TC with a very long and thin telopode in IHs, which is connected to a mast cell by stromal synapses (B), confirming that these CD34+/AQP1+ cells are TCs. (C) TC immunophenotyping was assessed using immunofluorescence staining of PDGFR- α , vimentin, Ki-67, VEGF-A, c-KIT, Tryptase, CD133, CD68, and CD163. Nuclei were marked in blue with DAPI. Vessel lumen is marked with a white asterisk. (D) In vitro phenotyping of TCs was done by immune-cyto-fluorescence; TCs are homogeneously PDGFR- α , AQP1, and CD34 positive and CD31 negative. (E) Cultured IH-TC photograph. (F) AQP1 protein level in IH-TC, CH-TC (congenital hemangioma-TC), or foreskin control-TC, evaluated by Western blot (β -actin is used as loading control).

PER, and IH-TC. We then sought to determine whether the AQP1 protein level in TC was sensitive to propranolol, as observed in our in vivo model. The AQP1 protein level was evaluated in IH-TCs that had been treated for 2 h with 3 μ M propranolol in the same culture conditions as the tubulogenesis

assays. The results showed a significant reduction of the AQP1 level in propranolol-treated IH-TC (quantification is the mean of $n = 3$ experiments) (Fig. 6C). Finally, tubulogenesis assay was used to examine the functional link between AQP1 and propranolol treatment. To this end, AQP1 was down-regulated in

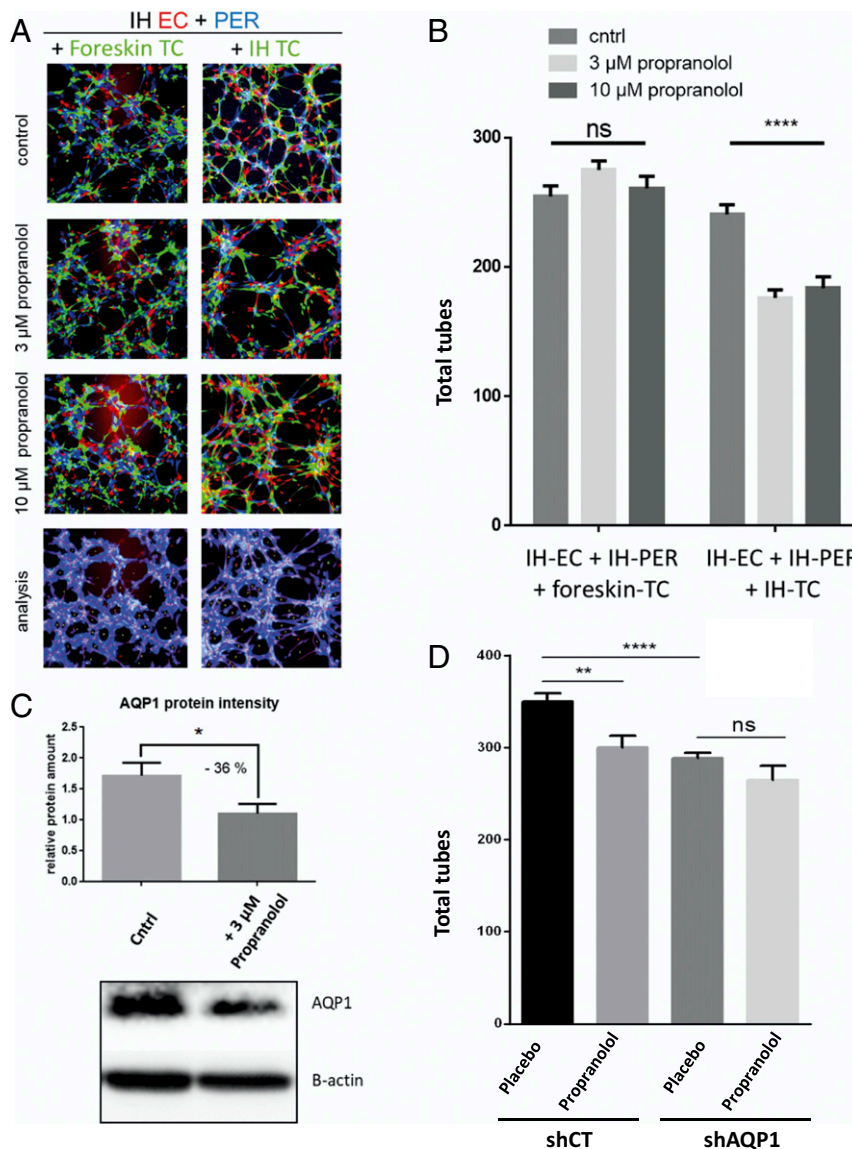


Fig. 6. The effect of propranolol on the tubulogenic properties of the combined IH-derived EC, PER, and TC depends on IH-TC. Isolated IH cells are cultured and amplified before they were labeled with three different fluorescent dyes: EC in red, PER in blue, and TC in green. EC, PER, and TC were seeded on microslide wells covered with a thin layer of Matrigel. Tube formation was then imaged 4 h later and analyzed using Wimtube software from Wimasis. (A and B) Substitution of IH-TC by foreskin-TC impaired the responses of the three-cell-type model of IH to 3 and 10 μM of propranolol. (A) Representative fluorescent images with illustrative analysis image. (B) Total tubes, average quantification of three wells per condition (n = 3), representative results from three different patients (n = 3). (C) Western blotting evaluation of AQP1 protein level in IH-TC in control medium or after 2 h with 3 μM propranolol. Protein intensity was normalized to β-actin. The mean relative protein amount was calculated based on three different experiments (n = 3). (D) AQP1 in IH-TC was down-regulated using shAQP1. Then, shCT- and shAQP1-transduced TCs were used in our in vitro three-cell-type-based tubulogenesis assay. Data are expressed as mean ± SEM. Statistical analysis was performed with one-way ANOVA with uncorrected Fisher's LSD. *P < 0.05, **P < 0.005, and ****P < 0.00005; ns, not significant.

IH-TC through the transduction of a lentiviral vector encoding shRNA targeting AQP1 (efficiency was checked by Western blot, *SI Appendix*, Fig. S11B). These cells were then subjected to our three-cell-type-based tubulogenesis assay. The results showed that AQP1 knockdown significantly decreased the total number of tubes and that adding propranolol on these cells did not lead to a more pronounced effect (Fig. 6D), confirming that AQP1 and propranolol treatment modulate tube formation through the same pathway.

Discussion

This study provides insight into the antitumor pathway of propranolol and strongly suggests a link between AQP1 expression

and propranolol sensitivity in malignant and benign tumors. Indeed, in our mouse experiments, only the U87 Bev-treated model with increased AQP1 was sensitive to propranolol; moreover, our results on hemangiomas show that IHs, which are sensitive to propranolol, present a GLUT1⁺/AQP1⁻ endothelium and GLUT1⁻/AQP1⁺ perivascular TCs. On the contrary, congenital hemangiomas (NICH, PICH, and RICH), which do not respond to propranolol, have a GLUT1⁻/AQP1⁺ endothelium and GLUT1⁻/AQP1⁻ perivascular TCs. The GLUT1⁺/AQP1⁻ endothelium with a specific perivascular positive for AQP1 (and AQP4) located in astrocytes (44) is a known feature of the blood-brain barrier (BBB) in the central nervous system (CNS) and brain tumors such as glioblastomas (44, 55). BBB

astrocytes are known to be responsible for the negative regulation of AQP1 in ECs (56).

It has been shown that the expression of AQP1 is up-regulated in many cancers (30) and some brain tumors, notably glioblastomas (44, 57, 58). AQP1 expression in glioblastomas has been found to be induced by growth factors, D-glucose, and hypoxia (44, 59). Consistently, we found that AQP1 is up-regulated in Bev-treated U87 xenografts (Fig. 2A), where relative hypoxia is induced by antiangiogenic effect of the anti-VEGF-A antibody bevacizumab (34). As evidence of the induction of hypoxia in Bev-treated xenografts, elevated levels of CA9, a marker of hypoxia, as well as of some proangiogenic factors associated with hypoxia such as VEGF were detected by qPCR (*SI Appendix, Fig. S1B*) and MMP2/10 in our proteomics analysis (Fig. 2 and *SI Appendix, Table S1*). Some of those hypoxia-related markers elevated in our Bev-treated model have been associated with the pathophysiology of IH (22, 23, 60), which might explain why their presence is associated with propranolol tumor response in our model. It is also interesting to note that COL1A1 was coregulated with AQP1; a functional link may exist between AQP1, COL1A1, and metalloproteinases, as they are all part of extracellular matrix remodeling. Indeed, physiological and pathological functional links have been shown in the literature (28, 30, 61). Then, our results showed that AQP1 down-regulation by propranolol treatment or shAQP1 significantly decreased the exponential growth phase of Bev-treated U87 tumors (Figs. 1B, 2B, and 3C). We observed a significant antitumor effect of propranolol at doses of 2 and 10 mg/kg/day under this regimen. However, the 50 mg/kg/day dose of propranolol was less efficient, which is interesting in regard to dose response on VEGF expression (Fig. 1B and C and *SI Appendix, Fig. S1A*). This paradoxical effect has also been described with propranolol in an osteoporosis animal model (62, 63) and may be attributed to the interaction of high doses of propranolol with different types of adrenergic receptors and/or the concentration-dependent inverse agonist activity of propranolol on ADRB. This observation is important because the majority of studies to date on the mechanism of action of propranolol used very high doses, ranging from 50 to 200 μ M in vitro (64–68). Moreover, it has been shown that 100 nM is sufficient to reach a maximum plateau in binding ADRB2 (69). Given that the plasma concentration of propranolol in IH patients after oral administration of one of the two daily doses of propranolol (3 mg/kg) varies between 21.3 and 125 ng/mL (0.48 μ M) (10), it is very unlikely that the effect of propranolol in IH can be mimicked and studied with 100 \times doses.

Little is known about the relationship between ADRBs and AQPs. Nonetheless, treatment of frog skin with isoproterenol, a nonselective ADRB agonist, was reported to be associated with water permeability, whereas propranolol had an inhibitory effect (70). Both events are mediated by AQPs, which are translocated to the apical membrane (70). Moreover, agonists of β 2 adrenoceptor, terbutaline and salbutamol, respectively, in human monocytic cell line or in vivo in rat up-regulated AQP1 (71, 72). In our xenograft model, propranolol treatment was as efficient as AQP1 silencing in reducing Bev-treated tumor growth, and no additive effect was observed (Fig. 3C). Moreover, when propranolol treatment combined with ADRB2 silencing was tested, no additive effect was found (Fig. 3D), suggesting that the antitumor effect of propranolol is the result of an on-target ADRB2 effect. Our functional protein association networks analysis as well as AQP1 silencing and overexpression further suggest that AQP1 regulation and propranolol treatment have a common pathway in our xenograft model (Fig. 2D). Indeed, although AQP1 has been described as a distinctive clinical prognostic factor in cancers (30) and we further confirmed the protumor effect of its overexpression in vivo (Fig. 3D), its silencing alone had no antitumor effect in non-Bev-treated mice in our model

but greatly sensitized U87 tumors to Bev with a magnitude comparable to that of propranolol treatment or ADRB2 down-regulation (Fig. 3C and D). Of note, the antiangiogenic effect of AQP1 silencing has been shown to be increased by hypoxia and/or VEGF-neutralizing antibody; in other words, AQP1 is required for hypoxia-inducible angiogenesis (73).

Given the importance of AQP1 for propranolol response in our xenograft tumor model, we looked for the cell expressing AQP1 in IH. Interstitial perivascular TCs, which are numerous in IH, are highly positive for AQP1 compared to congenital hemangiomas or normal dermis (Figs. 4 and 5F). The effects of TCs on skin homeostasis, including neonatal blood–skin barrier, skin remodeling, skin regeneration, and skin repair could be a part of the pathomechanism of IH leading to its rapid growth and its natural or propranolol-induced involution (50, 74, 75). Moreover, IH-TCs make contacts known as stromal synapses with the numerous mast cells present in IH, as evidenced by many vesicles observed at the level of the stromal synapses (Fig. 5A–C and *SI Appendix, Fig. S8*), allowing a paracrine cell–cell dialogue (50, 76). Interestingly, we were able to reproduce the propranolol effect on the AQP1 levels seen in the U87 mouse model on cultured IH-TCs as well (Fig. 6C). Moreover, our in vitro angiogenesis assays showed that propranolol significantly decreased angiogenesis parameters when IH-TC were mixed with IH-EC and IH-PER (Fig. 6). Of note, this effect was lost if IH-TC was replaced with foreskin-TC or if each cell type was used separately (Fig. 6 and *SI Appendix, Fig. S11*). Furthermore, down-regulation of AQP1 in IH-TCs significantly decreased angiogenesis parameters and abrogated the effect of propranolol on in vitro tube formation (Fig. 6D). Altogether, these results suggest that the exquisite sensitivity of IH to propranolol relies on a cross talk between the three cell types with a critical role of AQP1-positive IH-TC. The role of AQP1 as a marker of propranolol response should be further investigated to identify tumor types with potential therapeutic benefits of beta blockade.

Materials and Methods

Drugs and Chemicals. Clinical formulations of bevacizumab Avastin (Roche) and propranolol (Karnodyl, Primius Lab Ltd) were purchased from the Bordeaux Hospital Pharmacy. The infantile propranolol formulation Hemangeol and placebo were provided by Laboratoire Pierre Fabre Medicament, France.

Human Samples. All studies were performed in accordance with the Declaration of Helsinki. Human samples were obtained from patients seen at Bordeaux University Hospital. All donors provided written informed consent. The Ethics Committee of Bordeaux University Hospital (CE-GP-2019-23) approved the study.

Animals and Experimental Protocol. NSG mice were bred in standard conditions compliant with regulations and housed in a pathogen-free animal facility. All mouse experiments were carried out with the approval of Bordeaux University Animal Care and Use Committee. Male mice were used in all experiments. Mice were randomly assigned to each group before the start, and experiments were performed blinded with respect to treatment. Experimental subgroups consisted of 10 mice per group, with each subgroup caged separately. A total of 5×10^5 of U87-MG tumor cells combined with Matrigel matrix high concentration (Corning) were subcutaneously injected in the right flank of mice. For the Bev-treated mouse model (Bev is a humanized anti-VEGF monoclonal antibody), Bev (intraperitoneal injections of 10 mg/kg, twice a week) and propranolol (Hemangeol, Pierre Fabre Pharmaceuticals, Inc., Parsippany, NJ) (ranging from 2, 10, or 50 mg/kg/day in drinking water, renewed three times a week) treatments were started the day after transplantation of human tumor cells. Counterpart control groups received Bev and the Hemangeol vehicle solution in drinking water (placebo). To assess the tumor volumes and growth rate of tumors, caliper measurements of the tumors were obtained twice a week. Tumor volumes were calculated by the following formula: volume = (width) 2 \times length/2. After 2.5 mo of treatment, mice were euthanized and tumors were extracted, weighted, and collected for immunohistochemical studies and RNA and protein purification.

Cell Lines and Culture. A375 (melanoma), A431 (skin carcinoma), CAPAN-2 (prostate cancer), and U87-MG (glioblastoma) were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC; <http://www.atcc.org/>). The U87-MG line was derived from malignant gliomas of a male patient. The cell line is likely a glioblastoma of CNS origin (77). Cells were grown in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) supplemented with 10% fetal calf serum (Gibco; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) and cultured in a humidified atmosphere of 5% CO₂ at 37 °C. U87-MG cell cultures were tested every 2 wk for mycoplasma contamination by PCR.

Cytogenetic Verification. To examine the cytogenetic profile of U-87 MG, cells were cultured in Labtek chamber slides (Thermo Fisher Scientific). After 2 d, mitotic divisions were blocked at the (pro)metaphasic stage by adding a colcemid solution for 3 h (KaryoMAX Colcemid solution at 0.10 µg/mL; Life Technologies Corporation). Hypotonic shock and fixation of the chromosome preparations were performed with a saline solution (1% sodium citrate) and Carnoy's solution (acetic acid and methanol, 1:3 volume/volume), respectively.

Conventional karyotyping of U-87 MG cells was performed after Giemsa staining and heat denaturation ("R-bands"). Conventional karyotyping of U-87 MG cells identified structural abnormalities previously described in this cell line, including additional material of unknown origin on chromosomes 1 and 6, partial deletions of chromosomes 9 and 18, and a derivative chromosome from a translocation involving the long arm of chromosome 10 and the short arm of chromosome 16 (chromosome der(10;16)(q10;q10)); data are from the Physical Sciences-Oncology Network Bioresource Core Facility (PBCF) at ATCC.

Driver mutation information is as follows: CDKN2A homozygous c.1_471del471, phosphatase and Tensin homolog (PTEN) homozygous c.209+1G > T, CDKN2C homozygous c.1_507del507, p53 wild type. The mutation data were obtained from the Sanger Institute Catalogue of Somatic Mutations in Cancer website (https://cancer.sanger.ac.uk/cell_lines/sample/overview?id=687590).

Immunohistochemistry and Fluorescence. Following deparaffinization of formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections, antigen was retrieved by using citrate buffer pH6 in a PT Link instrument (Dako, Agilent). The sections were then incubated overnight at 4 °C with primary antibodies (SI Appendix, Table S3). After incubation for 1 h with conjugated secondary antibody, the nuclei were counterstained with DAPI.

IH Cell Sorting. After mechanical disruption and enzyme digestion of IH fresh tissues with a mixture of collagenase (Sigma-Aldrich) and dispase (Sigma-Aldrich) in sterile PBS, single cell suspensions were purified with a sequential sorting using a column-based magnetic cell separation technology according to the manufacturer's recommendations (SI Appendix, Fig. S9). ECs, TCs, and PERs were isolated by sequential sorting, first with anti-CD31 (EC), then anti-CD34 (TC), and finally anti-CD146 (PER) coupled to magnetic beads (Miltenyi). ECs were cultured in endothelial growth medium (EGM2, Promocell), TC in DMEM (Gibco) supplemented with 10% fetal bovine

serum, and PER in Pericyte growth medium (Promocell), all supplemented with 1% penicillin-streptomycin.

In Vitro Matrigel Tube Formation Assay. Matrigel Growth Factor Reduced Basement Membrane Matrix (Corning) was polymerized for 30 min at room temperature and then 1 h at 37 °C on µ-slide angiogenesis wells (Ibidi). Sorted IH-EC, HI-PER and IH-TC were, respectively, labeled with CMRA-548 orange dye, CellTrace-405 violet dye and CMFDA-492 green dye (Thermo Fisher). IH-derived cells were suspended in 50 µL endothelial growth medium (EGM2, Promocell) containing 10 µM noradrenaline (Mylan) and 3 or 10 µM propranolol (Karnodyl, Primius Lab Ltd). Cells from each type were seeded separately or together onto Matrigel in triplicate (10,000 cells/well or 3,200 EC + 3,200 TC + 3,200 PER/well). µ-slides were incubated for 4 h at 37 °C. After incubation, tube formation was imaged at 10x magnification using an Eclipse microscope (Nikon). The angiogenesis parameters, including total tubes, total tube length, percentage of covered area, total loops, and nets, were analyzed using the image analysis software Wimasis WimTube (Oni-magin Technologies). The mean value of three images taken per well was obtained for each condition in triplicate.

Statistical Analyses. Equal variance was checked for each comparison using an F-test. The standard two-tailed Student's *t* test for two data sets or ANOVA (Fisher's test) with more than two data sets was used, except in Fig. 3D for comparisons between the following groups: "placebo shCT pCT" versus "propranolol shCT pCT" or versus "placebo shADRB2 pCT," because of significantly different variance, Welch's unequal variances *t* test was used instead. Analyses were performed using Prism V6 and V8 (GraphPad Inc.). Data are presented as means ± SEM.

Data Availability. The data supporting the findings of this study are available within the article text and its supporting information. The mass spectrometry proteomics data have been deposited to the ProteomeXchange Consortium via the Proteomics Identifications Database partner repository with the dataset identifier PXD021457 (<http://www.ebi.ac.uk/pride/archive/projects/PXD021457>) (38).

ACKNOWLEDGMENTS. A.T. gratefully acknowledges support from the Agence nationale de la recherche (ANR), Ligue Nationale contre le Cancer, L'Oreal La Roche Posay, Laboratoires Pierre Fabre with a special mention to Dr. Jean-Jacques Voisard for his continuous support, "Fondation de l'Avenir," and "Fondation Association pour la Recherche contre le Cancer." Electron microscopy studies were conducted at the Bordeaux Imaging Center-Bordeaux University, a core facility of the national infrastructure "France Biolmaging" (ANR-10-INBS-04 FranceBiolmaging). We thank VectUb of Bordeaux University for preparing lentiviral particles. We are grateful to R. Cooke for copyediting the manuscript and L. R. Salmly from Bordeaux University, Institut de Santé Publique, d'Epidémiologie et de Développement (ISPED), Centre INSERM U897-Epidémiologie-Biostatistique, for statistical analysis support. Source funding was received through ANR "BETASKIN2" ANR-12-BSV1-0021-01.

1. C. Léauté-Labrèze *et al.*, A randomized, controlled trial of oral propranolol in infantile hemangioma. *N. Engl. J. Med.* **372**, 735–746 (2015).
2. D. M. Rosenbaum, S. G. F. Rasmussen, B. K. Kobilka, The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature* **459**, 356–363 (2009).
3. H. M. Schuller, B. Cole, Regulation of cell proliferation by beta-adrenergic receptors in a human lung adenocarcinoma cell line. *Carcinogenesis* **10**, 1753–1755 (1989).
4. C. Léauté-Labrèze *et al.*, Propranolol for severe hemangiomas of infancy. *N. Engl. J. Med.* **358**, 2649–2651 (2008).
5. S. Greenberger, J. Bischoff, Infantile hemangioma-mechanism(s) of drug action on a vascular tumor. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **1**, a006460 (2011).
6. C. H. Storch, P. H. Hoeger, Propranolol for infantile haemangiomas: Insights into the molecular mechanisms of action. *Br. J. Dermatol.* **163**, 269–274 (2010).
7. J. Stiles *et al.*, Propranolol treatment of infantile hemangioma endothelial cells: A molecular analysis. *Exp. Ther. Med.* **4**, 594–604 (2012).
8. H. Chim *et al.*, Propranolol induces regression of hemangioma cells through HIF-1 α -mediated inhibition of VEGF-A. *Ann. Surg.* **256**, 146–156 (2012).
9. A. Wong *et al.*, Propranolol accelerates adipogenesis in hemangioma stem cells and causes apoptosis of hemangioma endothelial cells. *Plast. Reconstr. Surg.* **130**, 1012–1021 (2012).
10. L. Del Frari *et al.*, Propranolol pharmacokinetics in infants treated for Infantile Hemangiomas requiring systemic therapy: Modeling and dosing regimen recommendations. *Pharmacol. Res. Perspect.* **6**, e00399 (2018).
11. D. Xu *et al.*, Isolation, characterization, and in vitro propagation of infantile hemangioma stem cells and an in vivo mouse model. *J. Hematol. Oncol.* **4**, 54 (2011).
12. D. M. Smadja, J. B. Mulliken, J. Bischoff, E-selectin mediates stem cell adhesion and formation of blood vessels in a murine model of infantile hemangioma. *Am. J. Pathol.* **181**, 2239–2247 (2012).
13. Z. A. Z. A. Khan *et al.*, Multipotential stem cells recapitulate human infantile hemangioma in immunodeficient mice. *J. Clin. Invest.* **118**, 2592–2599 (2008).
14. H. M. Mai *et al.*, CD133 selected stem cells from proliferating infantile hemangioma and establishment of an in vivo mice model of hemangioma. *Chin. Med. J. (Engl.)* **126**, 88–94 (2013).
15. D. Lee *et al.*, Propranolol targets the contractility of infantile haemangioma-derived pericytes. *Br. J. Dermatol.* **171**, 1129–1137 (2014).
16. P. Pantziarka, B. A. Bryan, S. Crispino, E. B. Dickerson, Propranolol and breast cancer-a work in progress. *Ecancermedicallscience* **12**, ed82 (2018).
17. P. Tsui *et al.*, Generation, characterization and biological activity of CCL2 (MCP-1/1E) and CCL12 (MCP-5) specific antibodies. *Hum. Antibodies* **16**, 117–125 (2007).
18. L. Jansen, M. Hoffmeister, V. Arndt, J. Chang-Claude, H. Brenner, Stage-specific associations between beta blocker use and prognosis after colorectal cancer. *Cancer* **120**, 1178–1186 (2014).
19. M. S. Beg *et al.*, Impact of concurrent medication use on pancreatic cancer survival-SEER-medicare analysis. *Am. J. Clin. Oncol.* **41**, 766–771 (2018).
20. V. De Giorgi *et al.*, Propranolol for off-label treatment of patients with melanoma: Results from a cohort study. *JAMA Oncol.* **4**, e172908 (2018).
21. P. Pantziarka *et al.*, Repurposing drugs in oncology (ReDO)-Propranolol as an anti-cancer agent. *Ecancermedicallscience* **10**, 680 (2016).
22. M. E. Kleinman *et al.*, Hypoxia-induced mediators of stem/progenitor cell trafficking are increased in children with hemangioma. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **27**, 2664–2670 (2007).
23. G. Chen *et al.*, Hypoxia-induced autophagy in endothelial cells: A double-edged sword in the progression of infantile haemangioma? *Cardiovasc. Res.* **98**, 437–448 (2013).

24. K. Kumar *et al.*, Dichloroacetate reverses the hypoxic adaptation to bevacizumab and enhances its antitumor effects in mouse xenografts. *J. Mol. Med. (Berl.)* **91**, 749–758 (2013).
25. J. Hartwich *et al.*, HIF-1 α activation mediates resistance to anti-angiogenic therapy in neuroblastoma xenografts. *J. Pediatr. Surg.* **48**, 39–46 (2013).
26. X. Kuang *et al.*, Propranolol enhanced the anti-tumor effect of sunitinib by inhibiting proliferation and inducing G0/G1/S phase arrest in malignant melanoma. *Oncotarget* **9**, 802–811 (2017).
27. E. Monzani, R. Bazzotti, C. Perego, C. A. M. La Porta, AQP1 is not only a water channel: It contributes to cell migration through Lin7/beta-catenin. *PLoS One* **4**, e6167 (2009).
28. J. Wang *et al.*, Aquaporins as diagnostic and therapeutic targets in cancer: How far we are? *J. Transl. Med.* **13**, 96 (2015).
29. J. Hu, A. S. Verkman, Increased migration and metastatic potential of tumor cells expressing aquaporin water channels. *FASEB J.* **20**, 1892–1894 (2006).
30. Y. Tomita *et al.*, Role of aquaporin 1 signalling in cancer development and progression. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, 299 (2017).
31. S. Miyazaki *et al.*, Anti-VEGF antibody therapy induces tumor hypoxia and stanniocalcin 2 expression and potentiates growth of human colon cancer xenografts. *Int. J. Cancer* **135**, 295–307 (2014).
32. A. Rapisarda *et al.*, Increased antitumor activity of bevacizumab in combination with hypoxia inducible factor-1 inhibition. *Mol. Cancer Ther.* **8**, 1867–1877 (2009).
33. A. McIntyre *et al.*, Carbonic anhydrase IX promotes tumor growth and necrosis in vivo and inhibition enhances anti-VEGF therapy. *Clin. Cancer Res.* **18**, 3100–3111 (2012).
34. R. Kuang *et al.*, GLUT3 upregulation promotes metabolic reprogramming associated with antiangiogenic therapy resistance. *JCI Insight* **2**, e88815 (2017).
35. J. G. Baker, I. P. Hall, S. J. Hill, Agonist and inverse agonist actions of beta-blockers at the human beta 2-adrenoceptor provide evidence for agonist-directed signaling. *Mol. Pharmacol.* **64**, 1357–1369 (2003).
36. P. Chidiac, T. E. Hebert, M. Valiquette, M. Dennis, M. Bouvier, Inverse agonist activity of beta-adrenergic antagonists. *Mol. Pharmacol.* **45**, 490–499 (1994).
37. G. Khilnani, A. K. Khilnani, Inverse agonism and its therapeutic significance. *Indian J. Pharmacol.* **43**, 492–501 (2011).
38. F. Moisan *et al.*, Critical role of Aquaporin-1 and telocytes in infantile hemangioma response to propranolol. ProteomeXchange Consortium. <http://www.ebi.ac.uk/pride/archive/projects/PXD021457>. Deposited 25 January 2021.
39. R. E. Day *et al.*, Human aquaporins: Regulators of transcellular water flow. *Biochim. Biophys. Acta* **1840**, 1492–1506 (2014).
40. M. Boury-Jamot *et al.*, "Skin aquaporins: Function in hydration, wound healing, and skin epidermis homeostasis" in *Aquaporins. Handbook of Experimental Pharmacology*, E. Beitz, Ed. (Springer, Berlin, Heidelberg, 2009), 190, https://doi.org/10.1007/978-3-540-79885-9_10.
41. Z. Wu *et al.*, RNAi-mediated silencing of AQP1 expression inhibited the proliferation, invasion and tumorigenesis of osteosarcoma cells. *Cancer Biol. Ther.* **16**, 1332–1340 (2015).
42. R. C. Huebert *et al.*, Aquaporin-1 promotes angiogenesis, fibrosis, and portal hypertension through mechanisms dependent on osmotically sensitive microRNAs. *Am. J. Pathol.* **179**, 1851–1860 (2011).
43. C. Esteva-Font, B.-J. Jin, A. S. Verkman, Aquaporin-1 gene deletion reduces breast tumor growth and lung metastasis in tumor-producing MMTV-PyVT mice. *FASEB J.* **28**, 1446–1453 (2014).
44. Y. Hayashi, N. A. Edwards, M. A. Proescholdt, E. H. Oldfield, M. J. Merrill, Regulation and function of aquaporin-1 in glioma cells. *Neoplasia* **9**, 777–787 (2007).
45. F. D. Martinez, P. E. Graves, M. Baldini, S. Solomon, R. Erickson, Association between genetic polymorphisms of the beta2-adrenoceptor and response to albuterol in children with and without a history of wheezing. *J. Clin. Invest.* **100**, 3184–3188 (1997).
46. P. Deb *et al.*, Correlation of expression pattern of aquaporin-1 in primary central nervous system tumors with tumor type, grade, proliferation, microvessel density, contrast-enhancement and perilesional edema. *J. Cancer Res. Ther.* **8**, 571–577 (2012).
47. D. Szklarczyk *et al.*, STRING v10: Protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life. *Nucleic Acids Res.* **43**, D447–D452 (2015).
48. P. E. North, M. Waner, A. Mizeracki, M. C. Mihm, Jr, GLUT1: A newly discovered immunohistochemical marker for juvenile hemangiomas. *Hum. Pathol.* **31**, 11–22 (2000).
49. L. M. Popescu, M.-S. Fausone-Pellegrini, TELOCYTES—A case of serendipity: The winding way from interstitial cells of cajal (ICC), via interstitial cajal-like cells (ICLC) to TELOCYTES. *J. Cell. Mol. Med.* **14**, 729–740 (2010).
50. L. Ceafalan, M. Gherghiceanu, L. M. Popescu, O. Simionescu, Telocytes in human skin—Are they involved in skin regeneration? *J. Cell. Mol. Med.* **16**, 1405–1420 (2012).
51. M. Manetti *et al.*, Evidence for progressive reduction and loss of telocytes in the dermal cellular network of systemic sclerosis. *J. Cell. Mol. Med.* **17**, 482–496 (2013).
52. M. C. Rusu *et al.*, Skin telocytes. *Ann. Anat.* **194**, 359–367 (2012).
53. T. Itinteang *et al.*, Mast cells in infantile haemangioma possess a primitive myeloid phenotype. *J. Clin. Pathol.* **66**, 597–600 (2013).
54. S. Prey *et al.*, Mast cells as possible targets of propranolol therapy: An immunohistological study of beta-adrenergic receptors in infantile haemangiomas. *Histopathology* **65**, 436–439 (2014).
55. S. Nagamatsu, H. Sawa, A. Wakizaka, T. Hoshino, Expression of facilitative glucose transporter isoforms in human brain tumors. *J. Neurochem.* **61**, 2048–2053 (1993).
56. D. Dolman, S. Drndarski, N. J. Abbott, M. Rattray, Induction of aquaporin 1 but not aquaporin 4 messenger RNA in rat primary brain microvessel endothelial cells in culture. *J. Neurochem.* **93**, 825–833 (2005).
57. J. M. Markert *et al.*, Differential gene expression profiling in human brain tumors. *Physiol. Genomics* **5**, 21–33 (2001).
58. K. Oshio *et al.*, Expression of the aquaporin-1 water channel in human glial tumors. *Neurosurgery* **56**, 375–381, discussion 375–381 (2005).
59. W. Meng *et al.*, Hypoxia-induced up-regulation of aquaporin-1 in rat schwann cells via the MAPK pathway. *Int. J. Clin. Exp. Med.* **10**, 9271–9276 (2017).
60. C. J. Kleber *et al.*, Urinary matrix metalloproteinases-2/9 in healthy infants and haemangioma patients prior to and during propranolol therapy. *Eur. J. Pediatr.* **171**, 941–946 (2012).
61. J. Steinberg *et al.*, Integrative epigenomics, transcriptomics and proteomics of patient chondrocytes reveal genes and pathways involved in osteoarthritis. *Sci. Rep.* **7**, 8935 (2017).
62. N. Bonnet *et al.*, Dose effects of propranolol on cancellous and cortical bone in ovariectomized adult rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **318**, 1118–1127 (2006).
63. W. F. Rodrigues *et al.*, Low dose of propranolol down-modulates bone resorption by inhibiting inflammation and osteoclast differentiation. *Br. J. Pharmacol.* **165**, 2140–2151 (2012).
64. Y. Z. Chen *et al.*, Propranolol inhibits the proliferation, migration and tube formation of hemangioma cells through HIF-1 α dependent mechanisms. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **50**, e6138 (2017).
65. X. Liao *et al.*, The β -adrenoceptor antagonist, propranolol, induces human gastric cancer cell apoptosis and cell cycle arrest via inhibiting nuclear factor κ B signaling. *Oncol. Rep.* **24**, 1669–1676 (2010).
66. F. Hajjghasemi, A. Mirshafiey, In vitro sensitivity of leukemia cells to propranolol. *J. Clin. Med. Res.* **1**, 144–149 (2009).
67. W.-J. Wei, C.-T. Shen, H.-J. Song, Z.-L. Qiu, Q.-Y. Luo, Propranolol sensitizes thyroid cancer cells to cytotoxic effect of vemurafenib. *Oncol. Rep.* **36**, 1576–1584 (2016).
68. N. C. O. Munabi *et al.*, Propranolol targets hemangioma stem cells via cAMP and mitogen-activated protein kinase regulation. *Stem Cells Transl. Med.* **5**, 45–55 (2016).
69. D. C. Alcobia *et al.*, Visualizing Ligand binding to a GPCR in vivo using NanoBRET. *iScience* **6**, 280–288 (2018).
70. Y. Ogushi, D. Kitagawa, T. Hasegawa, M. Suzuki, S. Tanaka, Correlation between aquaporin and water permeability in response to vasotocin, hydrin and beta-adrenergic effectors in the ventral pelvic skin of the tree frog *Hyla japonica*. *J. Exp. Biol.* **213**, 288–294 (2010).
71. K. Rump *et al.*, Aquaporin 1 and 5 expression evoked by the β 2 adrenoceptor agonist terbutaline and lipopolysaccharide in mice and in the human monocytic cell line THP-1 is differentially regulated. *Shock* **40**, 430–436 (2013).
72. C. Uhlig *et al.*, The effects of salbutamol on epithelial ion channels depend on the etiology of acute respiratory distress syndrome but not the route of administration. *Respir. Res.* **15**, 56 (2014).
73. K. Kaneko *et al.*, Aquaporin 1 is required for hypoxia-inducible angiogenesis in human retinal vascular endothelial cells. *Microvasc. Res.* **75**, 297–301 (2008).
74. N. Mirancea, A.-M. Moroşanu, G.-V. Mirancea, F. D. Juravle, V. S. Mănoiu, Infrastructure of the telocytes from tumor stroma in the skin basal and squamous cell carcinomas. *Rom. J. Morphol. Embryol.* **54**, 1025–1037 (2013).
75. C. G. Manole, M. Gherghiceanu, O. Simionescu, Telocyte dynamics in psoriasis. *J. Cell. Mol. Med.* **19**, 1504–1519 (2015).
76. J. Yang, Y. Li, F. Xue, W. Liu, S. Zhang, Exosomes derived from cardiac telocytes exert positive effects on endothelial cells. *Am. J. Transl. Res.* **9**, 5375–5387 (2017).
77. M. Allen, M. Bjerke, H. Edlund, S. Nelander, B. Westermark, Origin of the U87MG glioma cell line: Good news and bad news. *Sci. Transl. Med.* **8**, 354re3 (2016).



Supplementary Information for

Critical role of Aquaporin-1 and telocytes in infantile hemangioma response to propranolol beta-blockade

François Moisan^{1,*}, Sandra Oucherif¹, Priscilla Kaulanjan-Checkmodine¹, Sorilla Prey^{1,2}, Benoît Rousseau³, Marc Bonneau⁴, Stéphane Claverol⁴, Etienne Gontier⁵, Sabrina Lacomme⁵, Lea Dousset^{1,2}, Thierry Couffinhal⁶, Jerome Toutain⁷, Maya Loot⁸, Muriel Cario-André^{1,9}, Marie-Laure Jullié¹⁰, Christine Léauté-Labrèze^{1,2,9}, Alain Taieb^{1,2,9}, Hamid Reza Rezvani^{1,2,9}

François Moisan

Email: francois.moisan@u-bordeaux.fr

Supplementary Information

Methods:

RNA isolation and real-time reverse transcription PCR

RNA was isolated from sub-confluent growing cells using the NucleoSpin® RNA kit (MACHEREY-NAGEL, Germany) and 0.5 µg RNA was used for first-strand cDNA synthesis by using PrimeScript™ RT Master Mix (Takara, Japan) according to the manufacturer's protocols. 10x diluted cDNA was prepared and the final 20 µl reaction mixture included 300 nM of each primer and 1x Brilliant III Ultra-Fast SYBR® Green QPCR Master Mix (Agilent, USA). Initial denaturation for all PCR reactions was 3 min at 95 °C, followed by 40 cycles of PCR amplification (95 °C for 5 sec and 60 °C for 5 sec) using the CFX96 Real-Time PCR Detection System instrument (Bio-Rad, USA). The PCR product obtained by specific primers for glucuronidase beta (GUSB) was used as a reference gene to control for loading. Amplification efficiencies were determined by serial dilutions, and all reactions were performed in triplicate. Melt curves were performed after each run to confirm the primer pair specificity.

Lentivirus generation and establishment of GFP⁺ cells

The lentiviral vectors pGIPZ (TurboGFP and shRNA are part of a bicistronic transcript allowing the visual marking of shRNA-expressing cells) targeting ADRB2 or AQP1 and the non-silencing control were acquired from Thermo Fisher, USA. AQP1 overexpression was achieved by lentiviral transduction of 217EX-A4384-Lv230 ORF expression clone for AQP1 (NM_198098.3) and 217EX-NEG-Lv230 Empty control vector for pReceiver-Lv230 respectively called pAQP1 and P0 in the paper, acquired from Genecopoeia, MD, USA. Lentiviral particles expressing GFP were prepared using 293T cells plated in 175 cm² flasks. Twenty-four hours after seeding, near-confluent cells were co-transfected with 45 µg pHR2-GLF lentiviral vector together with pCMVΔR8.74 packaging and VSV-G-expressing vectors

(3:2:1 ratio) in the presence of 25 μ M chloroquine (Sigma-Aldrich, USA). The medium was changed after 8–12 h and then collected at 24–36 h, filtered through a 0.45 μ m polyethersulfone filter, and ultracentrifuged for 2 h at 20,000 rpm at 4 °C. The viral pellet was resuspended in plain IMDM medium (Invitrogen, USA) and frozen at -80 °C. The viral titer was determined by infection of 293T cells with several dilutions of the virus and analysis of GFP+ cells by flow cytometry 36 h later. U87-MG cells were transduced with lentivirus. After 16–24 h incubation with virus, the medium changed. Transduced cells were selected with 1 μ g/mL of puromycin for 5 days. GFP+ cells were sorted and purified by flow cytometry.

Protein extraction and western blotting

Cell pellets were resuspended in a lysis buffer RIPA [Tris-HCl, pH 8, 50 mM; NaCl 150 mM; sodium dodecyl sulfate 0.1%; NP40 1%; sodium deoxycholate 0.5%; protease inhibitors cocktail (Sigma)]. After 30 min on ice, the samples were centrifuged for 15 min at 15 000g. The supernatants containing soluble proteins were analyzed by western blotting: 30 micrograms of proteins were separated by 10% sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis and transferred onto polyvinylidene difluoride membranes (Millipore), using a mini-blot wet transfer (Bior-Rad). Membranes were then blocked for 1 h in 5% skim milk in Tris-buffered saline-T (Tris–HCl, pH 7.5, 100 mM, NaCl 0.9%, Tween-20 0.05%) and incubated overnight at 4°C with primary antibody (Table S3) diluted at the appropriate concentration in blocking solution. Blots were washed three times in Tris-buffered saline-T, and then incubated for 1 h with peroxidase-conjugated secondary antibody (Table S3). After washes, signals were detected using chemiluminescence reagent (Bio-Rad).

Proteomic analysis

Proteomic analysis was performed as previously explained (1, 2).

Sample preparation and protein digestion

Samples were solubilized in Laemmli buffer and were deposited in triplicate onto SDS-PAGE. Separation was stopped once proteins had entered the resolving gel. After colloidal blue staining, bands were cut out from the SDS-PAGE gel and subsequently cut into 1 mm x 1 mm gel pieces. Gel pieces were destained in 25 mM ammonium bicarbonate 50% ACN, rinsed twice in ultrapure water and shrunk in ACN for 10 min. After removal of ACN, gel pieces were dried at room temperature, covered with the trypsin solution (10 ng/ μ l in 50 mM NH_4HCO_3), rehydrated at 4 °C for 10 min, and finally incubated overnight at 37 °C. Spots were then incubated for 15 min in 50 mM NH_4HCO_3 at room temperature with rotary shaking. The supernatant was collected, and an $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}/\text{HCOOH}$ (47.5:47.5:5) extraction solution was added onto gel slices for 15 min. The extraction step was repeated twice. Supernatants were pooled, dried in a vacuum centrifuge, and resuspended in 25 μ l of formic acid (5%, v/v) so as to inject about 500 ng.

nLC-MS/MS analysis

Peptide mixture was analysed on a Ultimate 3000 nanoLC system (Dionex, Amsterdam, The Netherlands) coupled to an Electrospray Q-Exactive quadrupole Orbitrap benchtop mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA). Ten microliters of peptide digests were loaded onto a 300- μ m-inner diameter x 5-mm C18 PepMapTM trap column (LC Packings) at a flow rate of 30 μ L/min. The peptides were eluted from the trap column onto an analytical 75-mm id x 25-cm C18 Pep-Map column (LC Packings) with a 4–40% linear gradient of solvent B in 108 min (solvent A was 0.1% formic acid in 5% ACN, and solvent B was 0.1% formic acid in 80% ACN). The separation flow rate was set at 300 nL/min. The mass spectrometer

operated in positive ion mode at a 1.8-kV needle voltage. Data were acquired using Xcalibur 2.2 software in a data-dependent mode. MS scans (m/z 300-2000) were recorded at a resolution of $R = 70\,000$ (@ m/z 200) and an AGC target of 1×10^6 ions was collected within 100 ms. Dynamic exclusion was set to 30 s and the top 15 ions were selected from fragmentation in HCD mode. MS/MS scans with a target value of 1×10^5 ions were collected with a maximum fill time of 120 ms and a resolution of $R = 35000$. Additionally, only +2 and +3 charged ions were selected for fragmentation. Other settings were as follows: neither sheath nor auxiliary gas flow heated capillary temperature, 260 °C; normalized HCD collision energy of 25% and an isolation width of 3 m/z .

Database search and results processing

Data were searched by SEQUEST through Proteome Discoverer 1.4 (Thermo Fisher Scientific Inc.) against a subset of the 2018.01 version of the UniProt database restricted to the Homo Sapiens Reference Proteome Set (71,536 entries). Spectra from peptides higher than 5000 Da or lower than 350 Da were rejected. The search parameters were as follows: mass accuracy of the monoisotopic peptide precursor and peptide fragments were set to 10 ppm and 0.02 Da respectively. Only b- and y-ions were considered for mass calculation. Oxidation of methionines (+16 Da) and carbamidomethylation of cysteines (+57 Da) were considered as variable and fixed modifications, respectively. Two missed trypsin cleavages were allowed. Peptide validation was performed using the Percolator algorithm (3) and only “high confidence” peptides were retained corresponding to a 1% false positive rate at peptide level.

Label-Free Quantitative Data Analysis

Raw LC-MS/MS data were imported in Progenesis QI for Proteomics 2.0 (Nonlinear Dynamics Ltd, Newcastle, U.K). Data processing included the following steps: (i) Features detection, (ii) Features alignment across all samples, (iii) Volume integration for 2-6 charge-state ions, (iv) Normalization on feature median ratio, (v) Import of sequence information, (vi) Calculation of protein abundance (sum of the volume of corresponding peptides), (vii) A statistical test was performed and proteins were filtered based on $p\text{-value} < 0.05$. Only non-conflicting features and unique peptides were considered for calculation at protein level. Quantitative data were considered for proteins quantified by a minimum of 2 peptides.

The mass spectrometry proteomics data have been deposited to the ProteomeXchange Consortium via the PRIDE (4) partner repository with the dataset identifier PXD021457

Transmission electron microscopy (TEM)

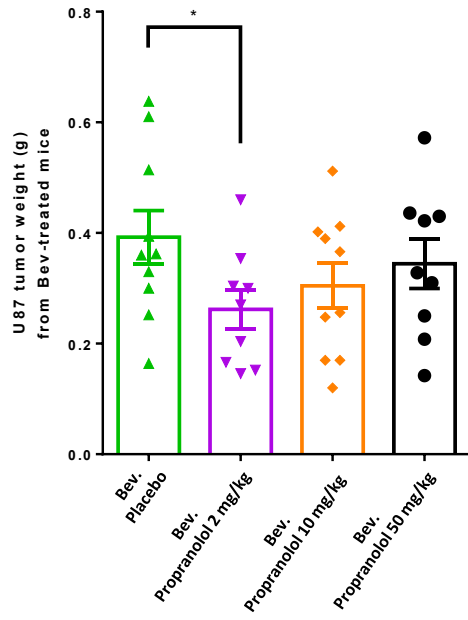
Human biopsies were fixed with 2.5 % (v/v) glutaraldehyde in 0.1M phosphate buffer (pH 7.4) for 1h at room temperature (RT). Then samples were washed in 0.1M phosphate buffer and post-fixed in 1% (v/v) osmium tetroxide in phosphate buffer 0.1 M for 2h in the dark at RT, then were washed in water and dehydrated through a series of graded ethanol and embedded in a mixture of pure ethanol and epoxy resin (Epon 812; Delta Microscopy, Toulouse, France) 50/50 (v/v) for 2 hours and then in 100% resin overnight at RT. Polymerization of the resin was carried out between 24-48 hours at 60 ° C.

Samples were then sectioned using a diamond knife (Diatome, Biel-Bienne, Switzerland) on an ultramicrotome (EM UC7, Leica Microsystems, Vienna, Austria). Ultrathin sections (65 nm) were picked up on copper grids and then stained with uranyl acetate and lead citrate. Grids were examined with a transmission electron microscope (H7650, Hitachi, Tokyo, Japan) at 80kV.

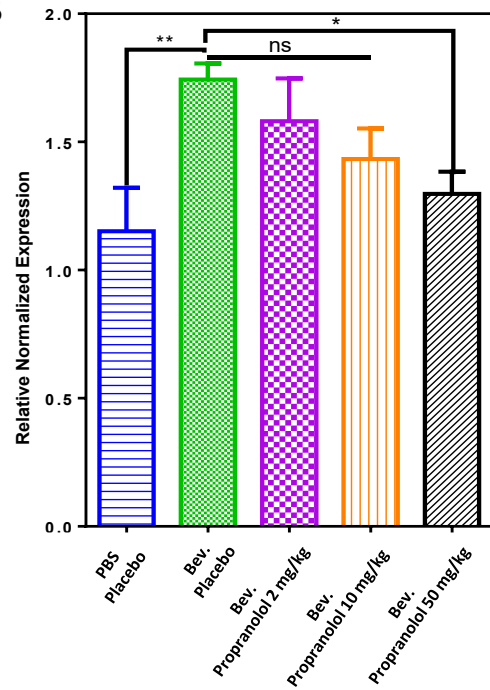
SI Figures:

Fig. S1.

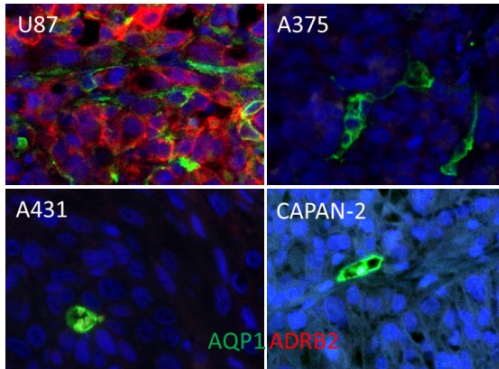
A



B



C



D

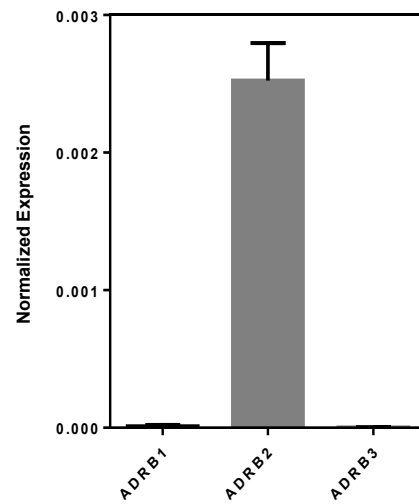
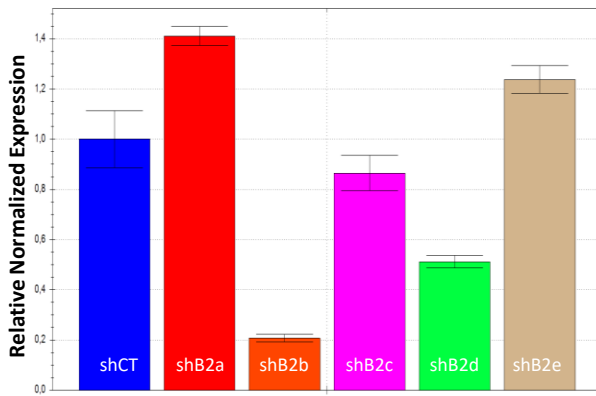


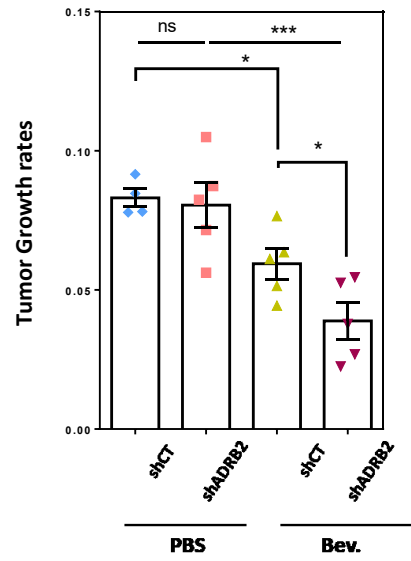
Fig. S1. Propranolol antitumor effect study *in vivo*. A. U87 tumor weight of Bev and non-Bev-treated mice co-treated with 2, 10 or 50 mg/kg of propranolol or placebo. * Bev-treated mice combined with 2 mg/kg of propranolol had significantly smaller tumors compared to (p=0,0464) Bev-treated mice with placebo. B. VEGF-A expression in U87 tumors measured by human specific qPCR. Bev-treated mice (Avastin) had higher tumor VEGF expression. Inhibitory dose-response was observed but did not correlate with tumor response. C. ADRB2 (red) and AQP1 (green) IHC staining of tumor xenograft from U87, A375, A431, CAPAN-2 human tumor cell lines. D. ADRB1, ADRB2 and ADRB3 expression in U87 cell line measured by qPCR. ADRB2 was the only ADRB gene significantly expressed. * P<0.05 ** P<0.005

Fig. S2.

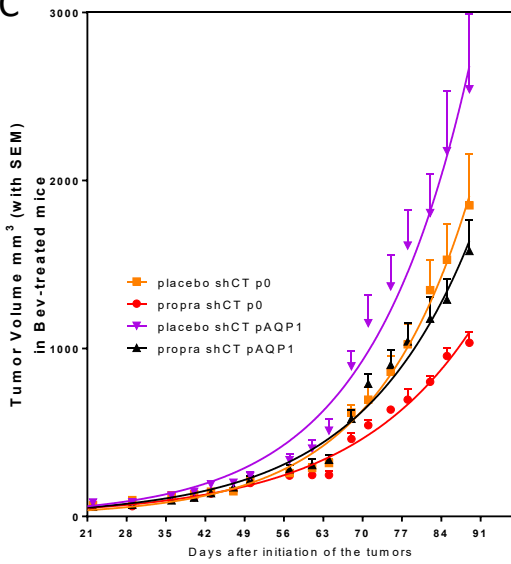
A



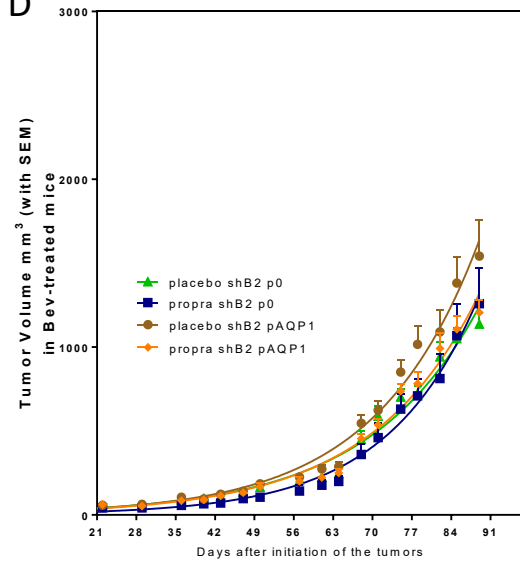
B



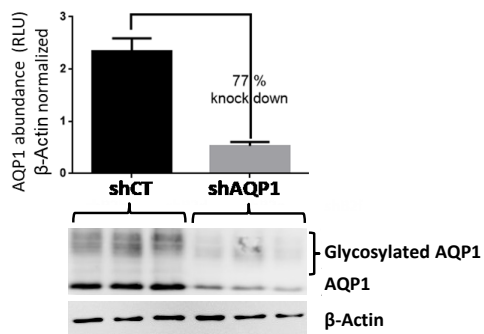
C



D



E



F

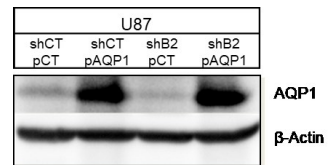


Fig. S2. Betaadrenergic pathway and AQP1 as a target of propranolol in U87 tumors. A. ADRB2 shRNAs efficiency measured by qPCR in U87 shRNA-lentivirus transduced cells. Among 5 different shADRB2, shADRB2b had a satisfactory 75% inhibition effect on ADRB2 mRNA level. B. U87shCT and shADRB2 tumors Specific Growth Rate (SGR) in non-Bev and Bev-treated mice was estimated according to the following equation: $SGR = \ln 2 / DT$, in which DT= doubling time. The higher the SGR is, the faster the tumors grow. Propranolol significantly inhibit tumor growth speed. * $P < 0.05$ ** $P < 0.005$ *** $P < 0.0005$. C. U87 shCT tumor growth with (pAQP1) or without (p0) AQP1 overexpression, in bev-treated mice co-treated with propranolol or placebo. D. U87 shADRB2 (shB2) tumor growth with (pAQP1) or without (p0) AQP1 overexpression, in bev-treated mice co-treated with propranolol or placebo. E. AQP1 protein RLU quantification normalized by beta-actin show efficient downregulation of AQP1 using shRNA lentiviral vector. AQP1 knockdown is measured by Western-blot on 3 on different extracted U87 tumors from each group (shCT and shAQP1). F. AQP1 overexpression in U87 cells using pAQP1 lentiviral construct or pCT as a control, evidenced by western-blot.

Fig. S3.

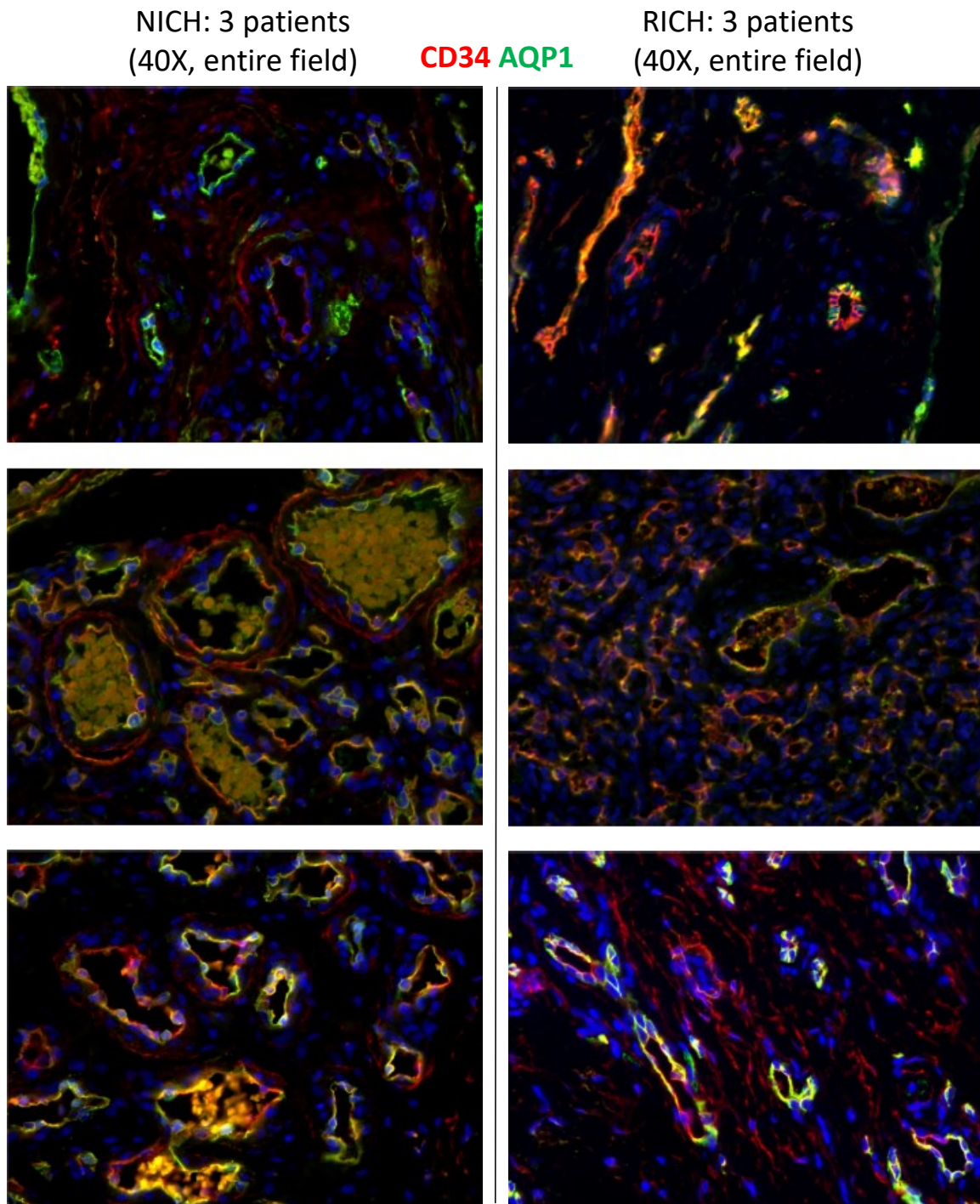


Fig. S3. AQP1/CD34 co-staining by IHF of NICH from 3 patients and RICH from 3 patients (NICH: Non-Involuting Hemangioma; RICH: Rapidly Involuting Hemangioma). Merged image of CD34 (red), AQP1 (green) and DAPI. Lesional ECs are AQP1-positive. Magnification 40X, entire field.

Fig. S4.

PICH: 6 patients
CD34 AQP1

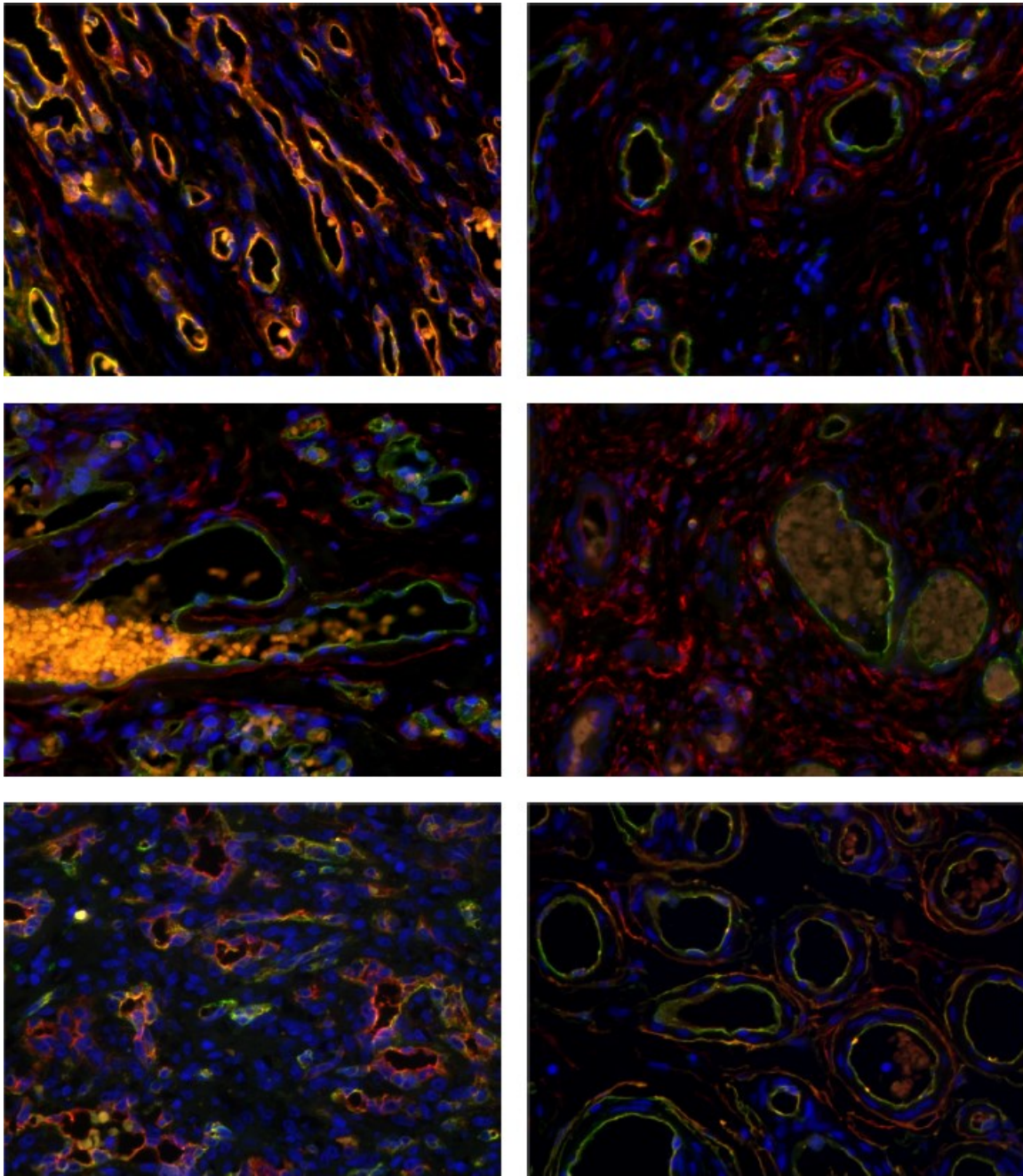


Fig. S4. AQP1/CD34 co-staining by IHF of PICH from 6 patients (PICH: Partially Involutive Congenital Hemangioma) Merged image of CD34 (red), AQP1 (green) and DAPI. Lesional ECs are AQP1-positive. Magnification 40X, entire field.

Fig. S5.

IH: 9 patients

CD34 AQP1

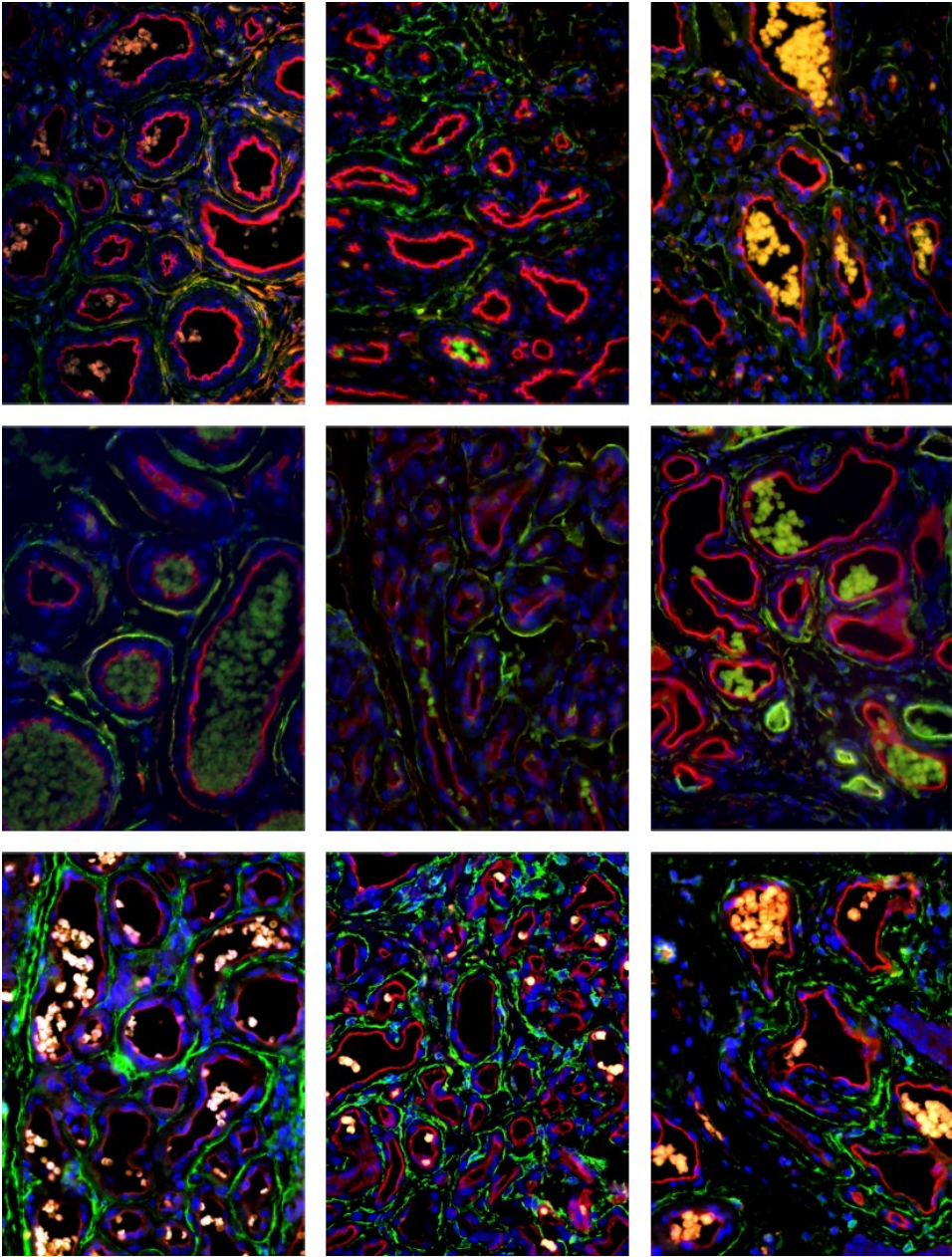
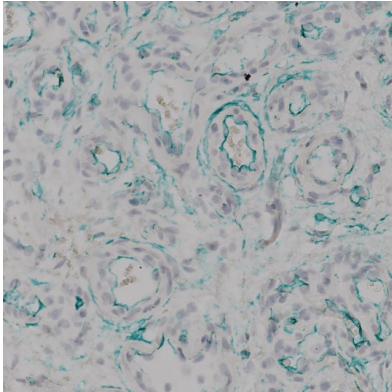


Fig. S5. AQP1/CD34 co-staining by IHF of IH from 9 patients. Merged image of CD34 (red), AQP1 (green) and DAPI. Lesional vessels of IH show a unique AQP1 profile. Magnification 40X.

Fig. S6.

A IHC staining



CD34 Histogreen

B IHF staining

CD34 AQP1 DAPI

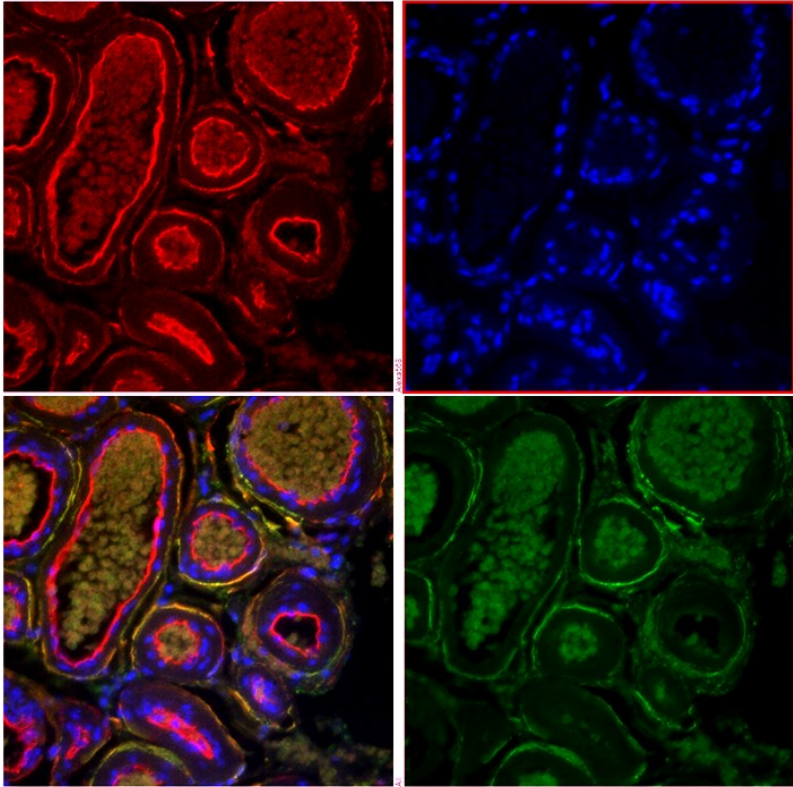


Fig. S6. CD34 positive cells in IH. A. CD34 Histogreen IHC staining. B. IHC staining with side-by-side, single label for each marker and the merged image of CD34 (red), AQP1 (green) and DAPI, a CD34⁺ railway staining is observed with the inner layer being endothelial cells AQP1⁻ and the outer layer being telocytes AQP1⁺.

Fig. S7.

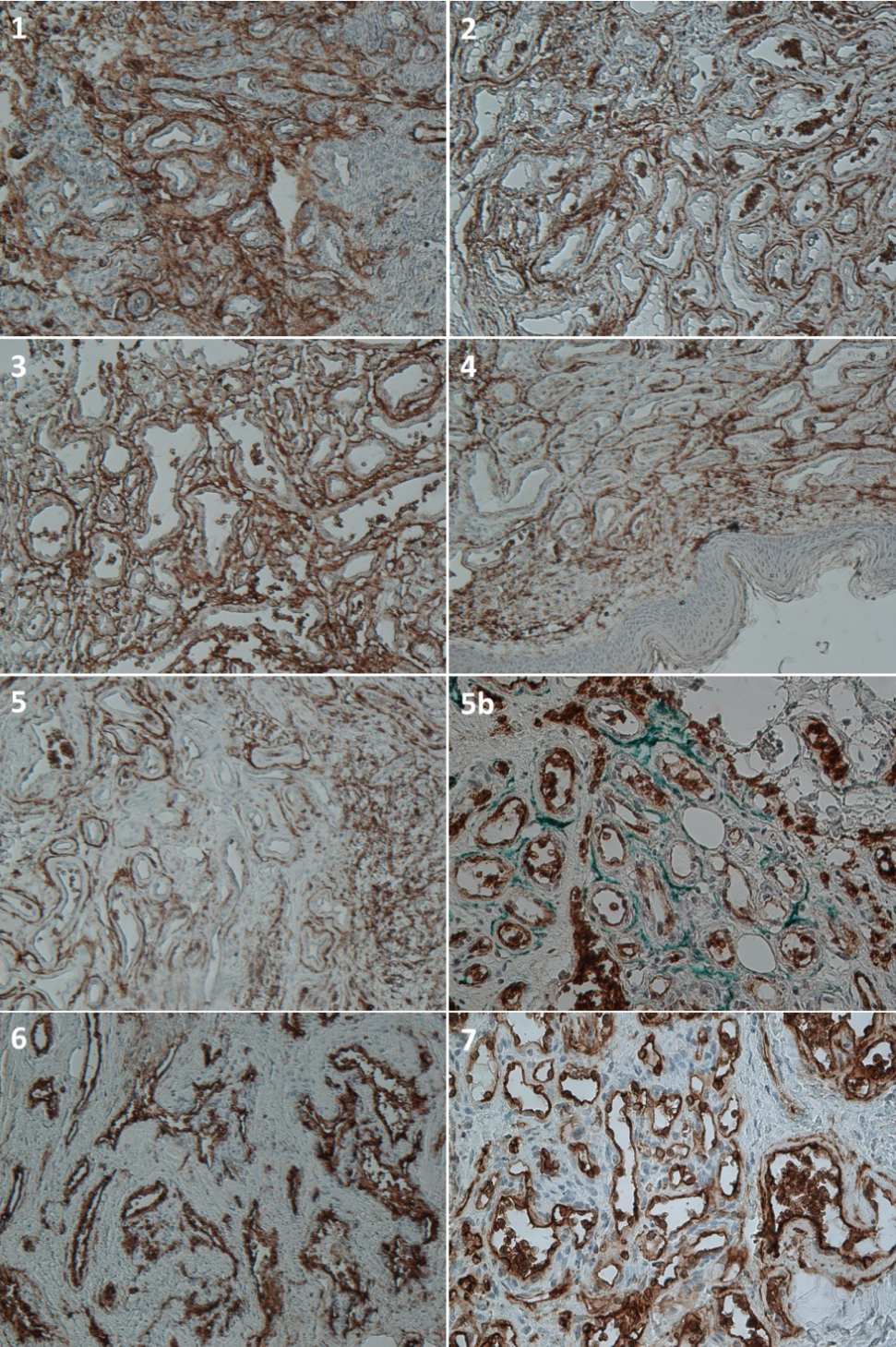


Fig. S7. DAB IHC of AQP1 and blue counterstained nuclei with hematoxylin. 1 to 5 are AQP1 staining of IH patients 1 to 5 respectively, magnification 20X. 5b is IH patient 5 with GLUT1 in DAB (brown) and AQP1 in Histogreen 6 and 7 are NICH patients 1 and 2. (Magnification 40X, entire fields).

Fig. S8.

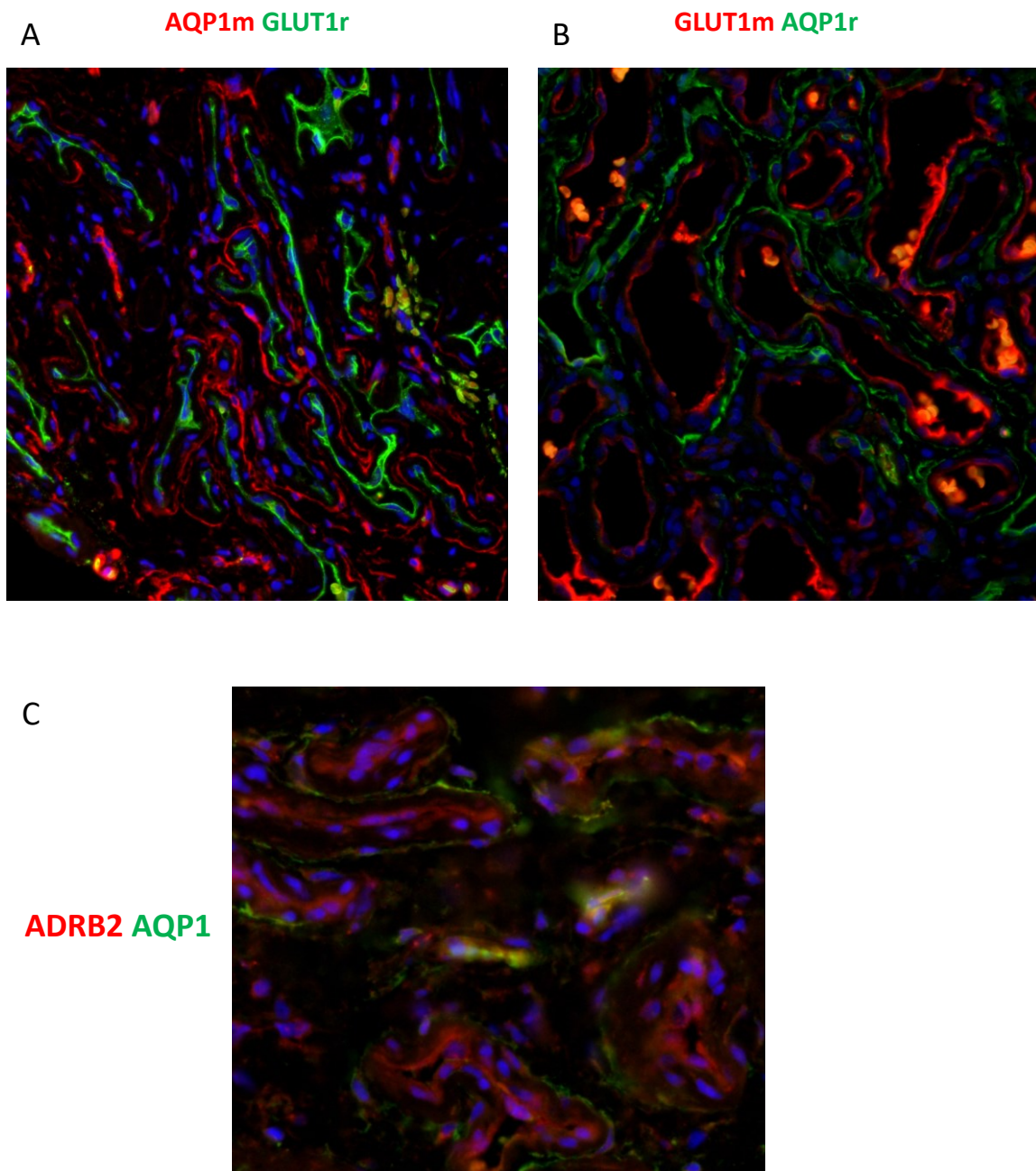


Fig. S8. IHF of IH with AQP1, GLUT1 or ADRB2 stainings A. AQP1 mouse monoclonal antibody (red) and GLUT1 rabbit polyclonal (green) compared to B. staining with AQP1 rabbit polyclonal antibody (green) and GLUT1 mouse monoclonal (red) rabbit (green). Staining and specificity of antibodies were validated. C. ADRB2 (red) AQP1 (green) co-staining. Magnification 40X.

Fig. S9.

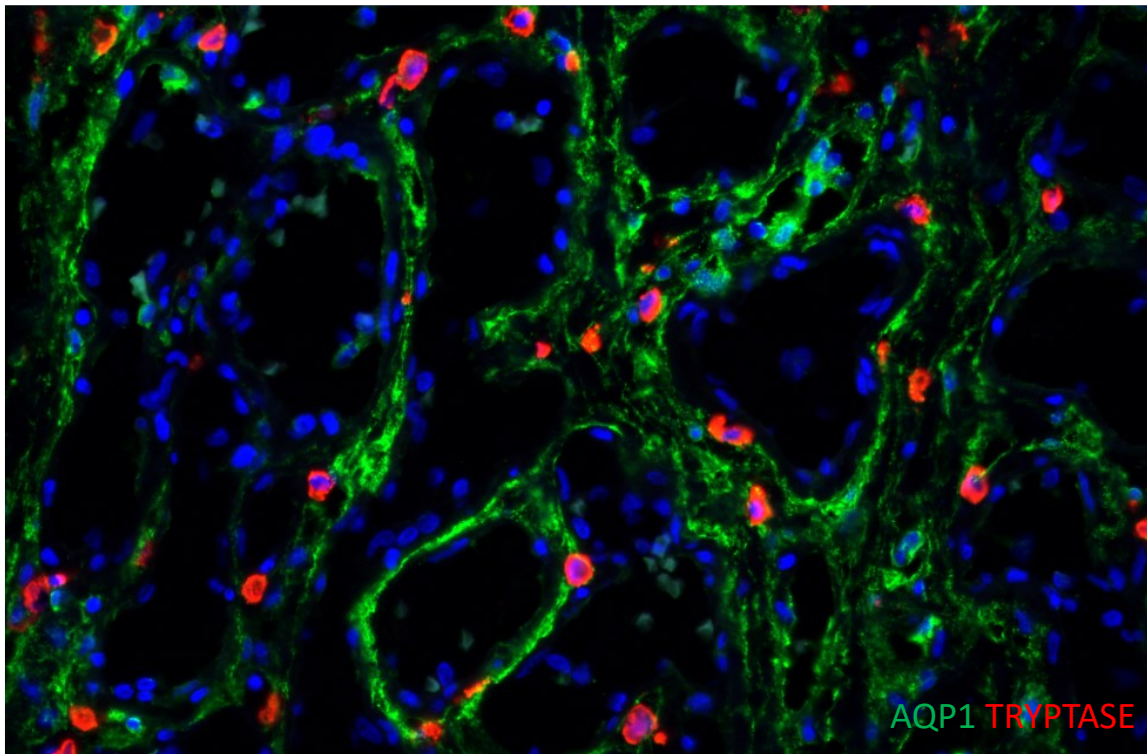


Fig. S9. Mast cells are in close contact with telocytes. Tryptase-positive mast cells (in red) are in direct contact with AQP1-positive telocytes (green). (Magnification 40X, entire fields).

Fig. S10.

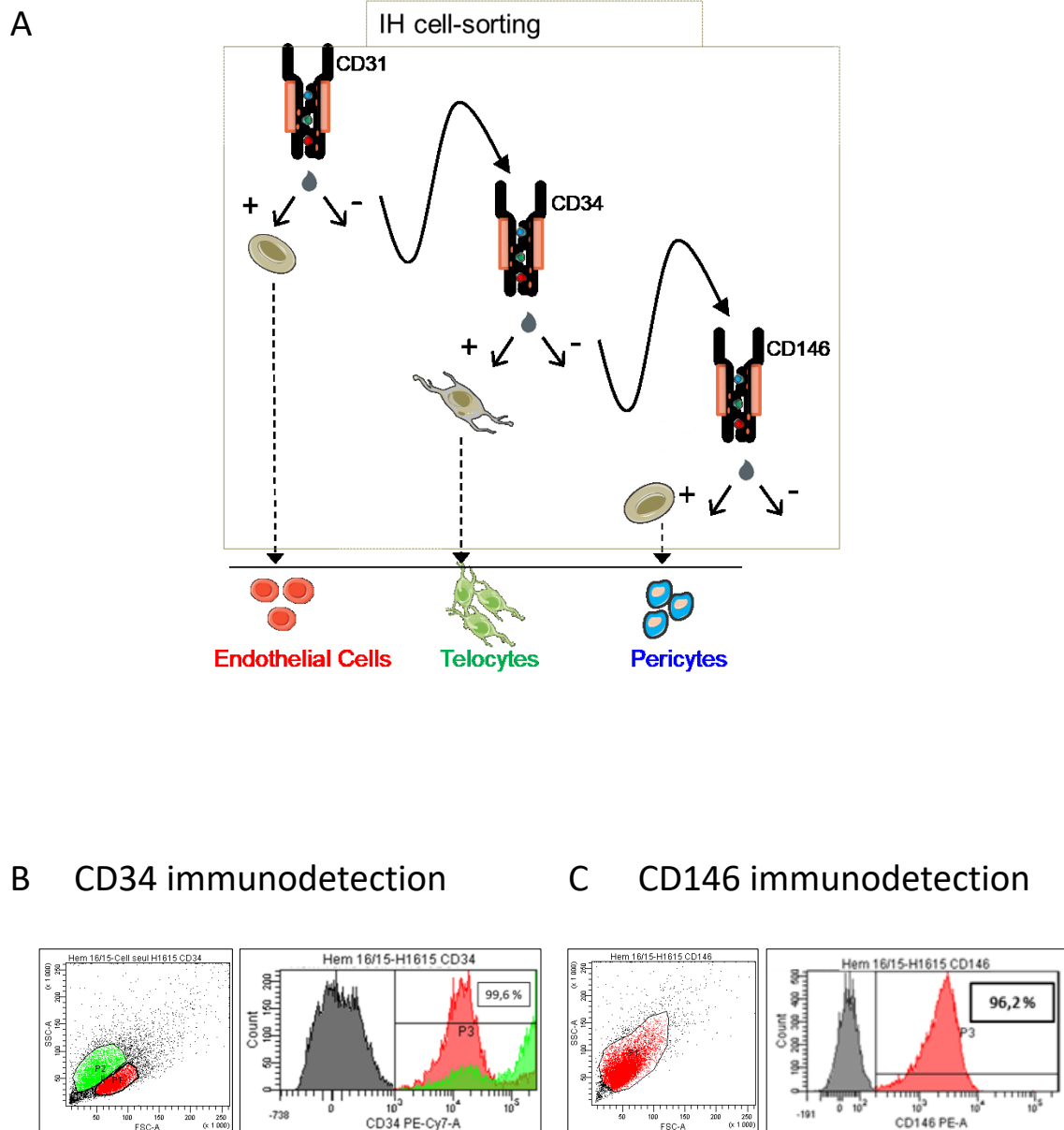


Fig. S10. IH fresh tissue cell sorting for in vitro culture, labelling and assays. A. Sequential cell sorting with magnetic bead coupled antibodies directed to CD31, CD34, CD146. B. Cytometry quality control for CD34+ cells, example of a single CD34 cell sorting from IH tissue. Here, CD34 sorting was done before CD31, so two CD34+ populations were identified. Then CD31 sorting was always done before CD34 sorting, in order to separate EC before TC sorting. C. Cytometry quality control for CD146+ cells (pericytes fraction).

Fig. S11.

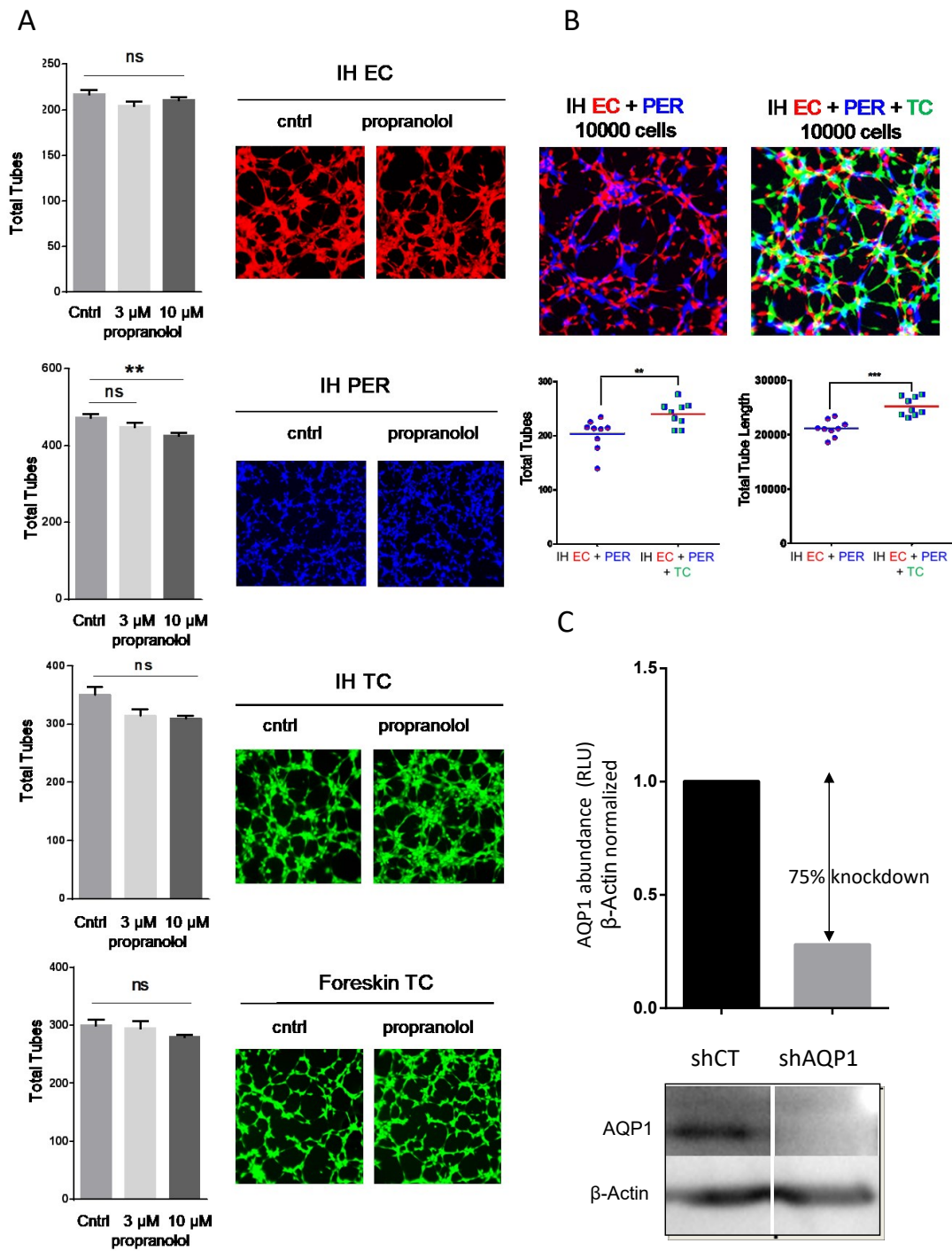


Fig. S11. Separated cell-type tubulogenesis assay and shAQP1 efficiency in IH-TC. A. Propranolol has no major effect on tubulogenic properties of IH-EC, IH-PER and IH-TC in vitro. IH cells were labeled with three different fluorescent dyes, EC in red, TC in green, PER in blue. When IH-EC, IH-PER and IH-TC cells were used separately in tubulogenesis assay, no major effect of propranolol on tubulogenic properties of each of the 3 IH-cells or control foreskin-TC were found. B. shAQP1 efficiency in IH-TC by western-blot on protein extracted from transduced IH-TC using shCT and shAQP1. AQP1 protein RLU quantification normalized by beta-actin show efficient knockdown of AQP1 using shAQP1 lentiviral vector compared to shCT.

Table S1. Proteins differentially expressed between xenografts treated with Bev vs PBS as well as the combination of Bev and propranolol vs Bev alone.

Protein name	Bev vs PBS				(Bev+Propranolol) vs (Bev+Placebo)			
	Peptides used for quantitation	Confidence score	Anova (p)	Fold Change	Peptides used for quantitation	Confidence score	Anova (p)	Fold Change
Retinoic acid receptor responder protein 2 (RARRES2)	2	6.05	4.35E-02	34.49	2	6.05	8.60E-01	-2.17
Immunoglobulin kappa constant (IGKC)	7	40.97	4.31E-02	7.83	7	40.97	1.39E-01	2.17
Amine oxidase [flavin-containing] B (MAOB)	2	5.93	8.10E-02	4.38	2	5.93	2.05E-02	-14.29
C-type lectin domain family 11 member A (CLEC11A)	4	11.44	4.00E-03	3.69	4	11.44	8.39E-02	-1.89
Immunoglobulin heavy constant gamma 1 (IGHG1)	6	44.61	8.79E-03	3.57	6	44.61	1.70E-01	1.60
Adenylosuccinate synthetase isozyme 1 (ADSSL1)	3	12.29	3.17E-02	3.17	3	12.29	6.24E-01	-1.27
Aquaporin-1 (AQP1)	4	20.13	4.86E-02	3.04	4	20.13	9.41E-03	-2.33
Collagen alpha-1(I) chain (COL1A1)	8	31.85	2.73E-02	3.02	8	31.85	4.76E-02	-2.04
Stromelysin-2 (MMP10)	3	7.39	2.45E-02	2.45	3	7.39	4.04E-01	-1.12
Laminin subunit alpha-5 (LAMA5)	9	33.15	4.73E-02	2.37	9	33.15	9.49E-01	1.29
72 kDa type IV collagenase (MMP2)	7	20.39	1.10E-01	2.10	7	20.39	4.88E-02	-2.08
CDP-diacylglycerol-inositol 3-phosphatidyltransferase (CDIPT)	4	18.69	2.78E-01	2.07	4	18.69	4.78E-02	-3.13
Acetolactate synthase-like protein	2	6.46	2.91E-01	1.84	2	6.46	1.10E-02	-2.27
Carbonic anhydrase 9 (CA9)	4	13.61	3.48E-02	1.84	4	13.61	5.92E-01	-1.12
Sulfotransferase 1A4 (SULT1A4)	3	9.96	9.34E-01	1.52	3	9.96	4.39E-02	-10.00
Inosine triphosphate pyrophosphatase (ITPA)	5	15.22	3.35E-01	1.38	5	15.22	3.98E-02	-2.17
E3 ubiquitin/ISG15 ligase TRIM25 (TRIM25)	2	6.13	7.65E-01	1.04	2	6.13	3.00E-02	-2.27
Discoidin, CUB and LCCL domain-containing (DCBLD2)	2	5.29	7.17E-01	-1.04	2	5.29	4.39E-02	-2.86
UDP-N-acetylhexosamine pyrophosphorylase (UAP1)	2	9.77	9.66E-01	-1.04	2	9.77	4.58E-02	2.00
Protein FAM136A (FAM136A)	2	4.32	7.17E-01	-1.25	2	4.32	3.10E-03	2.56
Myosin-8 (MYH8)	4	252.28	2.43E-01	-1.39	4	252.28	3.10E-02	2.64
Hemoglobin subunit beta (HBB)	4	25.11	1.62E-01	-1.89	4	25.11	2.69E-02	3.47
Hemoglobin subunit alpha (HBA1)	7	24.48	1.49E-01	-1.89	7	24.48	3.26E-02	3.78
Small nuclear ribonucleoprotein F (SNRPF)	2	7.56	1.04E-02	-2.08	2	7.56	1.67E-01	1.37
Haptoglobin-related (HPR)	2	3.77	1.37E-02	-2.17	2	3.77	1.49E-01	-1.54
Zinc finger CCCH-type antiviral protein 1 (ZC3HAV1)	4	14.60	1.89E-02	-2.27	4	14.60	8.25E-01	-1.04
Sulfide:quinone oxidoreductase, mitochondrial (SQOR)	3	16.30	9.28E-02	-2.27	3	16.30	4.70E-02	2.40
Rab3 GTPase-activating protein non-catalytic subunit (RAB3GAP2)	2	7.04	1.84E-03	-2.38	2	7.04	4.12E-03	1.80
Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H3 (TIH3)	7	26.82	4.00E-02	-2.56	7	26.82	9.69E-02	-1.64
Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4 (TIH4)	7	16.98	2.39E-02	-2.56	7	16.98	2.33E-01	1.25
PDZ domain-containing protein GIPC1 (GIPC1)	2	6.65	2.84E-02	-3.03	2	6.65	4.22E-01	-1.39
Carnitine O-palmitoyltransferase 1 (CPT1A)	4	9.08	4.22E-02	-4.55	4	9.08	1.42E-01	2.18

Table S2. GLUT1 and AQP1 Lesional vascular profiles

	Age (years)	Lesional vascular profile			treated
		Endothelial Cells		Telocytes	
		GLUT1	AQP1	AQP1	
Congenital Hemangiomas NICH PICH RICH	<1	-	+	-	-
	5	-	+	-	-
	8	-	+	+/-	-
	<1	-	+	-	-
	<1	-	+	-	-
	1	-	+	+/-	-
	6	-	+	-	-
	12	-	+	+/-	-
	<1	-	+	-	-
	3	-	+	-	-
	3	-	+	-	-
	1	-	+	-	-
	1	-	+	-	-
9	-	+	+	-	
Infantile Hemangiomas	3	+	-	+	-
	7	+	-	+	-
	<1	+	-	+	-
	2	+	-	+	-
	3	+	-	+	-
	6	+	-	+	-
	1	+	-	+	-
	1	+	-	+	-
	5	+	-	+	-
	10	+	-	+	-
	3	+	-	+	-
	5	+	-	+	-
	8	+	-	+	-
	<1	+	-	+	-
	4	+	-	+	-
	6	+	-	+	-
	<1	+	-	+	-
	9	+	-	+	-
	<1	+	-	+	-
	5	+	-	+	-
	<1	+	-	+	timolol
	<1	+	-	+	timolol
	<1	+	-	+	timolol
	1	+	-	+	timolol
	1	+	-	+	timolol
	3	+	-	+	Propranolol
	<1	+	-	+	Propranolol
	<1	+	-	+	Propranolol
	2	+	-	+	Propranolol
	3	+	-	+	Propranolol
3	+	-	+	Propranolol	
9	+	-	+	Propranolol	
5	+	-	+	Propranolol	
2	+	-	+	Propranolol	
<1	+	-	+	Propranolol	
2	+	-	+	Propranolol	
Dermis		-	+	-	

Table S3. Antibodies

Antibody	Provider	Reference	IHF dilution	WB dilution
AQP1	Merck	AB2219	1/1000	1/500
AQP1	Santa Cruz Biotechnology	sc-25287	1/50	
CD34	Thermofisher	MA1-10202	1/500	
PDGFRa	Abcam	Ab61219	1/500	
c-kit	Santa Cruz Biotechnology	sc-393910	1/50	
vimentin	Dako	M0725	1/200	
α SMA	Abcam	ab7817	1/500	
GLUT-1	Merck	MABS132	1/500	
GLUT-1	Thermofisher	pa1-21041	1/100	
ADRB2	Abcam	ab61778	1/100	
ADRB2	Santa Cruz Biotechnology	sc-271322	1/50	
CAV-1	Santa Cruz Biotechnology	sc-53564	1/50	
Tryprase	Abcam	ab81703	1/2000	
CD68	Dako	M0876	1/100	
CD133	Merck	MAB4399-I	1/50	
CD168	Abcam	ab224768	1/100	
Ki-67	Vectorlabs	VP-K452	1/200	
VEGF-A	Abcam	ab1316	1/100	
β -Actin	Sigma-Aldrich	A2228		1/4000
Horse Anti-Mouse HRP	Vectorlabs	PI-2000		1/5000
Goat Anti-Rabbit HRP	Vectorlabs	PI-1000		1/2000
Goat Anti-Rabbit 488	Abcam	ab150077	1/500	
Goat Anti-Rabbit 555	Abcam	ab 150078	1/500	
Goat Anti-Mouse 488	Abcam	ab150113	1/500	
Goat Anti-Mouse 555	Abcam	ab150114	1/500	
Donkey Anti-Rabbit 568	Abcam	ab175470	1/500	
Donkey Anti-Mouse 568	Abcam	ab175472	1/500	

SI References

1. M. Hosseini, *et al.*, Premature Skin Aging Features Rescued by Inhibition of NADPH Oxidase Activity in XPC-Deficient Mice. *J. Invest. Dermatol.* **135**, 1108–1118 (2015).
2. M. Hosseini, *et al.*, Energy Metabolism Rewiring Precedes UVB-Induced Primary Skin Tumor Formation. *Cell Rep.* **23**, 3621–3634 (2018).
3. L. Käll, J. D. Canterbury, J. Weston, W. S. Noble, M. J. MacCoss, Semi-supervised learning for peptide identification from shotgun proteomics datasets. *Nat. Methods* **4**, 923–925 (2007).
4. Perez-Riverol Y, Csordas A, Bai J, Bernal-Llinares M, Hewapathirana S, Kundu DJ, Inuganti A, Griss J, Mayer G, Eisenacher M, Pérez E, Uszkoreit J, Pfeuffer J, Sachsenberg T, Yilmaz S, Tiwary S, Cox J, Audain E, Walzer M, Jarnuczak AF, Ternent T, Brazma A, Vizcaíno JA. The PRIDE database and related tools and resources in 2019: improving support for quantification data. *Nucleic Acids Res* **47**(D1):D442-D450 (2019).

PARTIE 2 : ROLE CRITIQUE DE LA NORADRENALINE ET DES TELOCYTES DANS L'ANGIOGENESE ET LA SENSIBILITE DE L'HEMANGIOME INFANTILE AU PROPRANOLOL

Article 2 : Sensitivity of infantile hemangioma to propranolol depends on presence of norepinephrine.

Article soumis dans Journal of Clinical Investigation (JCI).

Sensitivity of infantile hemangioma to propranolol depends on presence of norepinephrine

Sandra Oucherif^{#1}, Priscilla Kaulanjan-Checkmodine^{#1}, Sorilla Prey^{1,2}, Etienne Gontier³, Sabrina Lacomme³, Maya Loot⁴, Marijana Licina⁵, Muriel Cario^{1,6}, Christine Léauté-Labrèze^{1,2,6}, Alain Taieb^{1,2,6}, François Moisan^{1#*}, Hamid Reza Rezvani^{1,6#*}

1- Univ. Bordeaux, Inserm, BMGIC, UMR 1035, F-33076 Bordeaux, France

2- Service de Dermatologie Adulte et Pédiatrique, CHU de Bordeaux, F-33000 Bordeaux France

3- Bordeaux Imaging Center – Electron Microscopy unit, F-33076 Bordeaux, France

4- CHU de Bordeaux, Service de Chirurgie Pédiatrique, F-33000 Bordeaux, France

5- Faculté de médecine Département de Pathologie et Immunologie, CH-1211 Genève 4, Suisse

6- Centre de Référence pour les Maladies Rares de la Peau, CHU de Bordeaux, F-33000 Bordeaux, France

Contributed equally to this work.

*** Corresponding Authors and lead contacts**

Postal address: INSERM U1035, Bordeaux, F-33000 France

Email address: françois.moisan@u-bordeaux.fr, hamid-reza.rezvani@u-bordeaux.fr

Phone: +33-557-575-683 Fax: +33-557-571-374

Abstract

Infantile hemangioma (IH) is the most common infantile tumor, affecting 5-10% of newborns. Propranolol, a nonselective β -adrenergic receptor (ADRB) antagonist, is currently the first-line treatment for severe IH. However, both its mechanism of action and its main cellular target remain poorly understood. Since betablockers can antagonize the effect of natural ADRB agonists, we postulated that catecholamine produced in situ in IH may have a role in propranolol response. Quantifying catecholamines in IH tissues, we found a high amount of noradrenaline (NA) in untreated proliferative IH compared to involuted IH or propranolol-treated IH. We further found that the first three enzymes of the catecholamine biosynthesis pathway are expressed by IH cells and that their levels are reduced in propranolol-treated tumors. To study the role of NA in the pathophysiology of IH and the response to propranolol, we performed an in vitro angiogenesis assay in which IH-derived endothelial cells, pericytes and/or telocytes were incorporated. Results showed that total tube formation is sensitive to propranolol only when exogenous NA is added in the 3-cell model. We conclude that IH sensitivity to propranolol depends on crosstalk between endothelial cells, pericytes and telocytes in the context of a high local amount of local NA.

Introduction

Infantile hemangioma (IH), a benign vascular tumor, is the most common tumor in infants (1) affecting 5 to 10 % of newborns (2). It is characterized by a proliferative phase with rapid abnormal growth of blood vessels followed by a slow spontaneous involutive phase. Nevertheless, 15 % of cases require intervention depending on IH location in the event of a vital threat or functional risk (3). Following our serendipitous discovery (4) and confirmative clinical trial (5, 6) the non-selective beta-adrenergic receptor (ADRB) antagonist propranolol is currently the first-line therapy for severe/complicated IH. Other infantile capillary tumors such as rapidly involuting congenital hemangioma (RICH), non-involuting congenital hemangioma (NICH) and pyogenic granulomas do not respond to propranolol (3, 7). Although several mechanisms such as vasoconstriction, endothelial cell apoptosis, and/or altered angiogenesis (8, 9) have been proposed to account for the benefit of propranolol in IH, the precise mechanism of action of propranolol is still poorly understood. Identification of this mechanism may improve therapies based on betablockers and the development of more targeted drugs, not only for IH but also for cancer.

In this study, we postulated that competition between propranolol and catecholamines, the natural agonists of ADRB, might be the principal mechanism of action of propranolol. Of note, if catecholamines are known to play a role in the pathophysiology of neurological, psychiatric, metabolic and cardiovascular disorders, they are also thought to affect angiogenesis, notably during carcinogenesis (10). For instance, the activation of ADRB by noradrenaline (NA) in macrophages resulted in the abundant production of proangiogenic factors such as MMP-2, MMP-9 and VEGF (11, 12). NA-mediated activation of ADRB leads to the synthesis of interleukin-6 in ovarian tumor cell lines (10). Binding of NA on ADRB can affect tumor angiogenesis by triggering cAMP, PKA or NOTCH pathways (11, 13, 14). Propranolol has an inhibitory effect on these signaling pathways through direct binding to ADRB (8, 13, 15). Pan *et al.* showed that propranolol inhibits the NA-induced increase in cyclins A2 and D2, thereby affecting cell cycle progression and proliferation (11). Lastly, it has been shown that ADRB knockout impairs angiogenesis in mice and that ADRB inhibition reduces the expression of proangiogenic VEGF (16). Altogether, it makes sense to speculate that competition between propranolol and catecholamines in IH can affect cell proliferation and angiogenesis.

In this study, we show that NA is found in proliferative IH at pharmacological concentrations and that propranolol treatment and tumor involution are associated with lower levels of NA. Since there is no optimal animal model nor any IH cell lines to study the mechanism of action of propranolol, we isolated IH-derived endothelial cells, pericytes and telocytes (IH-EC, IH-

PER and IH-TC, respectively) to develop an *in vitro* IH model responsive to propranolol. Although IH-EC express ADRB1-2 (17) like normal dermal endothelial cells (17–22), whether they can synthesize catecholamines like their normal counterparts remains elusive (16). IH-PER, which surround EC in proliferating IH (23, 24), have been also shown to express ADRB1-2 (17, 25). TC, which are unique stromal cells present in normal dermis (TC skin) in the close vicinity of vascular structures, affect angiogenesis through auto- and paracrine signaling via their long thin typical prolongations named telopodes (26). Moreover, we recently showed that IH-TC, which express ADRB2, play a critical role in the pathophysiology of IH (27). Using this model, we show in the present study that the NA occurring in IH is critically associated with the pathophysiology and time course of the tumor and that propranolol inhibits NA-induced angiogenesis *in vitro*.

Materials and methods

Infantile hemangioma and foreskin tissues

This study was performed on consecutive patients undergoing surgery for IH and congenital hemangiomas at Bordeaux Children's Hospital between 2015 and 2021, in accordance with the Declaration of Helsinki (**Supplementary table S1**). All samples were obtained after consent from the patients or their family/legal guardians. The Ethics Committee of Bordeaux University Hospital approved the study. The clinical diagnosis of IH was confirmed by immunohistochemical detection of GLUT-1.

Catecholamines ELISA assay

Catecholamine levels were analyzed by an ELISA kit (3-CAT Research ELISA, ImmuSmol, France) according to the manufacturer's instructions. Adrenaline, NA and dopamine levels were measured on 30 IH tissues. Ten mg of tissue were digested in a solution containing 100 µl EDTA (1 mM) and sodium metabisulfite (4 mM) and then sonicated. After centrifugation at 12 000 rpm for 15 minutes at 4 °C, the supernatant was used for the ELISA.

Immunohistochemistry

Immunohistochemical stains were performed on formalin-fixed and paraffin-embedded 3-µm sections. Re-hydration and antigen retrieval were done by heating the slides in a pH 6 EDTA buffer (PT Module Buffer®, Thermo Scientific, USA) in a PT-link® instrument (Dako, Agilent, USA) for 20 minutes at 97°C. All the primary antibodies were incubated overnight at 4°C, and Alexa fluor 488- or 555- conjugated secondary antibodies were incubated for 1 hour at room temperature. Cell nuclei were visualized by 4', 6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI) staining.

Samples were incubated with primary antibodies against GLUT-1, Ki67, CD34, α-SMA, AQP1 and catecholamine synthesis enzymes (TH, DDC, DBH and PNMT). References, manufacturers, and concentrations of primary antibodies are listed in the **supplementary table S2**. All images were captured with the NIS-Elements software (Nikon, V3.22.10) coupled with an Eclipse epifluorescent microscope (Nikon) at a magnification x 40.

Protein extraction and Western blotting

One mg of IH tissue (N=30) was digested in 100 µl RIPA lysis buffer containing 25 mM Tris-HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 1 % NP-40, 1 % sodium deoxycholate (SDS), 1 mM phenylmethanesulfonylfluoride fluoride (PMSF) and protease inhibitor cocktail (Sigma-

Aldrich). After sonication, homogenates were centrifuged at 12 000 rpm for 15 minutes at 4 °C. The concentration of extracted protein was measured with the Pierce BCA protein assay kit (Thermo Fisher, USA). Equal amounts of total proteins were boiled in Laemmli buffer for 5 minutes at 90 °C, resolved by 10 % sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PGE) and then electrophoretically transferred to polyvinylidene difluoride (PVDF, Dominique Dutscher, France) membranes. After blocking with 5 % nonfat dry milk 0.5 % Tween 20, membranes were incubated with primary TH, DDC, DBH, PNMT, GAPDH and β -actin antibodies. References, manufacturers, and concentrations of primary antibodies are listed in the **supplementary table S2**. Then the membranes were incubated with an appropriate horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (Vector) at room temperature for 1 hour. Blots were finally developed using chemiluminescence ECL reagent (Clarity™ Western ECL Substrate, Biorad, USA). Images were obtained using a Fujifilm camera (Las3000, Fujifilm). Quantification was performed with ImageLab (Biorad). Data are presented as relative protein level after normalization with β -actin or GAPDH.

IH Cell sorting and culture

After mechanical disruption of fresh IH, congenital hemangioma and foreskin tissues, single cell suspensions were obtained by using an enzyme cocktail composed of collagenase 1X (Sigma-Aldrich) and dispase 1X (Sigma-Aldrich) in sterile PBS. Cells of interest (IH-EC, IH-TC and IH-PER) were then isolated by sequential sorting using magnetic-activated cell sorting (MACS) based on magnetic beads coupled with antibodies (Miltenyi). IH-EC were first isolated with anti-CD31, then IH-TC with anti-CD34 and finally IH-PER with anti-CD146 antibodies (Miltenyi). Cells were seeded at a density of 100 000 cells/cm² in fibronectin (Promocell)-coated culture plates. EC were cultured in endothelial growth medium (EGM2, Promocell), TC in DMEM (Gibco) supplemented with 10% fetal bovine serum and PER in pericyte growth medium (Promocell), all supplemented with 1% penicillin-streptomycin.

Flow cytometry analysis

PE-Cy7-conjugated mouse anti-human CD34 and Alexa Fluor 488-conjugated mouse anti-human CD146 (Biolegend, USA) were used for detection. To establish background staining, cells were labeled with FITC- or PE-conjugated isotype-matched control antibodies. Flow cytometry was performed on a BD FACS CANTO II. The data were analyzed using FlowJo software (FlowJo, USA).

Immunocytofluorescence

Cells were seeded on a fibronectin-coated slide in a 48-well plate. After methanol-ethanol (V/V) fixation, cellular membranes were permeabilized with the permeabilization reagent 0.2 % Triton X-100 in PBS. Nonspecific binding sites were blocked with 10 % FBS. Cells were then incubated with primary antibodies against CD31, CD146, α -SMA, NG2 and PDGFR β . Cell nuclei were counterstained with DAPI. References, manufacturers, and concentrations of primary antibodies are listed in the **supplementary table S2**. All image acquisitions were done with the NIS-Elements software (Nikon, V3.22.10) coupled with a Leica epifluorescent microscope.

Electron microscopy

Electron microscopy studies were conducted at the Bordeaux Imaging Center, Bordeaux University, a core facility of the France Bio Imaging network. IH biopsies were fixed with 2.5 % (v/v) glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4) for 1h at room temperature (RT). Samples were washed in 0.1 M phosphate buffer and post-fixed in 1% (v/v) osmium tetroxide in phosphate buffer 0.1 M for 2h, in the dark at RT. Then tissues were dehydrated by a series of graded ethanol washes and embedded in a mixture of pure ethanol and epoxy resin (Epon 812; Delta Microscopy, Toulouse, France) 50/50 (v/v) for 2 hours and then in 100% resin overnight at RT. The resin was polymerized over a period between 24-48 hours at 60 ° C. Samples were then sectioned using a diamond knife (Diatome, Biel-Bienne, Switzerland) on an ultramicrotome (EM UC7, Leica Microsystems, Vienna, Austria). Ultrathin sections (65 nm) were picked up on copper grids and then stained with uranyl acetate and lead citrate. Grids were examined with a transmission electron microscope (H7650, Hitachi, Tokyo, Japan) at 80 kV.

Proliferation assay

Cell proliferation was investigated by the Sulforhodamine B (SRB) assay. IH cells were seeded in 96-well plates at a density of 2.5×10^4 IH-cells/well. The day after seeding, cells were treated with varying concentrations (0, 0.3, 1, 3, 10, 30, 50, 100 μ M) of propranolol for 6 days. After removing the medium, cells were fixed with 10 % of trichloroacetic acid (TCA) solution for 1 hour at 4 °C. TCA was then removed and cells were washed five times with distilled water. Cells were then incubated with 0.4 % SRB for 10 minutes at room temperature. Wells were washed five times with 1 % acetic acid. The dye was dissolved in 10 mM Tris base buffer and the absorbance was measured with an iMark™ Microplate Absorbance Reader (BioRad) at a wavelength of 515 nm.

In vitro Matrigel tube formation assay

Matrigel-based angiogenesis assay was performed according to a previously described protocol (27). Briefly, Matrigel® Growth Factor Reduced (GFR) basement membrane matrix (Corning) was thawed at 4 °C. Ten µl of Matrigel were added to each well of a µ-slide angiogenesis (Ibidi) and allowed to polymerize for 30 minutes at room temperature, then for 1h at 37°C. IH-EC, IH-PER and IH-TC were labeled with CMRA548 red dye, CellTrace405 violet dye and CMFDA488 green dye (ThermoFisher), respectively. IH-derived cells were suspended in 50 µL EGM2 containing 10 µM NA (Mylan) and/or 3 µM propranolol (Karnodyl, Primius Lab Ltd). Different cell types were seeded separately or together in the same proportions onto Matrigel in triplicate (10,000 cells/well or 3,200 IH-EC + 3,200 IH-PER + 3,200 IH-TC/well). µ-slides were incubated for 3h at 37°. After incubation, the formation of tube-like vessels was imaged at 10X magnification using an Eclipse epifluorescent microscope (Nikon). Angiogenesis parameters including total tubes, total tube length, percentage of covered area, total loops and nets were analyzed using the Wimasis image analysis system (Onimagin Technologies, Spain). Mean value of three images per well was obtained for each condition in triplicate.

Statistical analyses

Comparisons between two groups were calculated with GraphPad Prism V6 software (GraphPad Inc.) using the unpaired Student's t-test (two tailed) or the Mann-Whitney test when the variance was not homogeneous. A p-value < 0.05 (*) was considered significant. Results are presented as means ± standard error of mean (SEM).

Results

Propranolol treatment reduces NA level in IH

Because propranolol is an antagonist of ADRB, we wondered whether the levels of the natural agonists of ADRB, namely NA, adrenaline and dopamine, are upregulated in IH. To test this hypothesis, we first measured the levels of catecholamines in propranolol-treated and untreated IH tissues at the proliferative and involutive stages (**Figure 1**). Of note, the clinical diagnosis of IH tissues used for this study was confirmed by GLUT-1 staining, which is widely used as a diagnostic marker (28), and by AQP1 staining, which has been recently proposed as a marker of antitumor propranolol response (27). In contrast to congenital hemangiomas, IH expressed GLUT-1 and AQP1 in their EC and TC, respectively (**Figure 1A, B**). Furthermore, Ki67 immunostaining was performed to distinguish between proliferative and involutive IH tissues. The number of Ki67⁺ cells was much higher in proliferative IH than in involutive IH (**Figure 1C**). Considering NA, adrenaline and dopamine IH concentrations, only significant amounts of NA were found in IH tissues (**Figure 1D**). Dopamine was detectable at low levels and NA at a level close to the detection threshold. (**Figure 1D**).

NA levels were decreased in spontaneously involuted IH compared to untreated proliferative IH. Interestingly, propranolol treatment significantly decreased NA concentrations when taken during the tumor proliferative phase, while it had no significant effect on NA level when administrated at the involutive phase (**Figure 1E**).

Altogether, our results indicate that propranolol decreases the concentration of NA in IH when started at the proliferative phase, and that spontaneous involution of IH is accompanied by a decrease in NA tissue concentration.

Catecholamine biosynthetic enzymes are expressed by IH cells and their expression levels are reduced by propranolol

Given the presence of catecholamines in IH tissues, we wondered whether the enzymes implicated in the catecholamine biosynthesis pathway were expressed by IH cells. As illustrated in **Figure 2A**, tyrosine hydroxylase (TH), the rate-limiting enzyme of catecholamine synthesis, catalyzes the hydroxylation of tyrosine to L-DOPA. The latter is converted to dopamine by L-DOPA decarboxylase (DDC). Dopamine is hydroxylated by dopamine- β -hydroxylase (DBH) to NA, which is finally methylated to adrenaline by phenylethanolamine N-methyltransferase (PNMT). Immunohistochemistry analyses showed that TH, DDC and DBH, but not PNMT, were expressed by IH (**Figure 2B**). Furthermore, the expression levels of TH, DDC and DBH

in propranolol-treated IH were much lower than those found in untreated proliferative IH (**Figure 2C**).

We then wondered which cells express these enzymes in IH. Since immunohistochemistry of catecholamine enzymes showed perivascular staining (**Figure 2B**), EC, PER and TC were respectively immunostained with anti-CD34, anti- α SMA and anti-AQP1 antibodies and then co-immunostained with the antibodies against catecholamine biosynthetic enzymes. Results showed that all three cell types (EC, PER and TC) expressed TH, DDC and DBH (**Figure 3A**). In addition, these cells were sequentially sorted from IH tissues using anti-CD31, anti-CD34 and anti-CD146 magnetic microbeads (**supplemental Figure S1A**), as described in material and methods. The isolated cells were then characterized with immunostaining (**supplemental Figure S1B, S1C**). Placental pericytes and HUVEC were used as control. Western blot analysis of the expression of the catecholamine biosynthetic enzymes confirmed the expression of TH, DDC and DBH by all these cells (**Figure 3B, supplemental Figure S2**), suggesting that they are able to synthesize catecholamines *in vitro*.

Altogether, our data indicate that IH-EC, -PER and -TC express the first three enzymes of the catecholamine biosynthetic pathway and that the levels of these enzymes in propranolol-treated IH were lower than the levels found in untreated IH.

IH sensitivity to propranolol depends on crosstalk between IH-EC, PER and TC and the presence of a threshold level of NA

To study the role of NA in the pathophysiology of IH and response to propranolol, we used capillary-like tube formation assays on Matrigel matrices in which IH-EC, -PER and/or -TC were incorporated. When used separately, IH-EC, PER and TC were all able to form tubes *in vitro* (**Figure 4A and supplemental Figure S3**). However, their capacity to form tubes was not affected upon treatment with propranolol even when exogenous NA was added (**Figure 4A**). Of note, propranolol or NA treatment has a very moderate effect on the total tubes formed by IH-TC (**Figure 4A**). An IH-EC and PER co-culture model was then used to investigate whether there is a difference in the capacity of capillary-like tube formation between cells isolated from IH when treated with propranolol in the presence or absence of exogenous NA (**Figure 4B, C**). Results showed that the total tubes formed in the presence of both IH-EC and -PER were not sensitive to propranolol in the presence or absence of exogenous NA (**Figure 4C**). Finally, we used a capillary-like tube formation assay in which the three cell types (IH-EC, PER and -TC) were incorporated to create a 3D model closer to pathophysiology of IH.

Results showed that the total tubes formed in the 3-cell model were increased in the presence of exogenous NA, and propranolol treatment resulted in a significant reduction in the total tubes in the latter condition (**Figure 4D**).

Altogether, our results indicate that the combination of three IH-derived cell types (i.e. EC, PER and TC) and exogenous NA is critical for detecting an efficient inhibitory effect of propranolol on capillary-like tube formation *in vitro*.

Proliferative IH have the competency of neuroendocrine secretion

Given the expression of catecholamine biosynthesis enzymes by IH tissues and the critical role of NA levels in creating an *in vitro* angiogenesis model with sensitivity to propranolol treatment, we wondered whether IH possess adequate transporters for the paracrine secretion of catecholamine, as does neural tissue. To answer this question, we examined the expression of chromogranin A (CgA) in IH tissues. Of note, as a member of the granin family of proteins, CgA is one of the major components of the secretory granules of most endocrine and neuroendocrine cells. This protein, whose immunohistochemical detection represents one of the most widely used markers of neuroendocrine cells, is expressed by normal and tumor cells of the diffuse endocrine and neuroendocrine systems and in some cancer cells that can undergo neuroendocrine differentiation. CgA is involved in granulogenesis and the processing of secretory protein cargo prior to secretion (29–32). Immunostaining analyses of CgA expression in IH tissue revealed high expression levels of CgA in proliferative untreated IH. Of interest, CgA was detectable at very low levels in involutive IH and congenital hemangioma (**Figure 5A**).

Altogether, these results suggest that proliferative IH tissues present some of the features of neuroendocrine tumors.

Discussion

A specific feature of IH tissues is the presence of high concentrations of NA, which are efficiently lowered by propranolol treatment. Given that there is no established *in vitro* model for studying the pathophysiology of IH and the mechanism underpinning the efficacy of propranolol, we developed a simplified IH-like model with IH-PER, IH-EC and IH-TC isolated from the same biopsy. To detect an antiangiogenic effect of propranolol in this model, a high local concentration of NA is a prerequisite.

Owing to the presence of high levels of NA in proliferative IH tissue and the expression of TH, DDC and DBH in IH-PER, IH-EC and IH-TC, our results strongly suggest the local production of NA in IH tissue. In agreement, it has been shown that normal EC can synthesize NA (16). The expression of catecholamine synthesis enzymes was clearly decreased in IH tissues treated with propranolol. Propranolol is known to prevent NA fixation on adrenergic receptors. However, it is not clear how NA levels decrease during IH regression. Two possible explanations are as follows. First, the decrease in NA may be due to the upregulation of catecholamine degradation enzymes such as catechol-O-methyl-transferase (COMT) or monoamine oxidase (MAO). In accordance with this mechanism, Jacob et al., showed that propranolol treatment in rats induces a significant increase in COMT and MAO (33). Second, propranolol treatment may reduce the expression or the activity of the catecholamine synthesizing enzymes. In agreement with this hypothesis, Tuross and Patrick reported that propranolol has a direct inhibitory effect on the activity of TH, the rate-limiting step in the biosynthesis pathways of catecholamines in striatal and hypothalamic synaptosomes (34). Srivastava and Kapoor also reported that propranolol reduces DBH activity and consequently NA levels in the rat brain (35).

We have previously shown that beta-adrenergic receptors in IH tissues are expressed in EC, TC and PER with a concomitant higher expression in mast cells (17, 27). In the current study, we found that NA, which can act as a proangiogenic factor in the regulation of angiogenesis in IH tissue, can be produced locally by IH-derived EC, TC and PER. The need to add exogenous NA to create an appropriate model responding to propranolol suggests that other cells such as mast cells, as well as any circulating factors not present *in vitro*, could intervene in the regulation of the system. The NA locally produced in IH could activate an autocrine/paracrine angiogenic loop via ADRB present on the surface of various IH cell types (**Figure 5**). In agreement with our results, growing evidence indicates that the activation of ADRB in several types of cancers can promote tumor angiogenesis by triggering the production of proangiogenic factors. For instance, Thaker *et al* showed that ADRB2 activation in ovarian

carcinoma cell lines via the extrinsic stress-induced release of catecholamines results in the upregulation of VEGF, which in turn promotes tumor vascularization and aggressive growth (36). Other angiogenic factors such as MMP-2, MMP-9 and IL-6 can also be elevated via the ADRB signaling pathway following stimulation by adrenaline or NA in several breast cancer cell lines (37). In such tumor models, ADRB antagonists including propranolol have been shown to reduce the expression of these proangiogenic factors (36–38). Furthermore, the specific knockdown of signal transduction at the ADRB2 level in vascular ECs can directly impair angiogenesis *in vivo* and tubulogenesis *in vitro* (18, 39, 40). Our data suggest that intrinsically produced NA in IH can drive tumor development. Consistent with this hypothesis, it has been shown that the expression of several proangiogenic factors such as VEGF, MMP2, MMP9 (41) and HIF-1 α (42), which are highly upregulated in IH during the proliferative phase, decrease after tumor involution.

In conclusion, we demonstrate that the presence of NA in pharmacological amounts in IH tissues is dramatically limited by propranolol during the growth phase of IH. We therefore suggest that the high local production of NA is a specific feature of IH and the major driver of its development.

Acknowledgments

A.T. gratefully acknowledges support from the ANR, Ligue Nationale contre le Cancer, L'Oreal La Roche Posay, Laboratoires Pierre Fabre, "Fondation de l'Avenir" and "Fondation Association pour la Recherche contre le Cancer". Electron microscopy studies were conducted at the Bordeaux Imaging Center, Bordeaux University, a core facility of the France BioImaging network (ANR-10-INBS-04 FranceBioImaging). The authors wish to thank Dr. Martin Hagedorn and Pr. Beat Imhof for helpful discussion.

Source of Funding: ANR "BETASKIN2" ANR-12-BSV1-0021-01

Disclosures: A patent has been granted for the use of beta-blockers in infantile capillary hemangiomas with AT and CLL as inventors and Bordeaux University and Bordeaux University Hospital as owner of the patent. None of the authors has any other financial interest related to this work.

Data availability

The authors declare that the data supporting the findings of this study are available within the paper and its Supplementary Information files.

References

1. Dasgupta R, Fishman SJ. ISSVA classification. *Semin. Pediatr. Surg.* 2014;23(4):158–161.
2. Léauté-Labrèze C, Harper JI, Hoeger PH. Infantile haemangioma. *Lancet* 2017;390(10089):85–94.
3. Haggstrom AN et al. Prospective study of infantile hemangiomas: clinical characteristics predicting complications and treatment. *Pediatrics* 2006;118(3):882–887.
4. Léauté-Labrèze C et al. Propranolol for Severe Hemangiomas of Infancy. *N Engl J Med* 2008;358(24):2649–2651.
5. Léauté-Labrèze C et al. A Randomized, Controlled Trial of Oral Propranolol in Infantile Hemangioma. *New England Journal of Medicine* 2015;372(8):735–746.
6. Prey S et al. Safety of Propranolol Therapy for Severe Infantile Hemangioma. *JAMA* 2016;315(4):413.
7. Truong MT, Perkins JA, Messner AH, Chang KW. Propranolol for the treatment of airway hemangiomas: a case series and treatment algorithm. *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.* 2010;74(9):1043–1048.
8. Greenberger S, Bischoff J. Infantile hemangioma-mechanism(s) of drug action on a vascular tumor. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2011;1(1):a006460.
9. Storch CH, Hoeger PH. Propranolol for infantile haemangiomas: insights into the molecular mechanisms of action. *Br. J. Dermatol.* 2010;163(2):269–274.
10. Chakroborty D, Sarkar C, Basu B, Dasgupta PS, Basu S. Catecholamines regulate tumor angiogenesis. *Cancer Res.* 2009;69(9):3727–3730.
11. Pan W-K, Li P, Guo Z-T, Huang Q, Gao Y. Propranolol induces regression of hemangioma cells via the down-regulation of the PI3K/Akt/eNOS/VEGF pathway. *Pediatr Blood Cancer* 2015;62(8):1414–1420.
12. Shi M, Liu D, Yang Z, Guo N. Central and peripheral nervous systems: master controllers in cancer metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* 2013;32(3–4):603–621.
13. Park SY et al. Norepinephrine induces VEGF expression and angiogenesis by a hypoxia-inducible factor-1 α protein-dependent mechanism. *Int. J. Cancer* 2011;128(10):2306–2316.
14. Chen H et al. Adrenergic signaling promotes angiogenesis through endothelial cell-tumor cell crosstalk. *Endocr. Relat. Cancer* 2014;21(5):783–795.
15. Sarkar C, Chakroborty D, Basu S. Neurotransmitters as regulators of tumor angiogenesis and immunity: the role of catecholamines. *J Neuroimmune Pharmacol* 2013;8(1):7–14.
16. Sorriento D et al. Endothelial cells are able to synthesize and release catecholamines both in vitro and in vivo. *Hypertension* 2012;60(1):129–136.
17. Prey S et al. Mast cells as possible targets of propranolol therapy: an immunohistological study of beta-adrenergic receptors in infantile haemangiomas. *Histopathology* 2014;65(3):436–439.
18. Iaccarino G et al. Beta(2)-adrenergic receptor gene delivery to the endothelium corrects impaired adrenergic vasorelaxation in hypertension. *Circulation* 2002;106(3):349–355.

19. Dosanjh A et al. In vitro characteristics of neonatal hemangioma endothelial cells: similarities and differences between normal neonatal and fetal endothelial cells. *J. Cutan. Pathol.* 2000;27(9):441–450.
20. Boye E et al. Clonality and altered behavior of endothelial cells from hemangiomas. *J. Clin. Invest.* 2001;107(6):745–752.
21. Yu Y, Varughese J, Brown LF, Mulliken JB, Bischoff J. Increased Tie2 expression, enhanced response to angiopoietin-1, and dysregulated angiopoietin-2 expression in hemangioma-derived endothelial cells. *Am. J. Pathol.* 2001;159(6):2271–2280.
22. Dadras SS, North PE, Bertoncini J, Mihm MC, Detmar M. Infantile hemangiomas are arrested in an early developmental vascular differentiation state. *Mod. Pathol.* 2004;17(9):1068–1079.
23. Li Q, Yu Y, Bischoff J, Mulliken JB, Olsen BR. Differential expression of CD146 in tissues and endothelial cells derived from infantile haemangioma and normal human skin. *J. Pathol.* 2003;201(2):296–302.
24. Boscolo E, Bischoff J. Vasculogenesis in infantile hemangioma. *Angiogenesis* 2009;12(2):197–207.
25. Chisholm KM et al. β -Adrenergic receptor expression in vascular tumors. *Mod. Pathol.* 2012;25(11):1446–1451.
26. Díaz-Flores L et al. CD34+ stromal cells/fibroblasts/fibrocytes/telocytes as a tissue reserve and a principal source of mesenchymal cells. Location, morphology, function and role in pathology. *Histology and histopathology* 2014;29(7):831–70.
27. Moisan F et al. Critical role of Aquaporin-1 and telocytes in infantile hemangioma response to propranolol beta blockade. *Proc Natl Acad Sci USA* 2021;118(7):e2018690118.
28. North PE, Waner M, Mizeracki A, Mihm Jr MC. GLUT1: A newly discovered immunohistochemical marker for juvenile hemangiomas. *Human Pathology* 2000;31(1):11–22.
29. Cohn DV et al. Similarity of secretory protein I from parathyroid gland to chromogranin A from adrenal medulla. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1982;79(19):6056–6059.
30. Huttner WB, Gerdes HH, Rosa P. The granin-(chromogranin/secretogranin) family. *Trends in Biochemical Sciences* 1991;16:27–30.
31. Borges R, Díaz-Vera J, Domínguez N, Arnau MR, Machado JD. Chromogranins as regulators of exocytosis: Cgs as regulators of exocytosis. *Journal of Neurochemistry* 2010;114(2):335–343.
32. Laguerre F, Anouar Y, Montero-Hadjadje M. Chromogranin A in the early steps of the neurosecretory pathway. *IUBMB Life* 2020;72(4):524–532.
33. Jacob R, Gülch R, Kissling G. *Cardiac Adaptation to Hemodynamic Overload, Training and Stress*. Springer Science & Business Media; 2012:
34. Tuross N, Patrick RL. Effects of propranolol on catecholamine synthesis and uptake in the central nervous system of the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1986;237(3):739–745.
35. Srivastava M, Kapoor NK. The effect of propranolol on rat brain catecholamine biosynthesis. *J Biosci* 1983;5(3):261–266.

36. Thaker PH et al. Chronic stress promotes tumor growth and angiogenesis in a mouse model of ovarian carcinoma. *Nat. Med.* 2006;12(8):939–944.
37. Madden KS, Szpunar MJ, Brown EB. β -Adrenergic receptors (β -AR) regulate VEGF and IL-6 production by divergent pathways in high β -AR-expressing breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res Treat* 2011;130(3):747–758.
38. Ji Y, Chen S, Xu C, Li L, Xiang B. The use of propranolol in the treatment of infantile haemangiomas: an update on potential mechanisms of action. *Br. J. Dermatol.* 2015;172(1):24–32.
39. Iaccarino G et al. Ischemic Neoangiogenesis Enhanced by β_2 -Adrenergic Receptor Overexpression: A Novel Role for the Endothelial Adrenergic System. *Circulation Research* 2005;97(11):1182–1189.
40. Ciccarelli M et al. Impaired neoangiogenesis in β_2 -adrenoceptor gene-deficient mice: restoration by intravascular human β_2 -adrenoceptor gene transfer and role of NF κ B and CREB transcription factors: β_2 AR and neoangiogenesis. *British Journal of Pharmacology* 2011;162(3):712–721.
41. Taran K, Wnęk A, Kobos J, Andrzejewska E, Przewratil P. Tissue and serum mRNA profile of MMPs-2/9 as a potential novel biomarker for the most individual approach in infantile hemangiomas and cancer disease. *Immunobiology* 2017;222(11):1035–1042.
42. Chen G et al. Hypoxia-induced autophagy in endothelial cells: a double-edged sword in the progression of infantile haemangioma?. *Cardiovasc. Res.* 2013;98(3):437–448.

Figures and figures legends

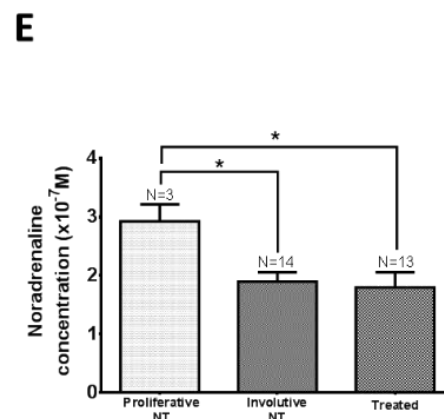
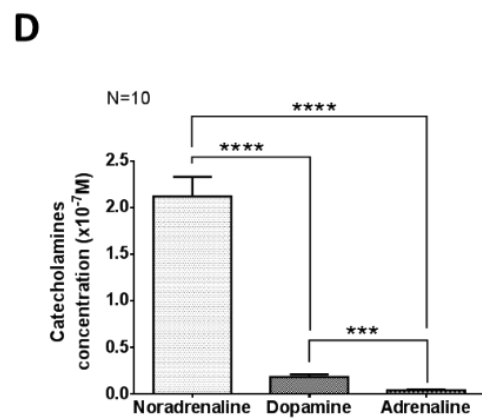
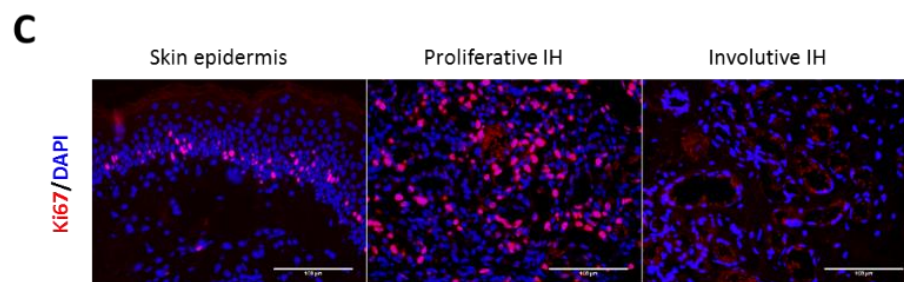
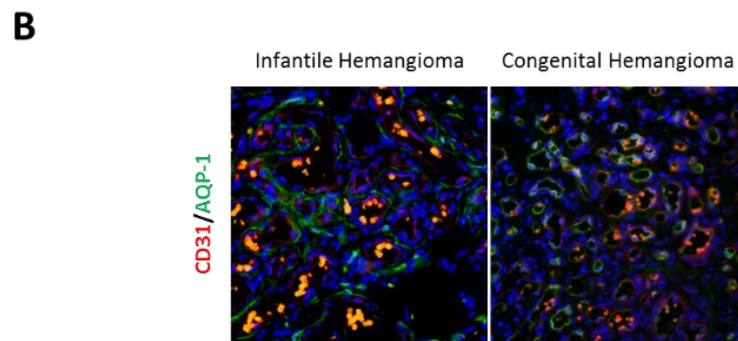
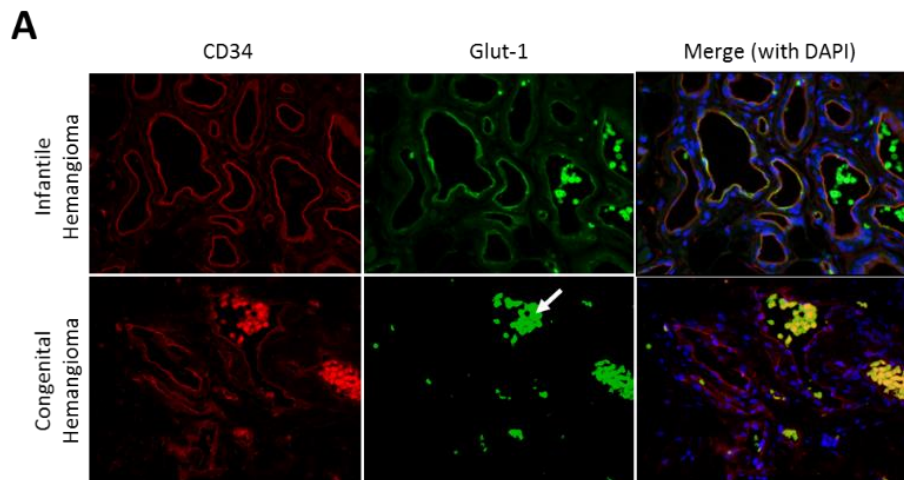


Figure 1: Propranolol treatment reduces noradrenaline level in proliferative IH.

(A) Characterization of IH compared to congenital hemangioma by GLUT-1 immunofluorescence staining. Red blood cell (white arrows) staining is used as positive control. Endothelial cells in IH express GLUT-1 but not in congenital hemangioma. (B) Characterization of IH with AQP1 staining. Telocytes in IH tissue express AQP1 but not in congenital hemangioma. (C) Characterization of proliferative and involutive IH by Ki67 immunofluorescence staining. Skin epidermis (left panel) is used as positive control. Numbers of Ki67⁺ cells are significantly higher in proliferative IH than in involutive IH. Scale bar 100 μ m. (D) Levels of NA, adrenaline and dopamine measured in IH tissues by ELISA. (E) NA levels in untreated (NT) proliferative or involutive IH as well as in propranolol-treated (T) IH were measured by ELISA. Data are presented as mean \pm SEM. * $P < 0.05$. NA: noradrenaline, IH: Infantile Hemangioma.

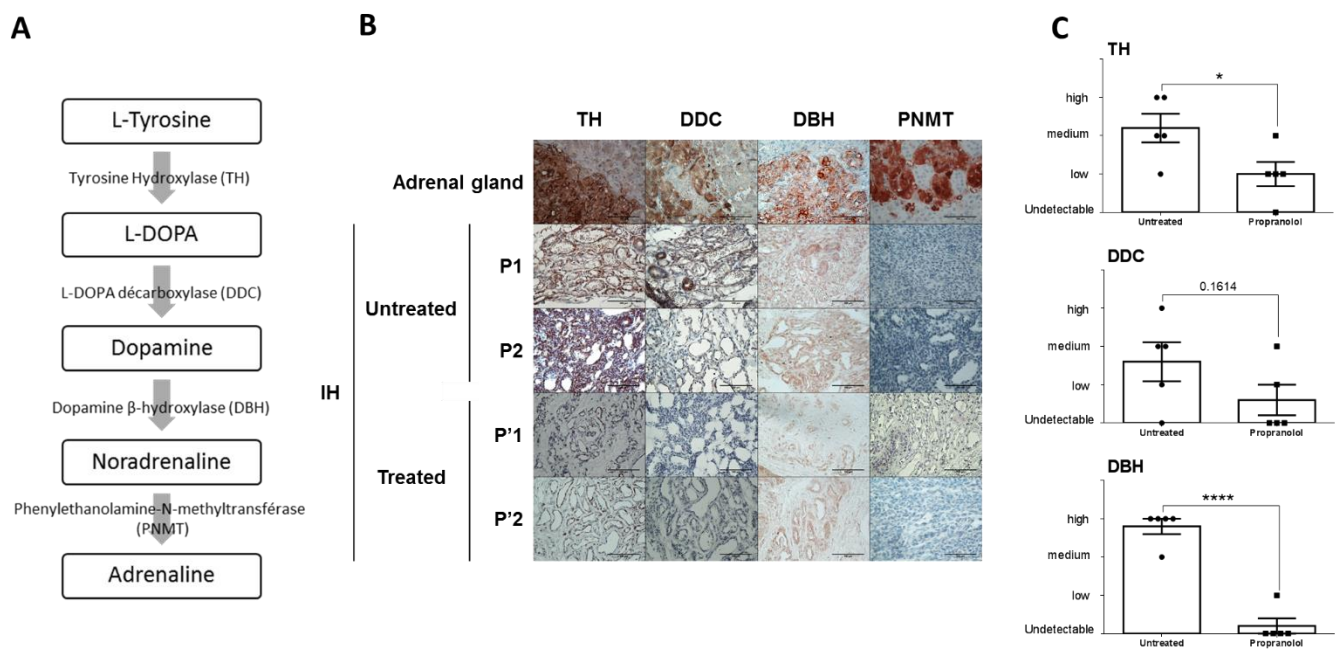
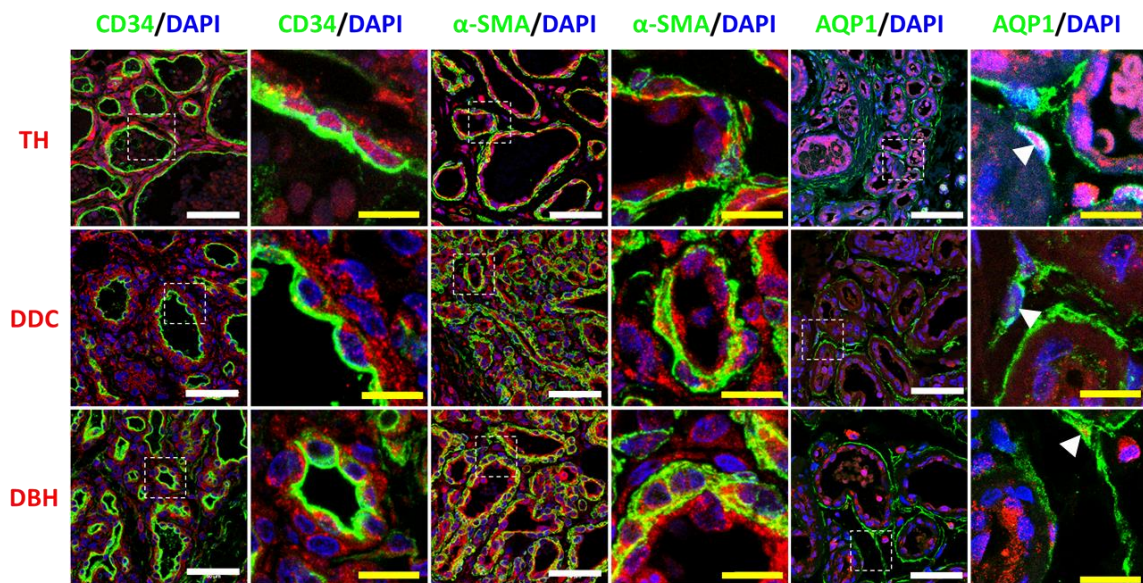


Figure 2: Enzymes implicated in catecholamine biosynthesis pathway are expressed in IH tissues and their expressions are decreased by propranolol treatment.

(A) Catecholamine biosynthesis pathway is shown. (B) All catecholamine biosynthesis enzymes except PNMT are expressed in IH tissue, enabling them to synthesize dopamine and NA. Expression levels of these enzymes are reduced with propranolol treatment. Adrenal gland is used as positive control. Expression levels of catecholamine biosynthesis enzymes in untreated patients are different from treated patients. Two representative pictures of 5 untreated patients and 5 propranolol-treated patients are shown. Scale bar size is 100µm. NA: noradrenaline, IH: Infantile Hemangioma. (C) Immunostained sections were scored considering the intensity of TH, DDC and DBH in a blinded manner for 5 untreated patients and 5 propranolol-treated patients

A



B

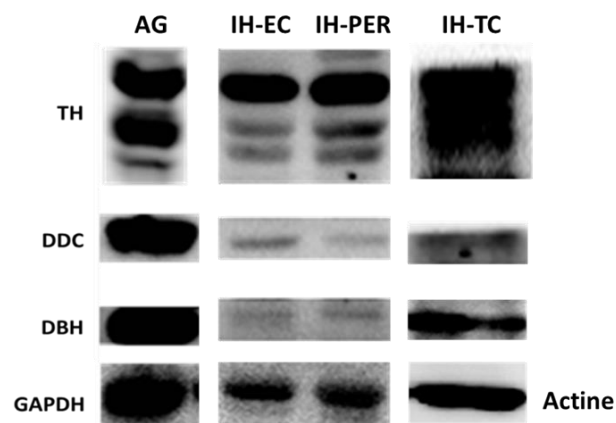


Figure 3: Catecholamine biosynthesis enzymes are expressed in IH-EC, -PER and -TC.

(A) Immunofluorescence staining of TH, DDC and DBH in IH. Endothelial cells are characterized by CD34-positive staining, pericytes by α -SMA and telocytes by AQP1 antibodies. Nucleus are stained with DAPI. White scale bar size is 50 μ m, and yellow scale bar is 10 μ m. (B) TH, DDC and DBH expression levels in different cell types isolated from IH were evaluated by western blot. Adrenal gland (AG) used as positive control. GAPDH and actin used as loading controls. IH: Infantile Hemangioma.

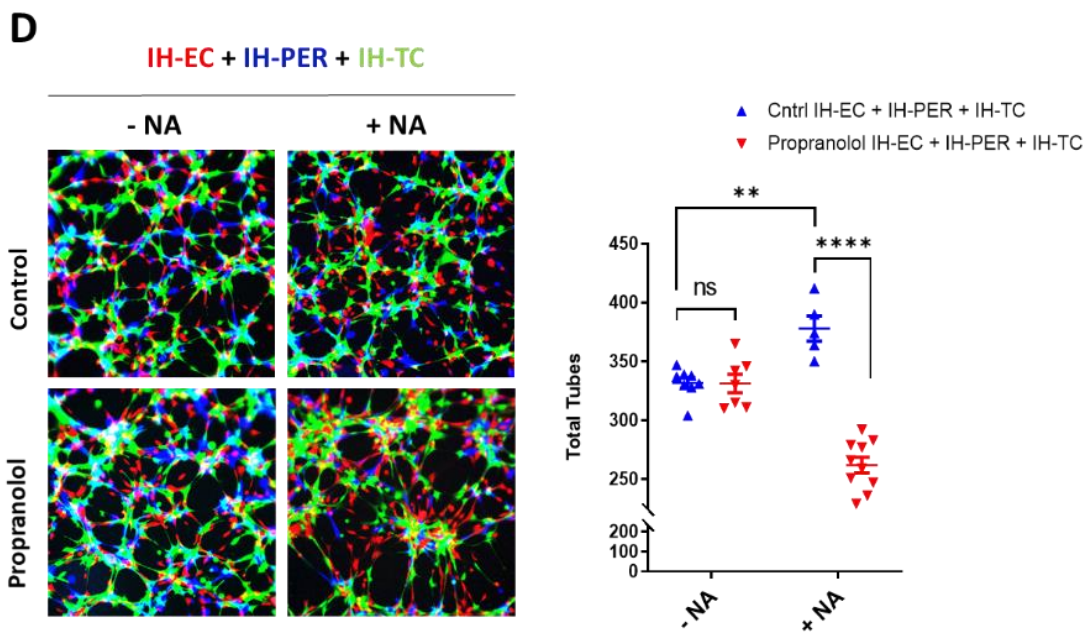
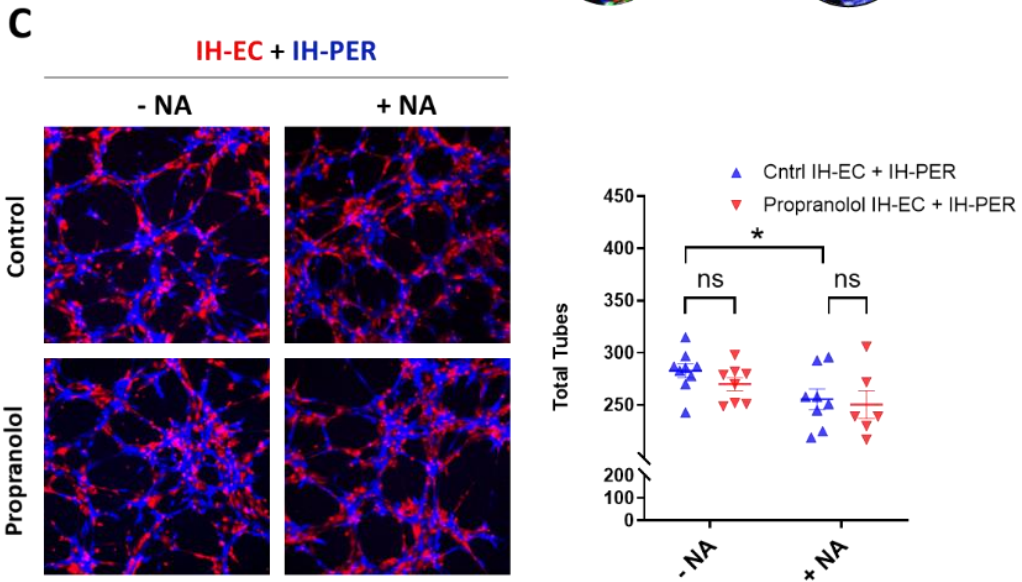
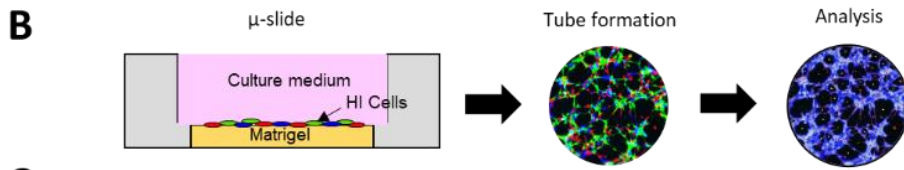
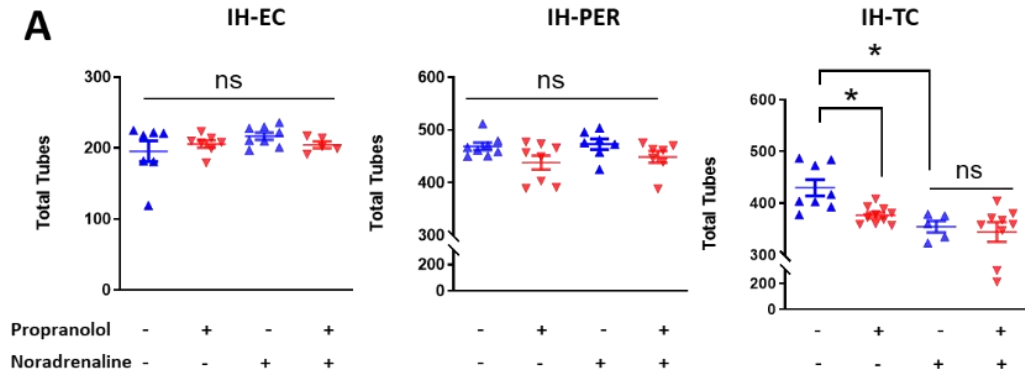
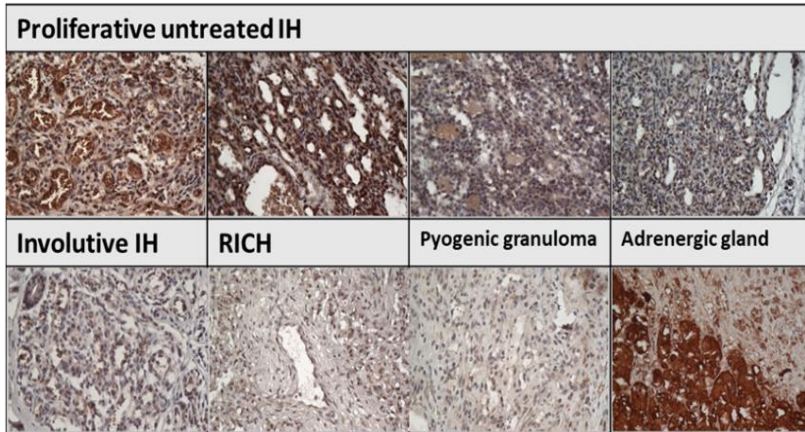
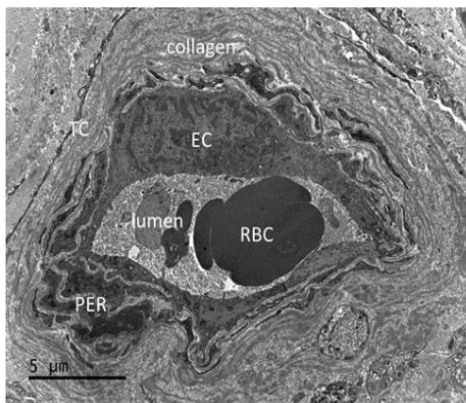


Figure 4: A threshold level of NA and a cross talk between EC, PER and TC are prerequisite to detect an antiangiogenic effect of propranolol in our in vitro matrigel tube formation assay. (A) IH-EC, IH-PER and IH-TC were seeded separately into Matrigel-coated wells. The formation of tube-like vessels were imaged 3h later and quantified using Wimasis image analysis system. (B) Schematic showing in vitro tube formation assay using two or three different cell types. Each cell type is labeled with a distinct fluorescent prob. Here, EC were labeled in red, PER in blue and TC in green. Tube formation were then surveyed and imaged. The images were finally analyzed with Wimasis image analysis system. (C) Left panel is a representative image illustrating tube formation by IH-EC and IH-PER 3 h after their seeding into Matrigel-coated well containing propranolol and/or NA. Quantification of total formed tubes is shown in right panel. (D) Left panel is a representative image illustrating tube formation by IH-EC, IH-PER and IH-TC (1:1:1 ratio) at 3 h after their seeding into wells. Quantification of total tubes (right panel) showed that NA promotes total tube numbers and this promotion is abolished if propranolol are added. Data are represented as mean \pm SEM, ns: non-significant, *P < 0.05, **P < 0.01, ****P < 0.0001. IH: infantile hemangioma, EC: endothelial cells, PER: pericytes, TC: telocytes, NA: noradrenaline.

A



B



C

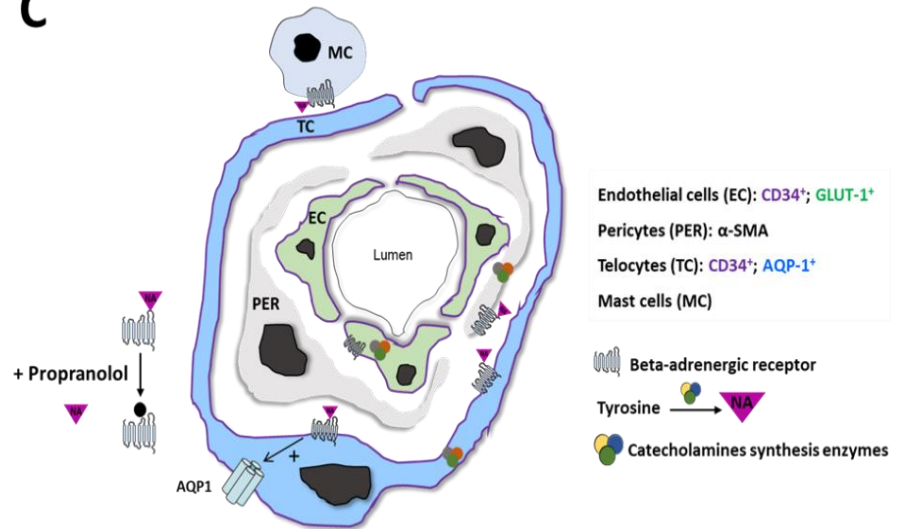
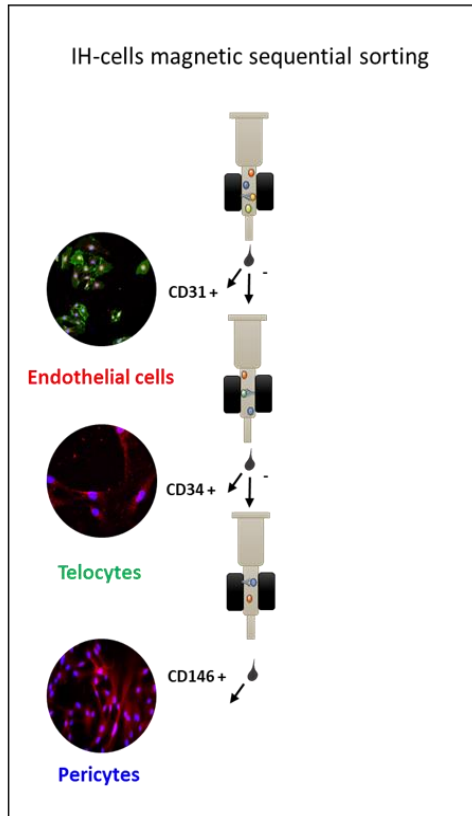


Figure 4: Proliferative IH tissues present some features of neuroendocrine tumors

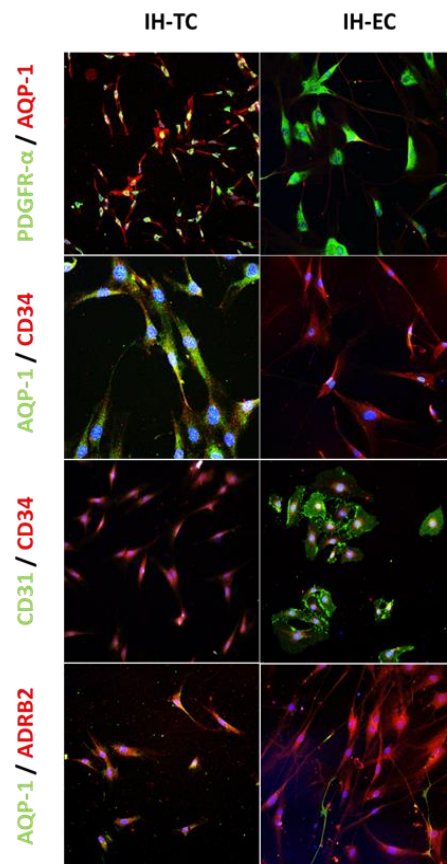
(A) Immunostaining for Chromogranin A (CgA) counterstained with hemalun. CgA-positive cells appear in brown. Scale bar size is 100µm. While high expression levels of CgA are detected in untreated proliferative IH, low levels are detected in involutive IH and other vascular tumors including rapidly involutive congenital hemangioma (RICH) and pyogenic granuloma. Adrenal gland used as positive control. (B-C) Model outlining IH response to propranolol. (B) Electron microscopy of IH vessel showing endothelial cells surrounded by pericytes and telopodes of telocytes in perivascular space. Scale bar size is 5 µm. (C) IH-EC, -PER and -TC express the first three enzymes involved in catecholamine biosynthesis pathway, enabling them to release NA locally. Our previous data (17, 27) demonstrated that beta-adrenergic receptors are present on IH-EC, -PER, -TC and mast cells. It is likely that NA-mediated activation of ADRB in an autocrine and/or paracrine manner results in activation of proangiogenic signaling pathways in different cell types, leading to dramatic growth and development of blood vessels. Propranolol antagonizes proangiogenic NA effect through binding on ADRB receptors. NA: noradrenaline, IH: Infantile Hemangioma.

Supplemental figures

A



C



B

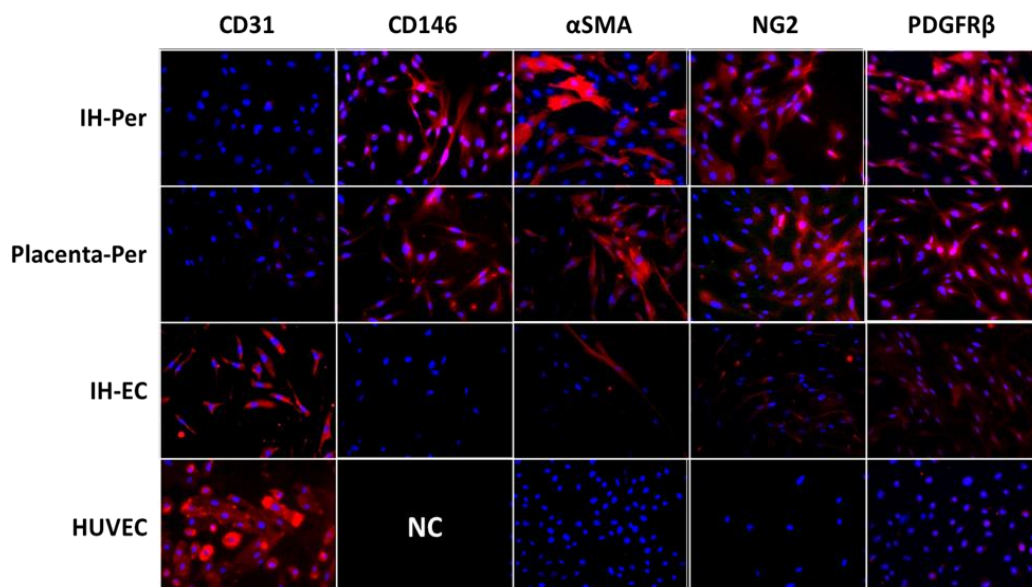


Figure S1. Isolation and characterization of EC, PER and TC from IH fresh tissue. (A) EC, TC and PER were sequentially isolated from digested IH tissue using respectively anti-CD31, anti-CD34 and anti-CD146 magnetic microbeads. (B) Immunocytofluorescent staining were used to verify the purity of isolated cells. IH-PER highly express CD146, α SMA, NG2 and PDGFR β . IH-EC highly express CD34 marker. Placenta pericytes and human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) are control cells. Nuclei are in blue with DAPI. Scale bar size is 50 μ m. (C) Immunocytofluorescent staining were used for characterization of telocytes isolated from fresh IH tissue. IH-TC are CD31- PDGFR-CD34+ AQP1+ cells while EC are CD31+ PDGFR+CD34+ AQP1- cells.

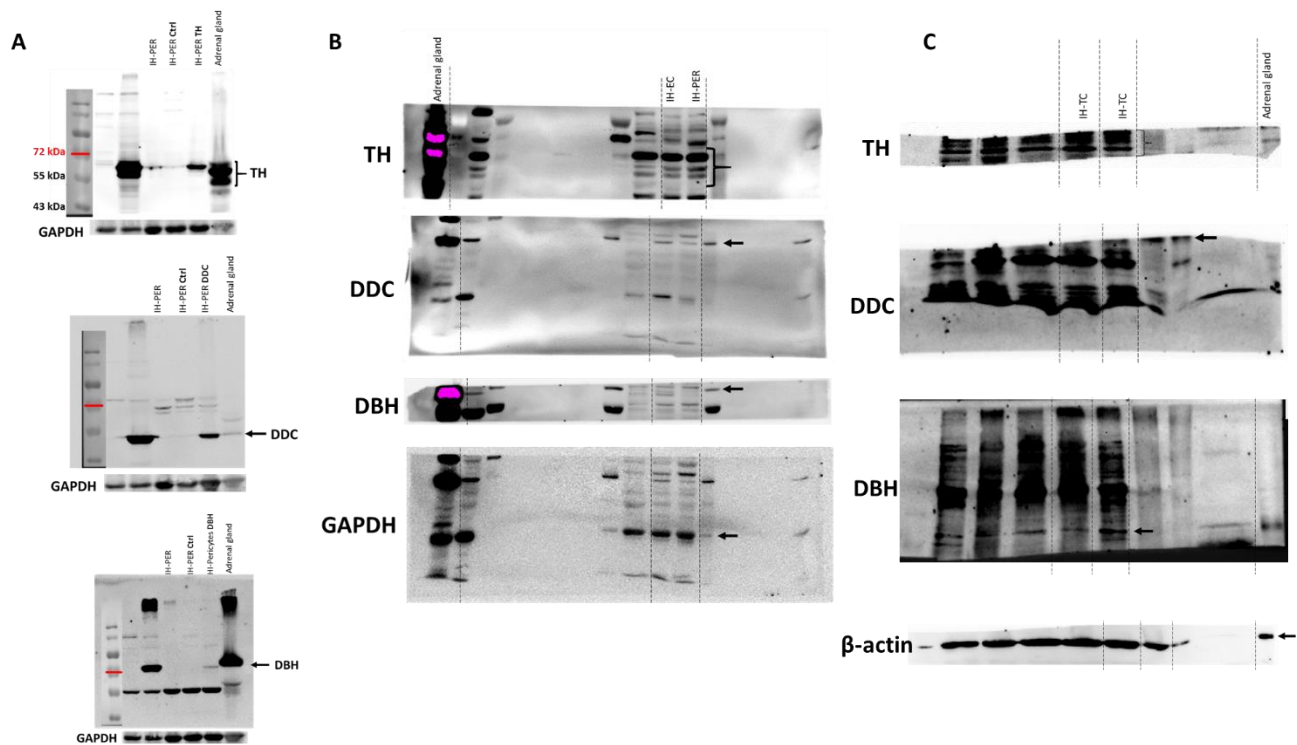


Figure S2: IH-EC, PER and TC express three first enzyme of catecholamines biosynthesis pathway. (A) To correctly verifying our antibodies, IH-PER were transfected with plasmid expressing human TH, DDC and DBH. Protein extracted from transfected and non-transfected cells were subjected to western blotting. Adrenal gland (AG) is used as positive control. GAPDH is used as loading control. (B-C) the expression of TH, DDC and DBH were verified in IH-EC, -PER (B) and TC (C) isolated from several patients. GAPDH and Actin are used as loading controls.

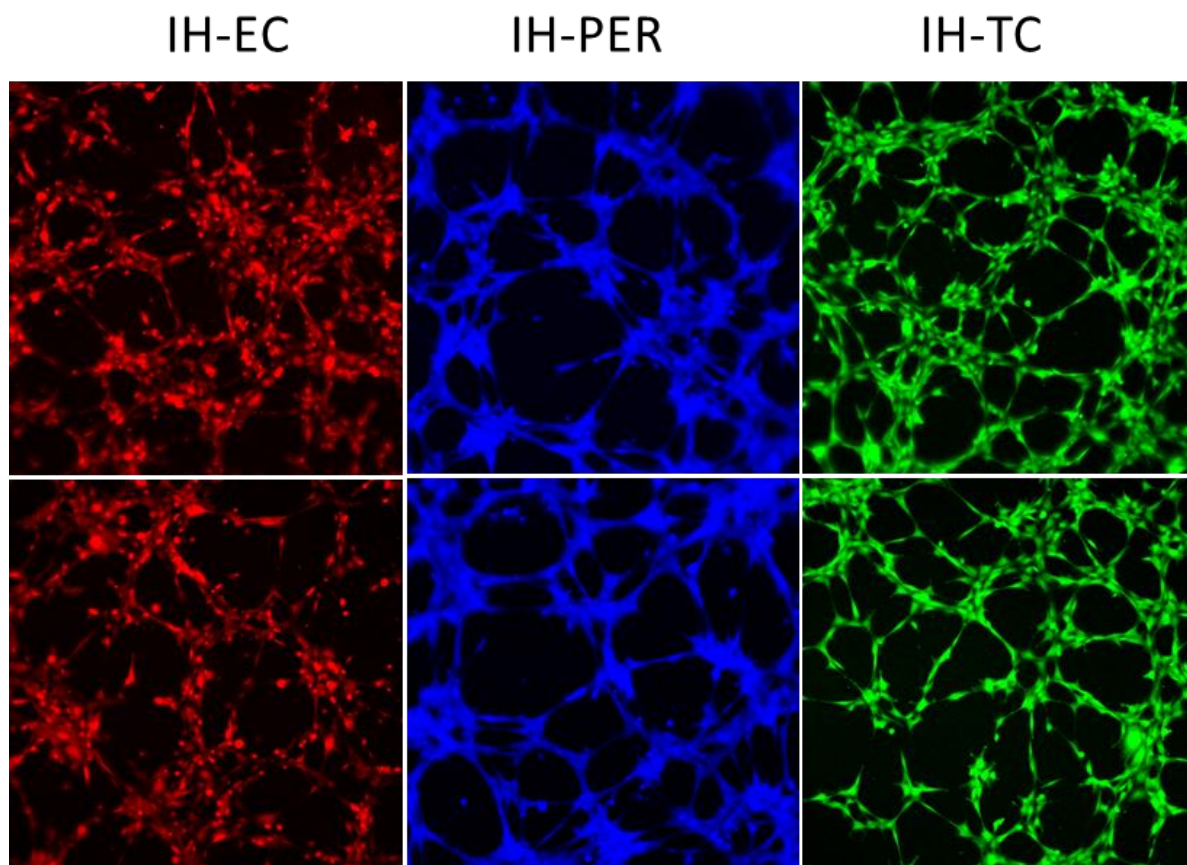


Figure S3: IH-EC, -PER and -TC are capable to form capillary-like tube when seeded into Matrigel-coated wells. IH-EC (red), IH-PER (blue) and IH-TC (green) isolated from fresh IH form tubes 3 hours after seeding in Matrigel-coated wells containing EGM2 medium.

Supplementary Tables

Table S1. List of patients included in the study

Number	Age (months)	Gender	Localization	Treatment
1	4	F	Neck	-
2	4	F	Ass	-
3	6	M	Retro-auricular	-
4	7	M	Left flank	-
5	7	F	Back	-
6	8	F	Torso	-
7	11	F	Axillary	-
8	12	M	Tempe	-
9	13	F	Pelvis	-
10	13	M	Postauricular	-
11	19	F	Temple and chin	-
12	21	F	Back	-
13	23	M	Cheek	-
14	25	F	Lips	-
15	27	M	Abdomen and elbow	-
16	28	M	Forehead	-
17	32	F	Arm	-
18	32	F	NA	-
19	33	F	Shoulder	-
20	36	F	Forehead	-
21	38	F	Cheek	-
22	41	M	Left neck	-
23	43	M	Scalp	-
24	45	F	Back	-
25	55	F	Hand	-
26	57	F	Thorax	-
27	60	F	Right flank	-
28	69	F	Right upper lip	-
29	69	M	Back	-
30	72	F	Forehead	-
31	75	F	Thorax	-
32	83	M	Torso	-
33	94	M	Torso	-
34	110	F	Thorax	-
35	123	F	Neck	-
36	131	F	Torso	-
37	4	F	Cervical anterior	Propranolol
38	6	F	Scapular	Propranolol
39	7	M	Iliac crest	Propranolol
40	9	F	Lumbar	Propranolol
41	12	M	Hemangiomatosis	Propranolol
42	18	M	Left arm	Propranolol
43	23	M	Upper lips	Propranolol
44	25	F	Shoulder	Propranolol
45	26	F	Interbrow	Propranolol
46	27	F	Forehead	Propranolol
47	30	F	Forearm	Propranolol
48	33	F	Periorbital Temporal	Propranolol
49	33	F	Axillary	Propranolol
50	33	F	Eyebrow	Propranolol
51	43	M	Forehead	Propranolol
52	59	F	Eyebrow	Propranolol
53	80	M	Lips	Propranolol
54	110	F	Back	Propranolol

Table S2. Primary antibodies used for immunohistochemistry and western blot

Antibody	Reference	Provider	Concentration	Incubation	Experimentation
Glut-1	PA1-21041	Thermofisher	1/200	Overnight 4°C	HIC
Ki67	NCL-L-Ki67- MM1	Leica	1/200	Overnight 4°C	HIC
DAPI	D9542	Sigma-Aldrich	1/10 000	15 minutes RT	HIC
TH	SAB4502964	Sigma-Aldrich	1/200*-1/1 000**	Overnight 4°C	HIC*, WB**
DDC	HPA017742	Sigma-Aldrich	1/200*-1/500*	Overnight 4°C	HIC*, WB**
DBH	PA5-34664	Thermofisher	1/200*-1/5 000*	Overnight 4°C	HIC*, WB**
PNMT	ab119784	Abcam	1/50*-1/500**	Overnight 4°C	HIC*, WB**
CD34	MA1-10202	Thermofisher	1/200	Overnight 4°C	HIC
α -SMA	ab7817	Abcam	1/500-1/250	Overnight 4°C	HIC*, HCC****
β -actin	A2228	Sigma-Aldrich	1/10 000	Overnight 4°C	WB
GAPDH	#2118S	Cell signaling	1/10 000	Overnight 4°C	WB
CD31	M0823	Dako	1/20	Overnight 4°C	HCC
CD146	#2505-1	Epitomics	1/250	Overnight 4°C	HCC
NG2	MAB2585	R&D systems	1/20	Overnight 4°C	HCC
PDGFR β	sc-339	Santa Cruz	1/50	Overnight 4°C	HCC
AQP1	sc-25287	Santa cruz	1/50	Overnight 4°C	HIC

RT: Room Temperature

PARTIE 3 : ETUDE DU CIBLAGE *IN VITRO* DE LA VOIE BETA-ADRENERGIQUE DANS L'ANGIOSARCOME

Article 3 : en préparation

MATERIELS ET METHODES

1. Culture cellulaire

Deux lignées d'angiosarcomes humains ont été utilisées pour les expérimentations de cette étude et nous ont été fournies par le Dr E. Pasquier, Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille, Université de Marseille, France et produites par le professeur Masuzawa, Département de Dermatologie, Université de médecine de Kitasato, Japon.

- MO-LAS : lignée cellulaire développée à partir d'un patient âgé de 77 ans atteint d'un angiosarcome cutané d'origine lymphatique (visage et cuir chevelu) qui a métastasé dans plusieurs organes dont les poumons, le foie et les ganglions lymphatiques. Les cellules ont été isolées à partir d'une métastase pulmonaire par centrifugation de l'épanchement pleural¹⁷¹. Les cellules expriment les marqueurs vasculaires CD31, D2-40/podoplanine, NZ-1 et VEGFR-3 mais pas le facteur vWF. Les cellules MO-LAS ont été cultivées dans un milieu de culture pour cellules endothéliales ECGM2 (Endothelial Cell Growth Medium 2 ; Promocell) additionné du pack de suppléments ECGM (Promocell), 1% v/v Penicilline-Streptomycine (10 000 unités / ml de pénicilline et 10 000 µg / ml de streptomycine).
- ISO-HAS : lignée cellulaire isolée à partir d'une lésion antéro-auriculaire métastatique d'un patient âgé de 84 ans atteint d'un angiosarcome primaire du cuir chevelu d'origine sanguine¹⁷². Ces cellules sont positives pour CD31 mais expriment peu le facteur vWF. Les cellules ISO-HAS, d'abord cultivées en milieu DMEM supplémenté de 10% de sérum de veau fœtal, 1% v/v Penicilline-Streptomycine, ont montré un faible taux de croissance et une altération de leur morphologie fusiforme. Les cellules cultivées en milieu ECGM2 ont montré une meilleure croissance cellulaire ainsi qu'une morphologie typique. Elles ont donc été cultivées dans ce milieu supplémenté comme pour les MO-LAS pour le reste des expérimentations.

Les deux lignées cellulaires ont été cultivées en flasque T75 (Falcon) dans un incubateur humide à 5% CO₂ et 37°C. Les cellules ont été divisées (1 : 3) à 90-95% de confluence. Les cultures cellulaires ont été régulièrement testées pour la contamination de mycoplasmes par PCR.

2. Transduction lentivirale

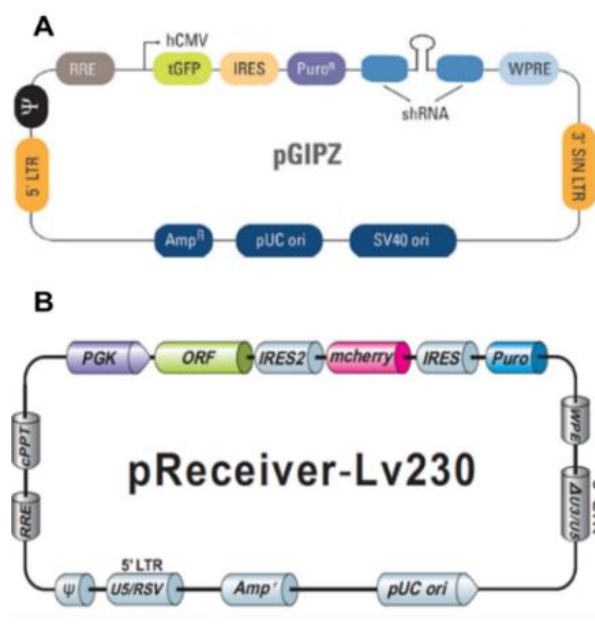


Figure 30 : Carte des vecteurs utilisés pour moduler l'expression d'ADRB2 et d'AQP1. (A) Vecteur d'expression des shARN d'AQP1 et d'ADRB2. **(B)** Vecteur de surexpression d'AQP1.

Pour la modulation de l'expression d'AQP1 et d'ADRB2, les cellules MO-LAS et ISO-HAS ont étéensemencées à raison de 1×10^4 cellules/cm² en plaque 6 puits dans le milieu de culture ECGM2, cultivées 24 h à 37°C puis transduites avec des vecteurs lentiviraux à une MOI de 40 (multiplicity of infection) dans un volume final de 2 ml pendant 6 h. Les virus ont ensuite été dilués par ajout de 2 ml de milieu neuf et les cellules rincées 24 h après. Pour diminuer l'expression d'AQP1 et d'ADRB2, des vecteurs lentiviraux pGIPZ (Thermo Fisher Scientific) portant les séquences qui codent la GFP et un shARN ciblant l'ARNm d'ADRB2 (shADRB2), d'AQP1 (shAQP1) ou ne ciblant aucune séquence (shCT) ont été utilisés. Pour la surexpression d'AQP1, des vecteurs de surexpression (pReceiver-Lv230-AQP1) contenant la séquence ADNc du variant 1 (NM_198098.3) d'AQP1 (pAQP1) ou ne contenant aucun ADNc (pNEG) (GeneCopoeia, Inc, MD, USA) ont été utilisés (Figure 30). Ils portent également la

séquence ADNc de la protéine rapportrice mCHERRY. Les deux types de vecteurs portent un gène de résistance à la puromycine pour la sélection et l'amplification des cellules exprimant le transgène de manière stable. Les particules virales ont été produites par la plateforme de Vectorologie (INSERM US 005 – CNRS 3427 – TBMCore, Université de Bordeaux, France). Pour la sélection à la puromycine, une gamme de concentration de l'antibiotique a été réalisée afin de déterminer la concentration optimale correspondant à la plus faible concentration de puromycine qui permet l'élimination de la totalité des cellules non transduites après 5 jours de traitement. Ces concentrations sont $1 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ pour les MO-LAS et $1.5 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ pour les ISO-HAS. Après traitement à la puromycine, l'expression des protéines rapportrices GFP (pour les sous-expressions) et mCHERRY (pour la surexpression) a été observée au microscope à fluorescence ZOE (ZOE Cellule Fluorescence Imager, Bio-rad). Le pourcentage de cellules GFP⁺ a été mesuré sur plusieurs semaines grâce à un compteur de cellules à fluorescence (Luna-FL, Logos Biosystems) pour vérifier la stabilité d'expression des shARN. Le système utilisé ne permet pas de déterminer le pourcentage de cellules mCherry⁺. L'efficacité de transduction de la surexpression a été vérifiée régulièrement au microscope à fluorescence.

3. Immunomarquages

3.1. Immunofluorescence

Des échantillons de tumeurs d'angiosarcomes épithélioïdes de 2 patients ont été obtenus grâce à la collaboration avec le Dr M.L. Jullié du service d'Anatomie Pathologique de l'hôpital Haut Lévêque et utilisés pour cette étude.

Des immunomarquages ont été réalisés pour démontrer l'expression du marqueur endothélial CD31 et CD34 ainsi que pour évaluer l'expression d'AQP1 et d'ADRB2 dans l'angiosarcome.

Les marquages ont été réalisés sur des coupes de $4 \mu\text{m}$ de tissus d'angiosarcomes humains fixés dans le formol et inclus en paraffine. Après déparaffinage des sections de tissus par la chaleur, les sites antigéniques ont été démasqués dans un tampon citrate à pH6 dans un appareil PT Link (Dako, Agilent, USA) pendant 20 minutes à 97°C . Les coupes ont ensuite été incubées sur la nuit à 4°C avec les anticorps

primaires. Après 1 h d'incubation à température ambiante avec les anticorps secondaires couplés aux fluorophores Alexa fluor 488- ou 555, les noyaux ont été visualisés par contre-coloration au 4', 6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI) pendant 20 minutes. Les échantillons ont été incubés avec les anticorps primaires dirigés contre CD34, CD31, ADRB2 et AQP1 (Tableau 3). Les images ont été acquises à un objectif x40 en utilisant un microscope à épi fluorescence (Nikon) associé à un logiciel d'acquisition NIS-Element.

3.2. Immunocytofluorescence

Des marquages par immunocytofluorescence ont été réalisés sur les lignées d'angiosarcome MO-LAS et ISO-HAS pour vérifier l'expression des marqueurs endothéliaux CD31 et CD34 ainsi que pour évaluer l'expression d'AQP1 et des récepteurs ADRB2 et PDGFR- α .

Les cellules ont étéensemencées dans des chambres de culture stériles amovibles délimitées par des séparateurs en polystyrène fixés à une lame de verre stérile à la densité cellulaire de 1×10^4 cellules/chambre ($0,7\text{cm}^2$) dans un volume final de 0,5 ml de milieu de culture. La surface de la lame est spécialement traitée pour la culture et la croissance de cellules adhérentes et contient 8 puits. Les cellules ont été cultivées 24 h à 37°C , 5% CO_2 avant fixation 10 minutes à température ambiante au paraformaldéhyde 4% et saturation dans une solution de BSA 5% 1 h à température ambiante. Les cellules sont incubées avec les anticorps primaires une nuit à 4°C puis avec les anticorps secondaires 1 h à température ambiante. Les noyaux sont révélés par 20 minutes d'incubation à température ambiante dans le DAPI. Les images ont été acquises à un objectif x40 en utilisant un microscope à épi fluorescence (Nikon) associé à un logiciel d'acquisition NIS-Element. Les marquages ont été réalisés trois fois en utilisant des cellules à différents passages.

Anticorps	Référence	Concentration	Incubation
CD31	ab28364	1/40	Overnight 4°C
CD34	MA1-10202	1/400	Overnight 4°C
AQP1	sc-25287	1/50	Overnight 4°C
ADRB2	sc-25287	1/50	Overnight 4°C
DAPI	D95542	1/10 000	20 minutes RT
PDGFR-α	ab61219	1/400	Overnight 4°C
Goat Anti-Mouse 555	ab150114	1/500	1 heure RT
Goat Anti-Rabbit 488	ab150077	1/500	1 heure RT

Tableau 3 : Anticorps primaires et secondaires utilisés pour les immunomarquages.
RT : Température ambiante

4. Etude moléculaire

4.1. RT-qPCR

L'expression des gènes AQP1, ADRB1 et ADRB2 a été mesurée par RT-qPCR sur les lignées MO-LAS et ISO-HAS. Après lyse des cellules et isolation des ARN totaux, les ADNc ont été produits par transcription inverse en incubant 500 ng des ARN extraits dans un tampon réactionnel contenant des amorces random et oligo-d(T), la reverse transcriptase, des dNTPs ainsi qu'un inhibiteur de la ribonucléase. Les ADNc ont ensuite été incubés avec une Taq Polymerase, des dNTPs, du SYBER green, des amorces spécifiques d'AQP1, ADRB1 et ADRB2 ou du gène de ménage GUS-β (Glucuronidase β) puis soumis à 40 cycles d'amplification. Les ADNc amplifiés ont été marqués et quantifiés à l'aide du SYBR Green, agent intercalant de l'ADN, qui émet une fluorescence mesurable en temps réel. Les cycles seuils d'amplification exponentielle (Ct) des différents produits PCR analysés ont été normalisés par rapport au Ct de GUS-β. Les résultats sont exprimés sous la forme $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ($\Delta Ct = Ct_{\text{échantillon}} - Ct_{\text{échantillon contrôle}}$), $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{échantillon mesuré}} - \Delta Ct_{\text{échantillon contrôle}}$).

ADRB1	ADRB1sens	AGA-CCC-TGT-GTG-TCA-TTG-CC
	ADRB1antisens	AGC-ACT-TGG-GGT-CGT-TGT-AG
ADRB2	ADRB2antisens	ATG-GGC-ACT-TTC-ACC-CTC-TG
	ADRB2antisens	GCT-CCG-GCA-GTA-GAT-AAG-GG
AQP1	AQP1sens	CTC-TCT-GTA-GCC-CTT-GGA-CAC
	AQP11antisens	ATG-AGT-ACA-GCC-AGG-GCT-CC
GUSb	GUS-F	GTT-TCA-CCA-GGA-TCC-ACC-TC
	GUS-R	CTC-GTC-GGT-GAC-TGT-TCA-GT

Tableau 4 : Liste des oligonucléotides utilisés pour la RT-qPCR.

4.2. Western Blot

Un western blot a été réalisé sur les lignées MO-LAS et ISO-HAS pour quantifier de manière relative la surexpression de la protéique AQP1 dans les cellules transduites.

Les échantillons protéiques ont été obtenus par 5 minutes d'incubation sur glace des culots cellulaires avec un tampon de lyse de type RIPA contenant 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 0,1% SDS (sodium dodecyl sulfate), 1% NP-40, 0,5% sodium déoxycholate et 1µg/ml de cocktail d'inhibiteurs de protéases et de phosphatases (Sigma-Aldrich). Les lysats ont été centrifugés 20 minutes à 13 000 rpm à 4°C et les surnageants ont été transférés dans de nouveaux tubes eppendorf. Les concentrations protéiques ont été ensuite quantifiées à l'aide d'un kit de dosage protéique colorimétrique (Thermo Scientific™ Pierce™ BCA Protein Assay Kit, absorbance à 562 nm). La dénaturation des protéines totales a été réalisée par chauffage dans du tampon Laemmli contenant du β-mercaptoéthanol pendant 5 minutes à 90°C.

Pour le SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis), les protéines ont été séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide. Le gel de migration à 12% a été préparé par mix de 3,4 ml d'eau distillée, 4 ml de Bis/Acrylamide, 2,5 ml de Tris-HCl 0,5 M pH 6,8 et 0,1 ml de SDS 10% (Sodium Dodecyl Sulfate) additionnés de 50 µl d'APS (Ammonium Persulfate) 10% et 5 µl de TEMED (tétraméthyléthylènediamine). Le gel de concentration est obtenu par mix de 6,1 ml

d'eau distillée, 1,3 de Bis/Acrylamide, 2,5 ml de Tris-HCl 1,5 M pH 8,8, 0,1 ml de SDS 10% additionnés de 50 µl d'APS et 10 µl de TEMED. Les protéines ont été ensuite déposées sur le gel SDS-PAGE. La migration a été effectuée par électrophorèse dans un tampon de migration TRIS-glycine contenant 0,01% de SDS 30 minutes à 55 V puis 1 h à 120 V. Le transfert protéique a été réalisé sur une membrane de polyfluorure de vinylidène (PVFD, Amersham) dans un tampon TRIS-glycine à 20% de méthanol 1 h à 100 V.

La membrane a ensuite été saturée dans une solution de TBS-Tween contenant 5% de lait écrémé pour masquer les sites de liaison non spécifiques des anticorps primaires puis incubée sur la nuit à 4°C avec les anticorps primaires anti-AQP1 et anti-β-actine. Après rinçages au PBST 0,1%, la membrane a été incubée avec les anticorps secondaires appropriés couplés à la peroxydase de raifort (HRP) 1 h à température ambiante. Les protéines d'intérêt ont finalement été révélées en utilisant le substrat chimio-luminescent de la HRP, l'ECL (Clarity™ Western ECL Substrat, Biorad).

5. Drogues et molécules chimiques

Les formulations cliniques de propranolol (Karnodyl, Primius Lab Ltd) et de noradrénaline (Mylan) ont été obtenues de la Pharmacie de l'Hôpital de Bordeaux.

6. Tests fonctionnels *in vitro*

Des expériences ont été réalisées pour explorer l'effet du propranolol sur les cellules en utilisant des modèles tumoraux 2D et 3D.

6.1. Test de croissance et de cytotoxicité

Un test de prolifération colorimétrique SRB (Sulforhodamine B) a été réalisé sur l'ensemble des constructions génétiques des lignées MO-LAS et ISO-HAS : shCT, shADRB2, shAQP1, pNEG, pAQP1 afin de déterminer leur courbe de croissance. Six cents cellules vivantes ont étéensemencées en plaque 96 puits dans 200 µl de milieu de culture par puits. La croissance a été déterminée à 24, 48, 72 et 96 h. A chaque temps d'arrêt, le milieu de culture a été retiré des puits et les cellules ont été fixées avec une solution de 10% de TCA (Trichloroacetic Acid) 1 h à 4°C. La solution de

fixation a ensuite été retirée et les cellules lavées 5 fois à l'eau distillée puis séchées avant d'être incubées avec 0,4% de SRB 10 minutes à température ambiante. Les cellules ont ensuite été lavées 5 fois avec 1% d'acide acétique. Le chromophore lié aux protéines cellulaires a été dissout dans un tampon de Tris Base 10 mM et l'absorbance a été mesurée à une longueur d'onde de 515 nm à l'aide d'un lecteur de plaques (CLARIOstar® BMG LABTECH). Le test a permis de déterminer différents paramètres de croissance dont le pourcentage de croissance (ratio DO_{515nm} à Txhr / DO_{515nm} à 24 h), le taux de croissance et le temps de doublement des cellules, calculé comme $\ln(2)/K$ (K : constante de vitesse).

Pour évaluer la cytotoxicité du propranolol, un test d'inhibition de croissance par test SRB a été réalisé selon le même protocole. Les cellules ont étéensemencées à une densité de 800 cellules/puits en plaque 96 puits et cultivées 24 h avant d'être traitées avec des concentrations croissantes de propranolol (0, 0,3, 1, 3, 10, 30, 40, 50, 75 et 100 μ M) pendant 48 h. Trois réplicas/dose de propranolol ont été fixés au TCA 10% à 24 h et 48 h.

6.2. Test de migration

La motilité cellulaire a un rôle important dans plusieurs processus normaux et pathologiques tels que l'angiogenèse, l'invasion et la formation de métastases. Pour mesurer l'effet du propranolol et des différentes constructions génétiques (sous expression d'AQP1 et d'ADRB2 et surexpression d'AQP1) sur la migration des cellules MO-LAS et ISO-HAS, deux approches *in vitro* de test de migration ont été utilisées.

a. Scratch Assay

Les cellules MO-LAS et ISO-HAS contrôles ou surexprimant AQP1 ont étéensemencées en plaque 24 puits à raison de 1×10^5 cellules/puits dans un volume final de 0,5 ml de milieu de culture. Les cellulesensemencées ont été cultivées 24 h à 37°C jusqu'à obtention d'une monocouche de cellules confluentes.

Les cellules ont ensuite été rincées deux fois au PBS avant de réaliser manuellement une brèche verticale par puits à l'aide d'une pointe de cône de pipette p200. Les débris cellulaires ont été retirés par deux rinçages au PBS et le propranolol dilué dans le

milieu de culture aux concentrations finales de 1, 3, 10 et 50 μM a été ajouté aux cellules dans un volume final de 0,5 ml. Pour obtenir le même champ durant l'acquisition d'image, des marques en dessous de chaque puits sur la face externe de la plaque ont été réalisées à l'aide d'un marqueur fin pour servir de points de référence à proximité des brèches. Les cellules bordant la brèche créée migrent pour la refermer. Des captures d'images ont été réalisées par microscopie inversée avec contraste de phase en objectif x4 en début d'expérimentation après la création de la brèche (T0) et à intervalles réguliers sur une période de 48 h, à raison d'une image par puits prise au même endroit à tous les temps. Les images à différents temps ont été analysées quantitativement par mesure de la largeur des brèches (μm) à l'aide du logiciel d'analyse d'image NIS-Element associé au microscope (Nikon). Le pourcentage de migration cellulaire a été calculé selon la formule :

$$\% \text{ de migration} = [(\text{largeur } t=0\text{h} - \text{largeur } t=x\text{h}) / \text{largeur } t=0\text{hr}] \times 100\%.$$

b. Test de migration par système IncuCyte

Pour observer la dynamique de la migration cellulaire en temps réel, nous avons réalisé un test de migration en utilisant le système de migration par IncuCyte (IncuCyte® Scratch Wound Assay). Ce système permet de suivre la migration des cellules par imagerie en temps réel et offre une analyse automatisée. Les cellules MO-LAS et ISO-HAS contrôles ou surexprimant AQP1 ont été ensemencées en plaque 96 puits à une densité de 1×10^4 cellules par puits dans un volume final de 200 μl de milieu de culture. Après adhésion des cellules en monocouche cellulaire pendant 24 h, le module WoundMaker™ (96 Well Wound Maker, Essen Bioscience) qui est un dispositif mécanique pourvu de 96 picots, a été utilisé pour créer des brèches homogènes de 700-800 μm de large par puits sur la microplaque de 96 puits. Le milieu de chaque puits a ensuite été aspiré et les cellules rincées deux fois au PBS pour retirer les débris cellulaires avant l'ajout de 100 μl de milieu de culture contenant ou non 10 et 50 μM de propranolol. La microplaque a ensuite été placée dans l'appareil IncuCyte installé dans l'incubateur. L'acquisition d'images a été réalisée à intervalles réguliers de 2 h pendant 24 h grâce à un microscope inversé à contraste de phase avec un objectif

x10. L'appareil dispose d'un algorithme d'analyse intégré qui permet d'identifier pour chaque image la position de la brèche dépourvue de cellules et mesure ainsi la largeur, la confluence et la densité relative de la brèche à chaque temps. Le pourcentage de migration est exprimé sous forme de densité relative de la brèche, RWD (Relative Wound Density) obtenue avec la formule suivante :

$$\%RWD(t) = 100 \times (w(t) - w(t_0)) / (c(t) - w(t_0))$$

$w(t)$ = densité de la région de la brèche au temps, (t)

$c(t)$ = densité de la région cellulaire au temps, (t)

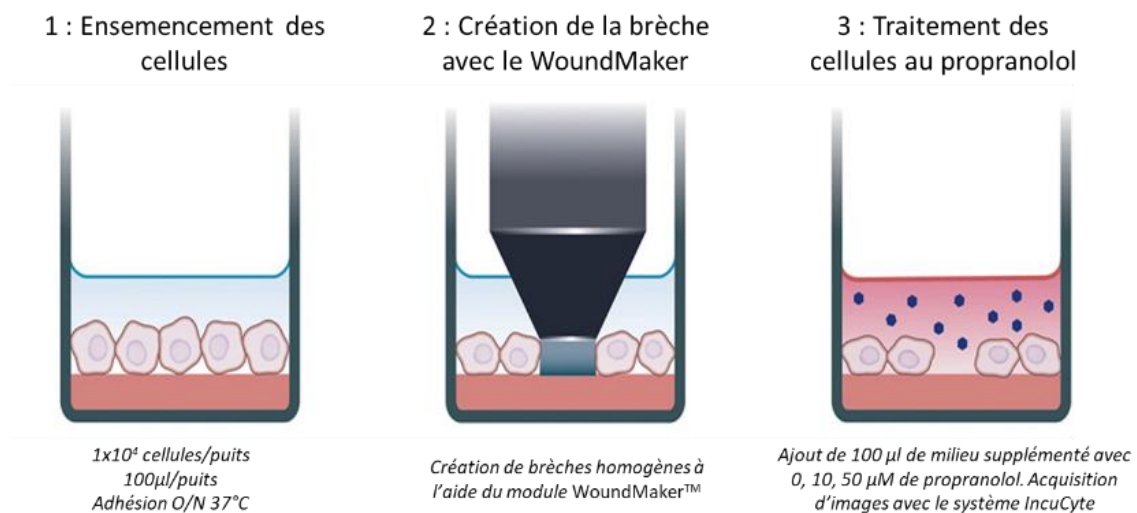


Figure 31 : Protocole de Scratch Assay sur système IncuCyte.

6.3. Génération de sphéroïdes tumoraux 3D par agrégation cellulaire

La culture cellulaire bidimensionnelle ne modélise pas de manière adéquate le comportement *in vivo* des tumeurs. Nous avons développé un modèle tumoral 3D *in vitro* avec les lignées MO-LAS et ISO-HAS contrôles ou invalidées pour le récepteur ADRB2 (shCT, shADRB2) pour étudier les effets du propranolol comme potentiel agent anti-cancéreux. Les modèles de culture cellulaire 3D tels que les sphéroïdes permettent de mimer entre autres l'organisation structurale, l'assemblage cellulaire en multicouches et l'hypoxie, caractéristiques des tumeurs solides. Le modèle sphéroïde

permet l'attachement, la croissance, la migration et l'invasion des cellules en utilisant ou non une matrice artificielle 3D. Dans cette étude, un modèle 3D sans matrice a été réalisé et a permis la formation de micro-tissus tridimensionnels sous forme d'agrégats que l'on nomme sphéroïdes.

Pour la génération de sphéroïdes, à 70-80% de confluence, les cellules MO-LAS et ISO-HAS ont été dissociées avec la trypsine 0,25%/0,1% EDTA pendant 5 minutes à 37°C. Après centrifugation et comptage, les cellules ont été re-suspendues à une densité finale de 1×10^4 cellules/0,1 ml dans du milieu de culture complet contenant 0,5% de méthylcellulose. Le milieu a été préparé avec ou sans propranolol à 10, 50 et 100 μ M. La suspension cellulaire a ensuite étéensemencée à raison de 100 μ l/puits en plaque 96 puits à fond rond pour la culture de cellules en suspension (SARSTEDT, France) puis incubées à 37°C, 5% CO₂ pendant 5 jours pour permettre la formation de sphéroïdes individuels dans chaque puits. Nous avons utilisé le système d'imagerie automatisé en temps réel IncuCyte® qui permet des acquisitions sur cellules vivantes directement dans l'incubateur à l'intérieur duquel l'appareil est déjà installé. Pour tester l'effet du propranolol sur les sphéroïdes, deux approches ont été utilisées :

- Le bêtabloquant a été ajouté à différentes doses (10, 50, 100 μ M) dans le milieu de formation de sphéroïdes au moment de l'ensemencement. Cette approche permet de tester l'effet du propranolol sur la capacité de formation des sphéroïdes par les cellules.
- Le bêtabloquant a été ajouté aux cellules dans chaque puits après la formation des sphéroïdes. Pour cela, 100 μ L de mix propranolol-méthylcellulose ont été doucement ajoutés dans la paroi interne de chaque puits de la plaque 96 puits. Cette approche permet de tester l'effet du propranolol sur les sphéroïdes déjà formés.

L'aténolol, bêtabloquant sélectif des récepteurs ADRB1 a également été testé à 50 μ M pour étudier l'implication du récepteur ADRB1 dans la génération de sphéroïdes par les cellules transduites (MO-LAS shCT et shADRB2, ISO-HAS shCT et shADRB2).

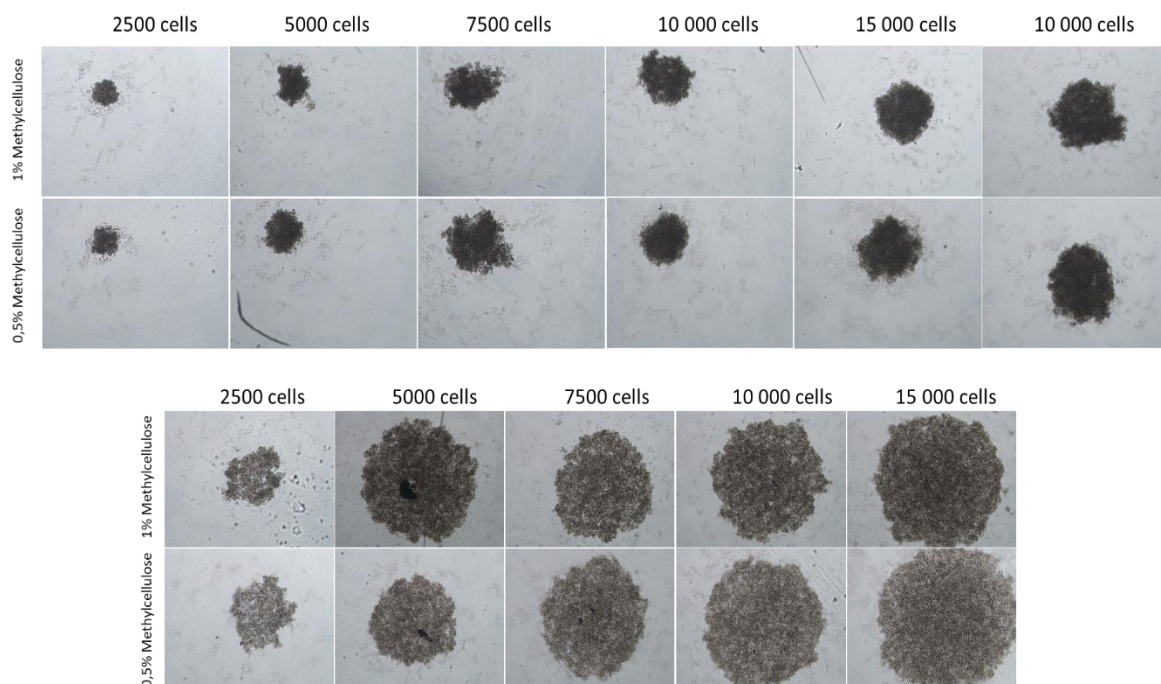


Figure 32 : Mise au point du test de sphéroïdes. Mise au point de la densité cellulaire et de la concentration de méthylcellulose optimales pour la formation d'agrégats cellulaires. **(A)** : Lignée MO-LAS à J3. **(B)** : Lignée ISO-HAS à J4.

L'acquisition d'images est paramétrée en début d'expérimentation et est réalisée grâce à un microscope à contraste de phase sur un objectif x10 et à intervalles réguliers de 2 h pendant 5 jours. L'analyse des résultats a été effectuée à l'aide du module dédié à l'analyse des sphéroïdes du logiciel de l'appareil Incucyte® (Incucyte® Spheroid Analysis Software Module) pour déterminer l'aire des sphéroïdes dans chaque puits.

6.4. Test de viabilité cellulaire au MTS

Afin de vérifier si le propranolol induit la mort cellulaire ou un arrêt de la prolifération dans les sphéroïdes tumoraux, un test de quantification des cellules viables au MTS (3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxyméthoxyphényl)-2-(4-sulfophényl)-2H-tétrazolium, inner salt) a été réalisé sur les sphéroïdes après leur dissociation enzymatique et mécanique. C'est un test colorimétrique de quantification des cellules vivantes métaboliquement actives et capables de réduction du composé tétrazolium MTS pour générer un produit de formazan coloré. Après cinq jours de traitement au

propranolol, une solution de MTS (1 : 20) a été ajoutée à chaque puits correspondant à un sphéroïde. Après 2 h d'incubation, l'absorbance a été mesurée à 490 nm à l'aide d'un lecteur de plaque (CLARIOstar® BMG LABTECH).

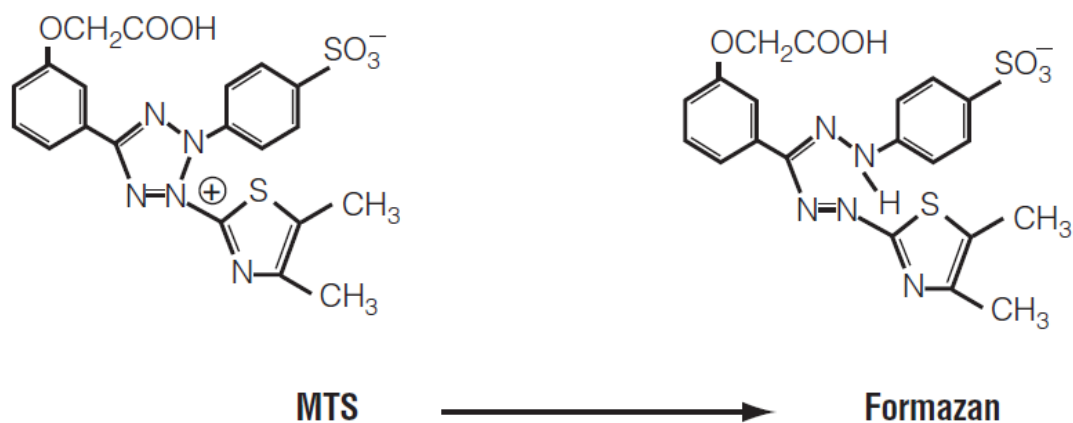


Figure 33 : Structure du MTS tetrazolium et son produit, le Formazan.

7. Etude protéomique

Une étude protéomique par spectrométrie de masse a été réalisée sur la lignée MO-LAS afin d'identifier de potentielles cibles du propranolol sur ces cellules.

Un test de migration en scratch a été réalisé à l'aide du kit Cell Comb™ Scratch Assay, MILLIPORE. Brièvement, les cellules ont étéensemencées à une densité de $4,5 \times 10^6$ cellules dans des plaques de culture de 100 cm² et cultivées 24 h à 37°C, 5% CO₂ pour former une monocouche de cellules confluentes. Des brèches unidirectionnelles ont ensuite été réalisées à l'aide d'un peigne cellulaire (Figure 34). Les cellules ont été lavées au PBS avant d'être traitées 10 h par 50 μM de propranolol. Des échantillons protéiques ont été obtenus par lyse des cellules (*cf.* western blot) et 20 μg de protéines ont été utilisées pour l'analyse protéomique à la plateforme Protéome CGFB de Bordeaux. Le protocole de préparation des échantillons, de la digestion protéique et de l'analyse par spectrométrie de masse est détaillé dans le fichier supplémentaire de l'article 1. Les données de protéomique ont été analysées à l'aide du logiciel Ingenuity Pathway Analysis (IPA, Qiagen) afin d'identifier les voies de signalisation modulées dans notre analyse comparative.

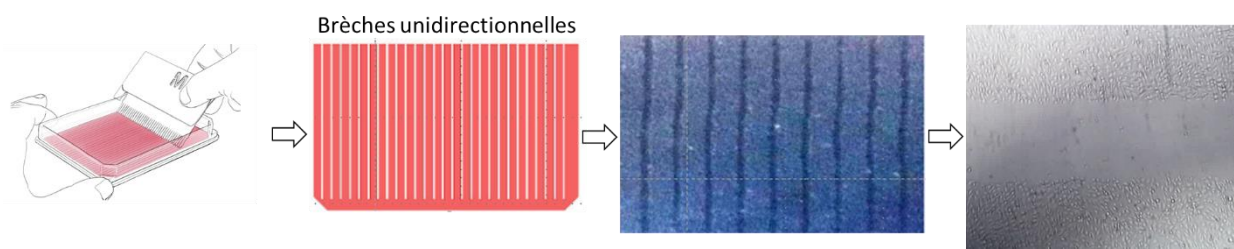


Figure 34 : Test de migration par Cell Comb™ Scratch Assay.

Les conditions mentionnées dans le tableau 5 ont été comparées après analyse.

Conditions étudiées	No Scratch CT	Scratch CT	No Scratch Propranolol	Scratch propranolol
No Scratch CT		X	X	
Scratch CT				X

Tableau 5 : Comparaison des groupes analysés par protéomique.

8. Analyse statistique

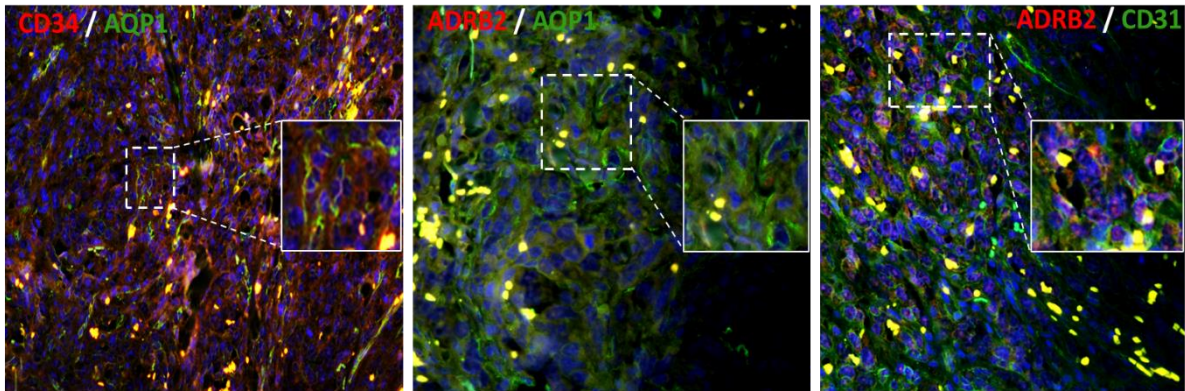
Le test de student a été utilisé pour comparer deux séries de données. Les comparaisons de plusieurs séries ont été analysées en utilisant un test One-way ANOVA (1 groupe de séries) et un test Two-way ANOVA (plusieurs groupes de séries). Une $p\text{-value} < 0,05$ (*) a été considérée comme significative. Les résultats sont présentés sous forme de moyennes \pm l'erreur standard à la moyenne (SEM). Les analyses ont été réalisées avec le logiciel GraphPad Prism V8 (GraphPad Inc).

RESULTATS

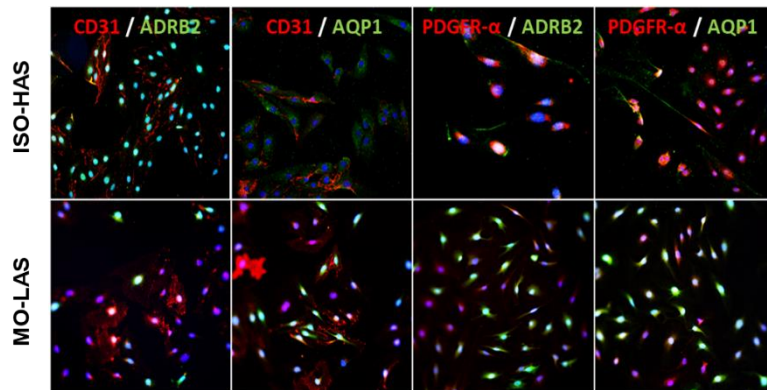
Caractérisation des marqueurs d'intérêt dans l'angiosarcome et sur les lignées humaines d'angiosarcome MO-LAS et ISO-HAS

L'AQP1, normalement exprimée dans les reins, les globules rouges et l'endothélium vasculaire notamment, est surexprimée dans certaines tumeurs solides associées à un mauvais pronostic. Les marquages réalisés sur les tissus d'angiosarcomes épithélioïdes ont montré une expression d'AQP1, notamment au niveau des membranes des cellules tumorales localisées dans la masse tumorale (Figure 35A). Ces cellules sont également positives pour les marqueurs CD34 et CD31, preuve de leur phénotype endothélial, et pour le récepteur ADRB2. Ces marquages sont une preuve de l'expression d'AQP1 dans l'angiosarcome et nécessitent un *screening* plus large sur d'avantage de patients. Les marquages réalisés sur les cellules *in vitro* montrent une expression d'AQP1 dans les deux lignées tumorales, dont la localisation est à la fois membranaire et cytoplasmique, ainsi que d'ADRB2 (Figure 35B). Les cellules expriment fortement le marqueur endothélial CD31, localisé au niveau membranaire et sont également positives pour PDGFR- α . Enfin, l'analyse des ARNm d'AQP1 et des récepteurs ADRB1 et ADRB2 montre une forte expression d'AQP1 et d'ADRB2 dans les deux lignées (Figure 35C). La lignée MO-LAS exprime en plus le récepteur ADRB1. Les deux lignées n'expriment pas le récepteur ADRB3, dont le niveau d'ARNm est en dessous du seuil de détection. Ces résultats justifient l'intérêt de cibler *in vitro* AQP1 et la voie bêta-adrénergique.

A



B



C

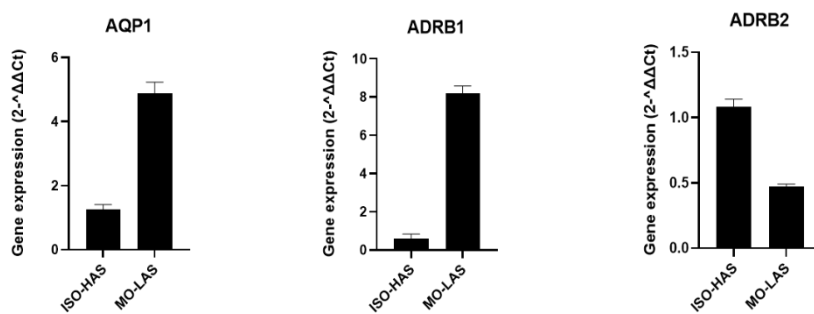


Figure 35 : Expression d'AQP1 et des récepteurs ADRB dans l'angiosarcome. (A) IHF d'un patient d'angiosarcome pour les marquages endothéliaux CD31 (vert), CD34 (rouge) et pour AQP1 (vert), ADRB2 (rouge). Les globules rouges sont jaunes (co-marquages). **(B)** ICF réalisées sur les lignées tumorales ISO-HAS et MO-LAS pour les marquages CD31 (rouge), AQP1 (vert), ADRB2 (vert) et PDGFR- α (rouge). Les marquages et la spécificité des anticorps ont été validés. Grossissement x40. **(C)** Expression de l'ARNm d'AQP1 et des récepteurs ADRB1 et ADRB2 dans les cellules ISO-HAS et MO-LAS.

Validation des modèles cellulaires utilisés

Afin d'étudier l'effet du propranolol sur l'axe ADRB2/AQP1, l'efficacité des différentes constructions génétiques des lignées ISO-HAS et MO-LAS a été testée par RT-qPCR. Le shRNA AQP1 a permis de diminuer le taux d'ARNm de 50% pour les ISO-HAS et de 80% pour les MO-LAS. De même, le shRNA ADRB2 a induit une diminution de 75% pour les ISO-HAS et de 85% pour les MO-LAS (Figure 36A). Il est également à noter que la sous expression du récepteur ADRB2 n'induit pas de variation de l'expression de l'ARNm d'AQP1, et inversement. La surexpression d'AQP1 dans les cellules a été confirmée par RT-qPCR et western blot (Figure 36B).

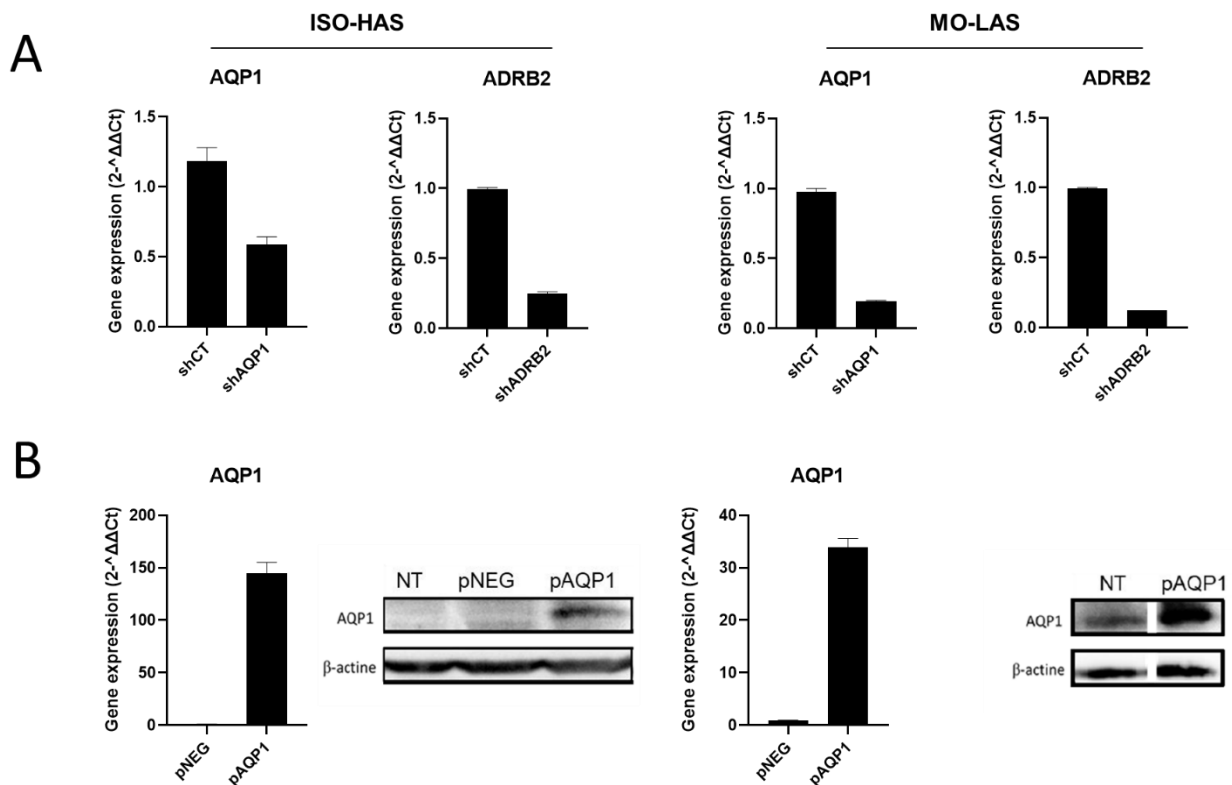


Figure 36 : Validation des modèles cellulaires utilisés. (A) Mesure de l'efficacité de transduction par qPCR dans les lignées ISO-HAS (gauche) et MO-LAS (droite) des gènes AQP1 et ADRB2 en utilisant des vecteurs lentiviraux shARN. **(B)** Vérification de l'efficacité de surexpression d'AQP1 par qPCR et western blot dans les lignées ISO-HAS (gauche) et MO-LAS (droite) en utilisant le vecteur de surexpression pAQP1.

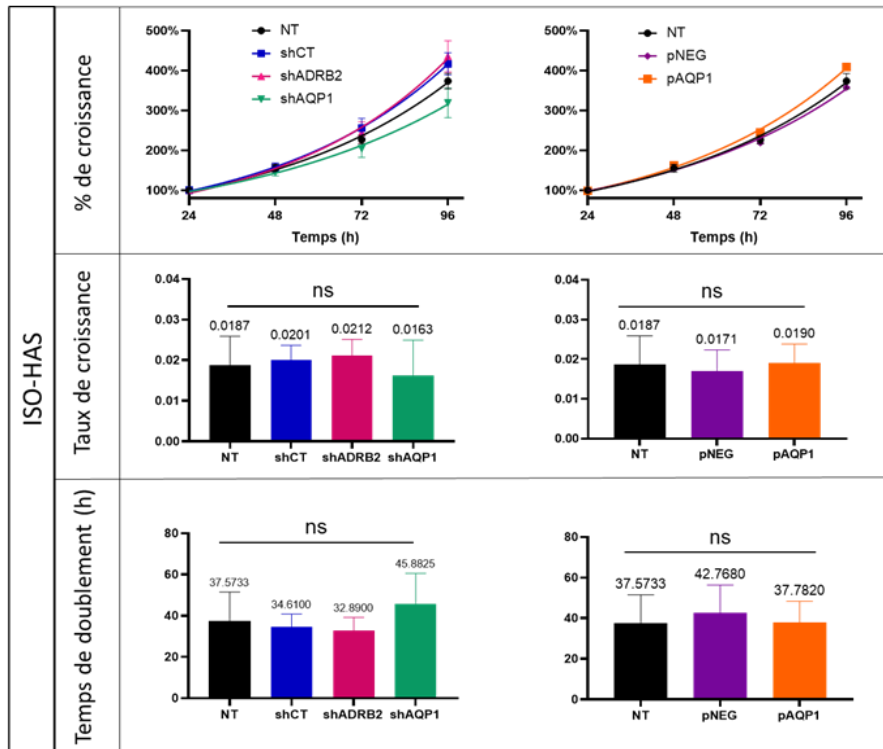
Etude de l'effet des modulations géniques sur la croissance cellulaire

Compte tenu de la sensibilité des tests de migration aux fluctuations de la prolifération, il est nécessaire que les modifications d'expression réalisées n'impactent pas la croissance cellulaire de manière significative. Les résultats du test SRB ne montrent aucune différence significative des sous expression d'AQP1 et d'ADRB2 et de la surexpression d'AQP1 sur les trois paramètres de la croissance cellulaire étudiés, que sont le pourcentage de croissance, le taux de croissance et le temps de doublement des cellules (Figure 37A, B).

Etude de la cytotoxicité du propranolol sur les cellules ISO-HAS et MO-LAS

Pour étudier les effets du propranolol sur des paramètres tels que la migration cellulaire ou l'interaction cellule-cellule, il est important de déterminer l'éventuelle cytotoxicité induite par le bêtabloquant sur les cellules. Pour l'ensemble des constructions des deux lignées tumorales, le propranolol ne présente pas de cytotoxicité majeure (inférieure à 20%) à 24 h et 48 h après traitement et aux concentrations utilisées (Figure 38A, B). L'effet du propranolol dans nos tests fonctionnels a été étudié à des doses inférieures ou égales à 50 μ M pour se rapprocher au mieux des doses administrées en situation clinique. Les doses faibles de propranolol permettent de mieux interpréter les effets biologiques du propranolol, qui ne sont pas les mêmes que les voies déclenchées par de fortes doses de la molécule, lesquelles peuvent être liées à des effets « off target » du propranolol.

A



B

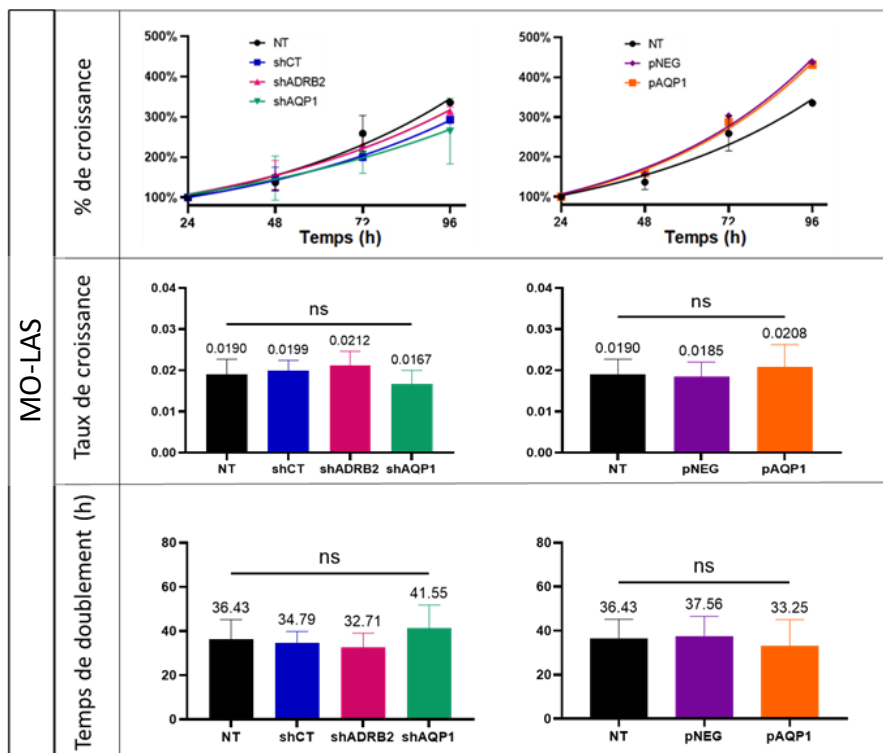
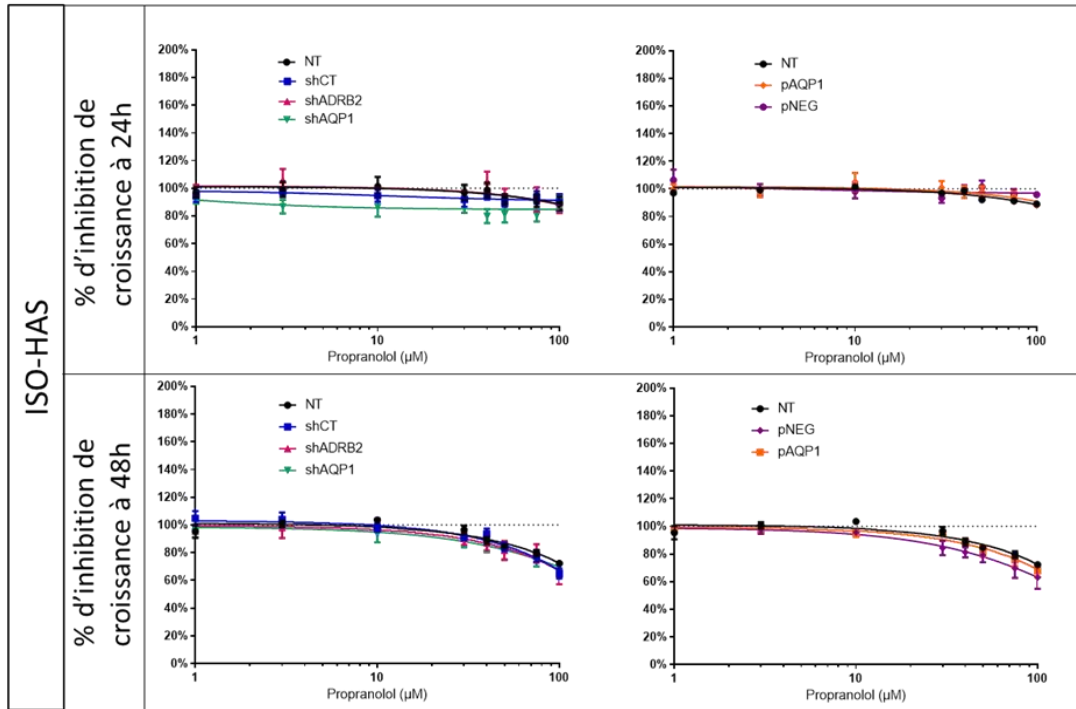


Figure 37 : Effet des modulations géniques sur la croissance cellulaire des lignées ISO-HAS et MO-LAS. Pourcentage de croissance (normalisé par rapport à la DO_{515nm} à 24 h), taux de croissance et temps de doublement des cellules **(A)** ISO-HAS et **(B)** MO-LAS. Les données sont représentées sous forme de moyenne \pm SEM. N=3 expériences indépendantes par groupe, ns : non significatif. NT : non transduit.

A



B

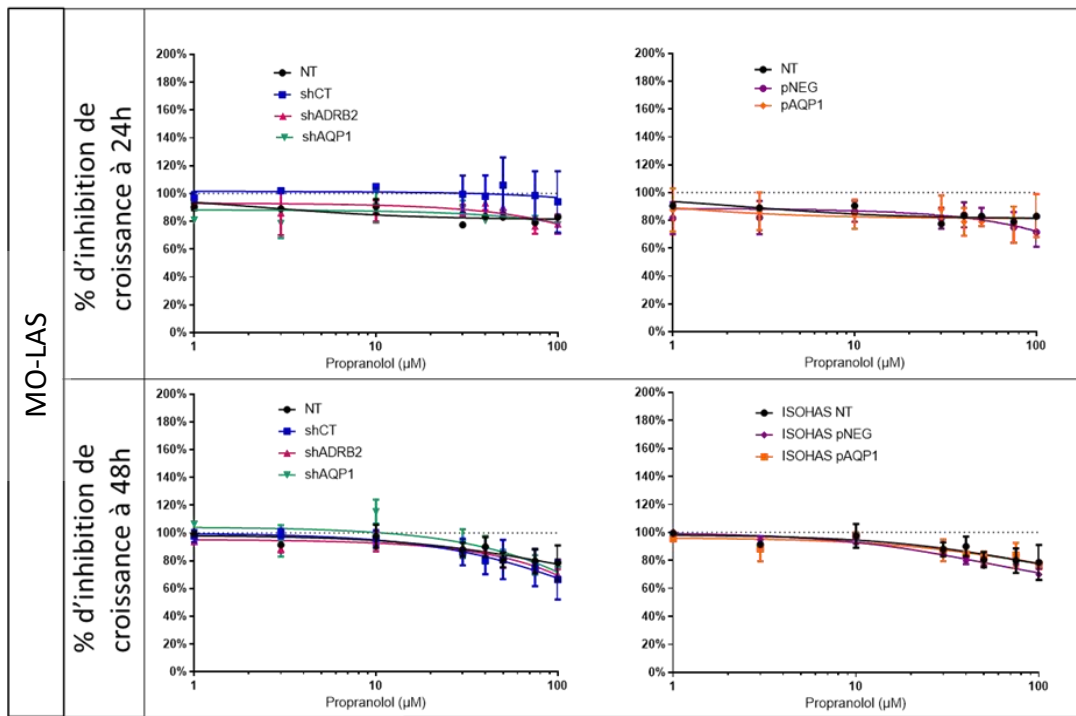


Figure 38 : Etude de la cytotoxicité du propranolol sur les lignées ISO-HAS et MO-LAS. Mesure de l'inhibition de croissance par des doses croissantes de propranolol (1 – 100 μM) à 24 h et 48 h sur les différentes constructions génétiques des lignées **(A)** ISO-HAS et **(B)** MO-LAS. Le pourcentage d'inhibition a été normalisé par rapport à la DO_{515nm} mesurée dans le contrôle non traité. Les données sont représentées sous forme de moyenne \pm SEM. N=3 expériences indépendantes par groupe. NT : non transduit.

Effet du propranolol sur l'angiogenèse des lignées tumorales ISO-HAS et MO-LAS

L'angiosarcome étant une tumeur vasculaire d'origine endothéliale, nous avons exploré l'effet du propranolol sur les propriétés tubulogéniques des lignées cellulaires ISO-AS et MO-LAS. La lignée ISO-HAS a été marquée par une sonde fluorescente qui permet une meilleure visualisation des tubes, également appelés cordes. Les deux lignées ont étéensemencées sur une couche plane de matrice extracellulaire réduite en facteurs de croissance (Matrigel GFR, Corning) et traitées ou non avec des doses croissantes et non cytotoxiques de propranolol (1-50 μ M). Le nombre de cellules et le délai de formation adéquats des structures 3D ont été déterminés pour les deux lignées tumorales et différents paramètres de tubulogénèse (comprenant la longueur totale des tubes, le nombre total de tubes et la surface totale recouverte par les tubes) ont été analysés. Les cellules ISO-HAS et MO-LAS sont capables de former des tubes *in vitro* dès 3 h après ensemencement (Figure 39C, D). Les cellules ISO-HAS forment un réseau de tubes bien organisé tandis que les MO-LAS ont formé de nombreux petits tubules (Figure 39C, D). Le propranolol a faiblement impacté la tubulogénèse des ISO-HAS, montrant un effet anti-angiogénique seulement sur la longueur totale des tubes et à la dose la plus élevée de 50 μ M (Figure 39A, $P=0,0015$). Il a en revanche considérablement réduit la tubulogénèse des cellules MO-LAS, et ce, sur l'ensemble des paramètres analysés et à de faibles doses. Le propranolol a significativement réduit la longueur totale des tubes et le nombre total de tubes dès 3 μ M (Figure 39B, $P=0,0001$, $P=0,0025$ respectivement).

Ces résultats ont montré un profil de réponse au bêtabloquant différent entre les deux lignées.

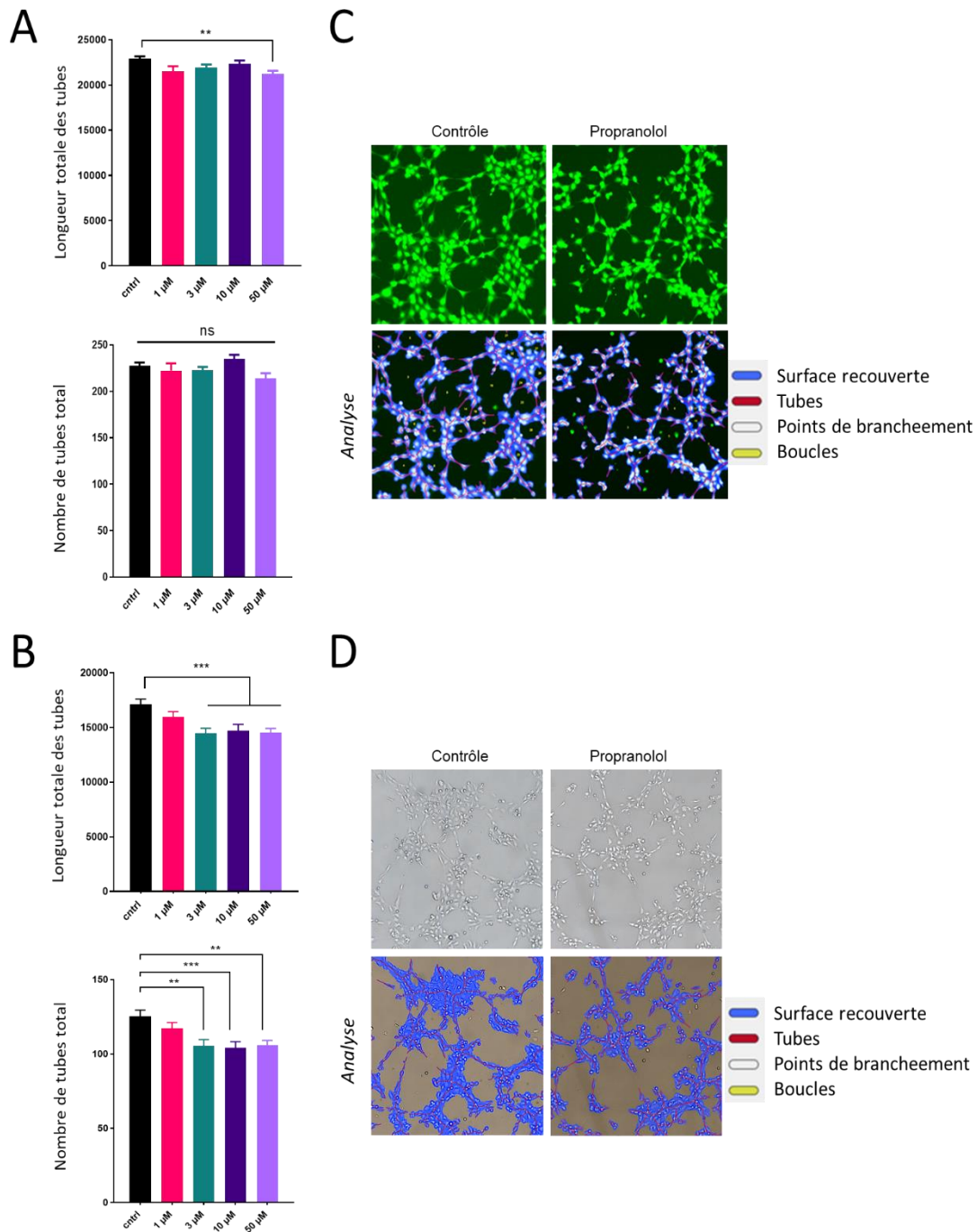


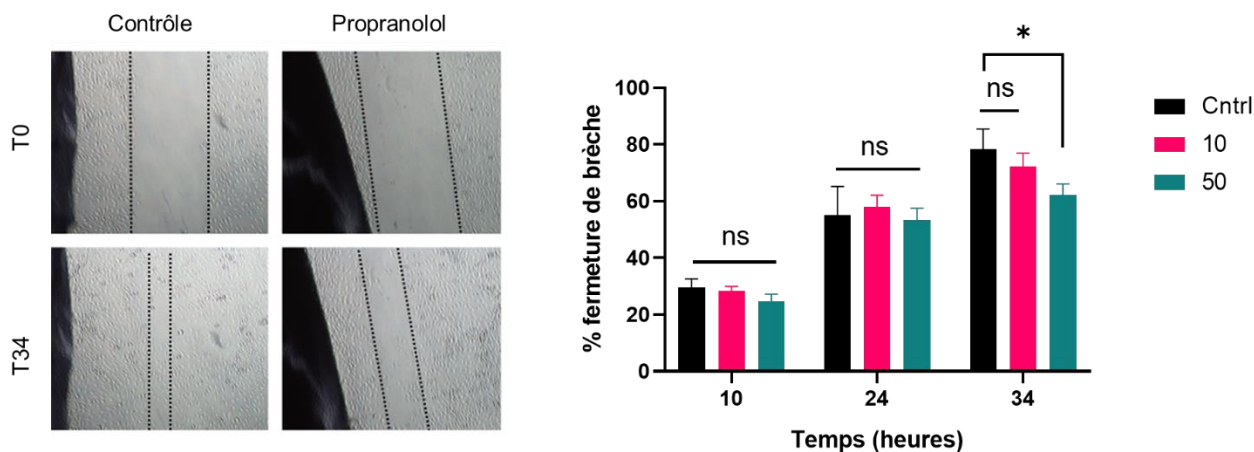
Figure 39 : Effet du propranolol sur les propriétés tubulogéniques des lignées ISO-HAS et MO-LAS. Les cellules ISO-HAS, marquées avec une sonde fluorescente verte (CMFDA488) et les cellules MO-LAS ont été ensemencées dans des puits de microplaques recouverts d'une fine couche de matrice de membrane basale réduite en facteurs de croissance (Matrigel) ± propranolol (1-50 µM). La formation de tubes a été imagée 3 h après et analysée avec le logiciel Wimasis. Longueur totale des tubes et nombre total de tubes formés par les cellules **(A)** ISO-HAS et **(B)** MO-LAS représentés par la quantification de la moyenne de trois puits par conditions (n=3) sur N=4 pour les cellules ISO-HAS et N=2 pour les cellules MO-LAS expériences indépendantes. Images de la formation de tubes par les cellules **(C)** ISO-HAS et **(D)** MO-LAS sur le matrigel (grossissement x40) avec des images d'analyse illustratives. Les données sont représentées sous forme de moyenne ± SEM, ns : non significatif, *P < 0,05, **P < 0.005, et ***P < 0,0005.

Effet du propranolol sur la migration cellulaire des ISO-HAS et MO-LAS

Les effets du propranolol sur la capacité migratoire des lignées ISO-HAS et MO-LAS ont été étudiés *via* le suivi de la fermeture de la brèche induite par scratch assay. Les cellules ont été traitées avec 10 et 50 μM de propranolol pour les ISO-HAS et avec 1, 3, 10 et 50 μM pour les MO-LAS. Le propranolol n'a pas d'effet sur la migration des ISO-HAS avant 34 h. A 34 h, il y a une diminution de la migration d'environ 20% (Figure 40A) à 50 μM mais cela peut être lié à l'inhibition de croissance de 20% induite par le propranolol à cette dose (Figure 38A). En revanche, le propranolol a diminué de manière importante la migration des cellules MO-LAS. Cette inhibition est dose-dépendante et est significative dès 24 h à 50 μM ($P=0,0049$) et à 48 h dès 10 μM avec une baisse qui atteint 50% du pourcentage de migration à 50 μM ($P=0,0165$, $P= 0,0003$ respectivement) (Figure 40B). Cette inhibition importante de la migration par le propranolol sur la lignée MO-LAS ne peut cette fois être attribuée à la seule cytotoxicité du bêtabloquant (Figure 38B).

Ces résultats sont complémentaires de ceux obtenus dans le test de tubulogénèse sur les interactions cellule-cellule et confirment que les deux lignées tumorales présentent un profil de réponse au propranolol bien distinct, les cellules MO-LAS étant plus sensibles dans les deux tests.

A



B

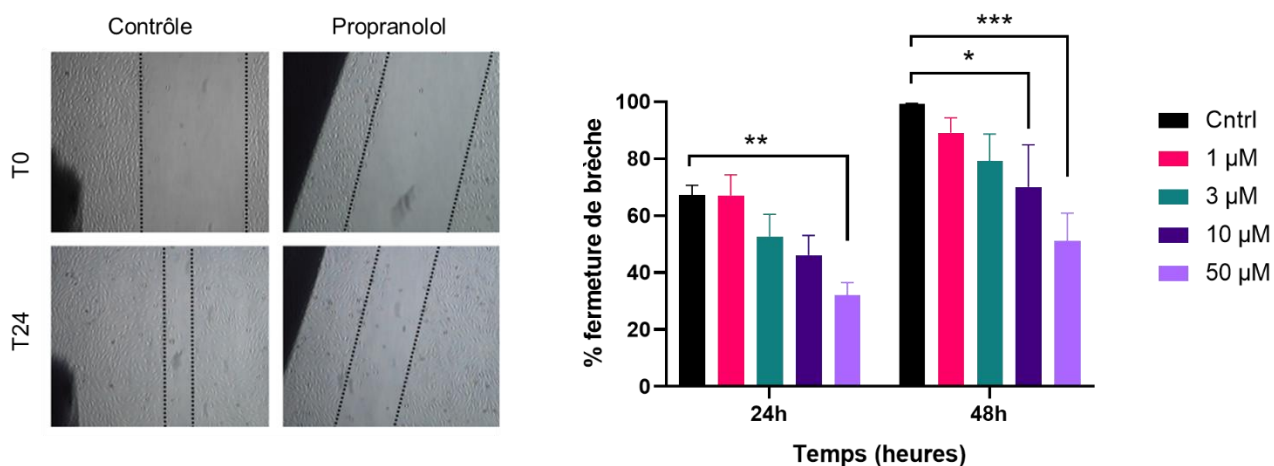


Figure 40 : Effet du propranolol sur la migration des cellules ISO-HAS et MO-LAS. (A) Migration des cellules ISO-HAS imagée à 0 h (T0) et 34 h (T34) avec un (gauche, les traits discontinus représentent la largeur de la brèche à T0 et T34 ± propranolol) et quantification de la migration sous forme de pourcentage de fermeture de brèche par rapport à T0 (droite). **(B)** Migration des cellules MO-LAS imagée à T0 et T24 ± propranolol (gauche) et quantifiée sous forme de pourcentage de fermeture de brèche par rapport à T0 (droite). Les données observées par microscopie à contraste de phase avec objectif x4 sont représentées sous forme de moyenne ± SEM. N=3 expériences indépendantes par groupe, ns : non significatif, * P<0,05, ** P<0,005, *** P<0,0005).

Effet de la surexpression d'AQP1 dans les cellules ISO-HAS et MO-LAS

AQP1 est détectable dans la lignée MO-LAS mais à un niveau en dessous du seuil de détection dans la lignée ISO-HAS (Figure 36B). Ces niveaux protéiques distincts s'ajoutent à un profil de réponse au propranolol différent (Figures 39, 40). Nous avons surexprimé AQP1 dans les deux lignées tumorales pour mimer une expression pathologique et évalué l'effet de cette surexpression sur la migration. La surexpression d'AQP1 n'a pas impacté la migration des cellules MO-LAS pAQP1 en comparaison des cellules non transduites et des cellules surexprimant le contrôle pNEG (Figure 41A). La surexpression d'AQP1 a en revanche significativement augmenté la migration de la lignée ISO-HAS en comparaison des cellules contrôles, et ce, dès 6 h après réalisation de la brèche ($P < 0,005$) (Figure 41 B, C, D, E). La stimulation de la migration cellulaire dans les cellules ISO-HAS seulement peut être liée à son faible niveau d'AQP1 (Figure 35C) et la surexpression d'AQP1 a créé un phénotype pro-tumoral plus agressif des cellules.

Effet du propranolol sur la migration des cellules ISO-HAS surexprimant AQP1

L'effet du propranolol sur la migration des cellules ISO-HAS surexprimant (pAQP1) ou non (pNEG) la protéine AQP1 a confirmé le faible impact du bêtabloquant sur la motilité des cellules non transduites ou transduites avec le vecteur contrôle (pNEG) (Figure 42A, D). De manière surprenante, le propranolol a significativement diminué la migration des cellules pAQP1 de manière dose dépendante, dès 10 μ M à 24 h en test de migration manuel et dès 2 h sur le système incuCyte ($P = 0,0146$ et $P = 0,033$ respectivement) (Figure 42B, C, E, F). Ces résultats montrent un rôle important de la protéine AQP1 dans la migration des cellules ISO-HAS, dont la réponse au propranolol semble dépendre d'un niveau élevé d'AQP1.

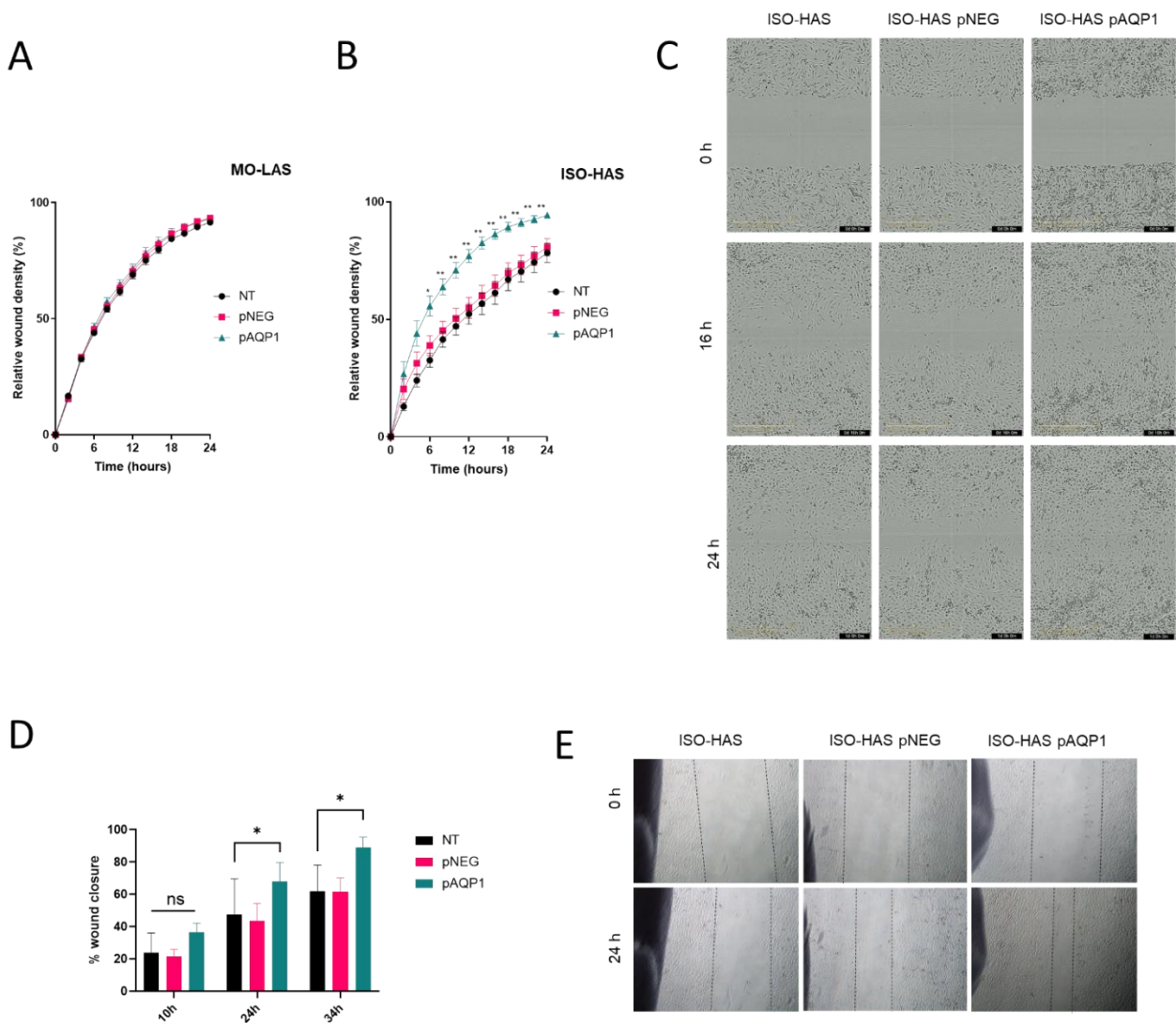


Figure 41 : Effet de la surexpression d'AQP1 sur la migration des cellules MO-LAS et ISO-HAS. Résultats de quantification de la migration des cellules surexprimant AQP1 prises par le système d'imagerie de l'incuCyte dans les cellules **(A)** MO-LAS et **(B)** ISO-HAS. **(C)** Images représentatives de la migration à 0 h, 16 h et 24 h après la réalisation de la brèche dans les cellules ISO-HAS contrôles, pNEG et pAQP1. Echelle : 600 μ m. Les résultats montrent la densité relative de la plaie en fonction du temps. **(D)** Résultats de migration en brèche manuelle des cellules ISO-HAS non transduites, pNEG et pAQP1 à 10 h, 24 h et 34 h. **(E)** Images de la migration des cellules à 10 h, 24 h au grossissement x4. Les données sont représentées par la moyenne de la densité relative de la plaie et du pourcentage de fermeture de brèche \pm l'erreur standard de la moyenne de N=3 expériences indépendantes, ns : non significatif, * $P < 0,05$, ** $P < 0,005$, *** $P < 0,0005$.

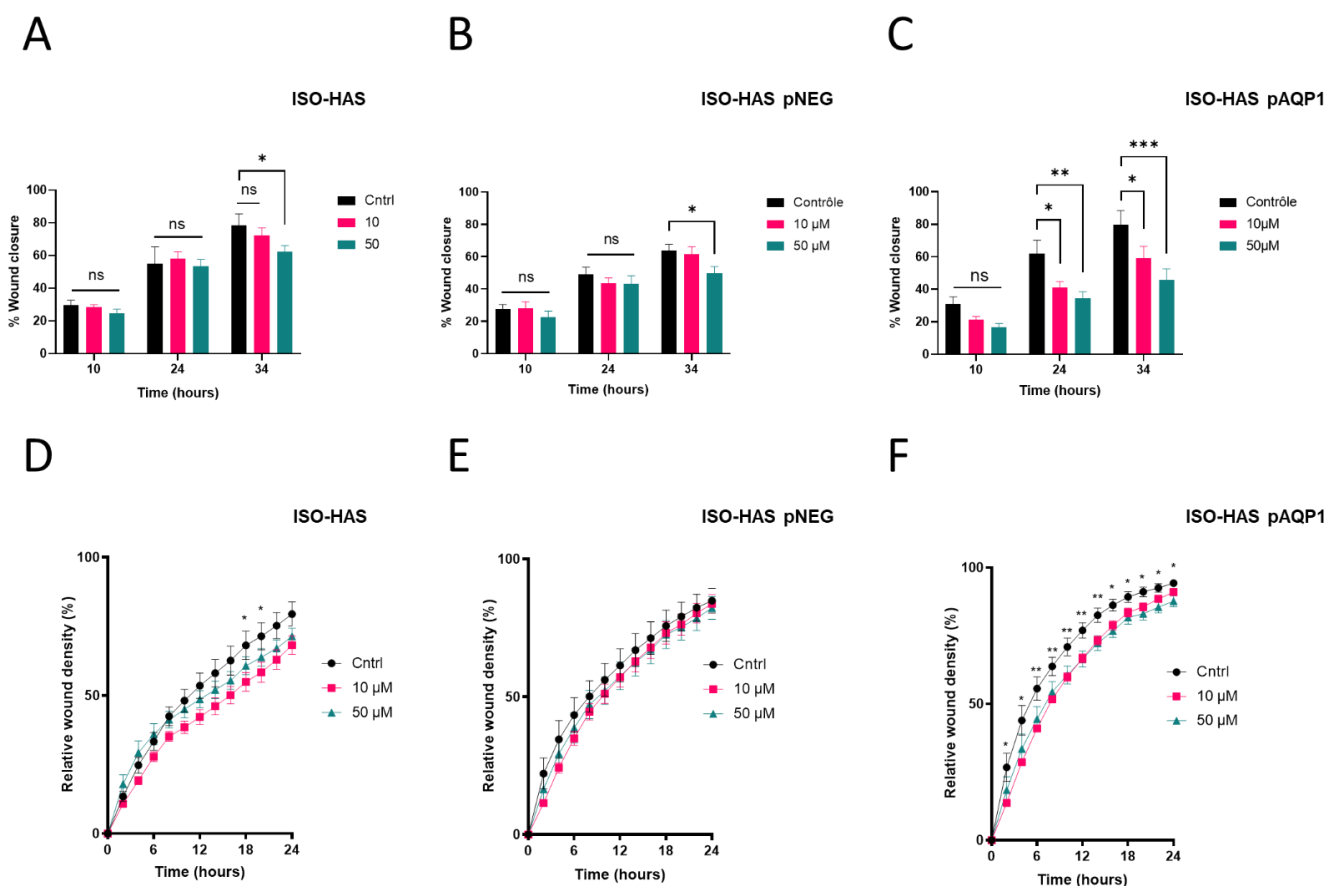
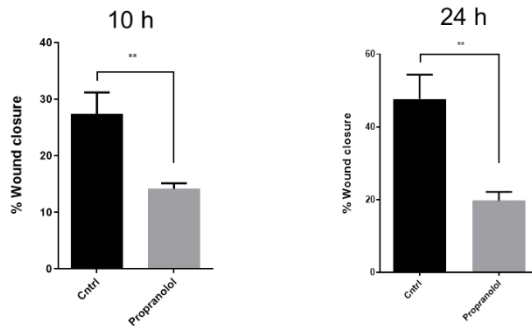


Figure 42 : Effet du propranolol sur la migration des cellules ISO-HAS en fonction de la surexpression d'AQP1. Résultats de la cinétique de migration des cellules \pm propranolol ISO-HAS contrôles, ISO-HAS pNEG et ISO-HAS pAQP1 par test de migration avec brèches créées manuellement à 0 h, 24 h et 34 h représentés par le pourcentage de fermeture de brèche (A, B, C) et par le système d'imagerie en temps réel de l'incuCyte à 2 h d'intervalle pendant 24 h (D, E, F) où les résultats sont représentés par la densité relative de la brèche. Les données sont représentées par la moyenne de la densité relative de la plaie \pm l'erreur standard de la moyenne SEM de N=3 expériences indépendantes, ns : non significatif * P<0,05, ** P<0,01.

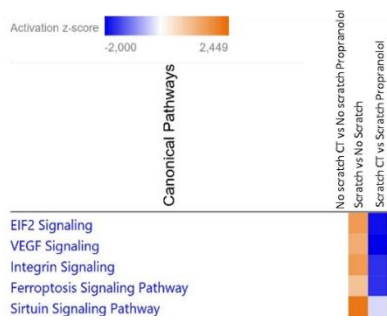
Voies de signalisation altérées par la cicatrisation et le propranolol dans la lignée MO-LAS

Les résultats précédents ont montré un effet inhibiteur du propranolol sur la migration des cellules MO-LAS dès 10 μM avec un effet accru à 50 μM . Afin de mieux comprendre les événements moléculaires qui sous-tendent cet effet, une analyse protéomique a été réalisée sur ce modèle. Pour cela, les cellules MO-LAS formant une monocouche confluente ont été soumises à de multiples brèches unidirectionnelles pour obtenir une forte densité de brèches et stimuler la migration d'un nombre important de cellules non endommagées. Les cellules ont été traitées pendant 10 h avec 50 μM de propranolol. En effet, des résultats préliminaires sur ces cellules et sur le modèle d'angiogenèse d'hémangiome infantile suggèrent que des modifications protéiques rapides apparaissent entre 3 h et 12 h après le traitement. Les résultats obtenus ont confirmé l'effet inhibiteur du bêtabloquant sur la migration des cellules MO-LAS à 10 h (Figure 43A). Les protéines ont été extraites de ces cellules et quantifiées par spectrométrie de masse pour l'analyse protéomique. L'analyse des résultats de protéomique avec le logiciel Ingenuity (QIAGEN Ingenuity Pathway Analysis) a permis d'identifier plusieurs voies altérées par la création de brèches et par le traitement au propranolol (Figure 43B, C). L'expression seuil est réglée à une expression relative ou « fold change » de $\pm 1,5$ avec une significativité dépendante d'une $p < 0,05$. Dans la comparaison des groupes aucune brèche vs brèches, plusieurs voies de signalisation ont été activées par le processus de cicatrisation, dont les plus significatives sont les voies de EIF2, VEGF, Intégrines, Ferroptose, Sirtuine (Figure 43B). Certaines de ces voies, dont EIF2, VEGF, Intégrines et Ferroptose ont été au contraire inhibées par le traitement au propranolol (Figure 43B, C). L'analyse de comparaison de ces deux derniers groupes a également montré l'activation de certaines voies par le propranolol, dont les plus significatives sont les voies de biosynthèse des pyrimidines, de l'apoptose médiée par MYC, de l'autophagie et de la sécrétion d'insuline (Figure 43C). En revanche, de manière intéressante, les modifications protéiques induites par le propranolol en l'absence de brèches ne sont pas significatives ce qui soutient l'idée d'un effet du propranolol sur les cellules tumorales uniquement dans un contexte « activé ».

A



B



C

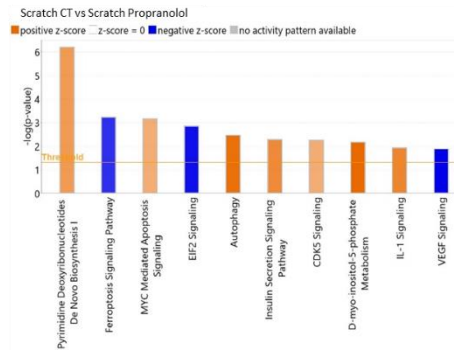


Figure 43 : Analyse protéomique des voies de signalisation impactées par le propranolol sur les cellules MO-LAS. (A) Effet du propranolol sur la migration de la lignée MO-LAS à 10 h et 24 h dans le système de multi-brèches sur une monocouche de cellules confluentes créées à l'aide d'un peigne (Cell Comb™ Scratch Assay). Une extraction protéique a été réalisée sur ces cellules et soumise à une analyse protéomique. **(B)** Analyse des données de protéomique avec le logiciel d'analyse Ingenuity montrant les voies de signalisation canoniques altérées par la génération de brèches vs cellules contrôles sans brèches et brèches ± propranolol. **(C)** Voies de signalisation significativement surexprimées (orange) ou sous exprimées (bleu) par le traitement au propranolol sur les cellules avec brèches. N=3 expériences indépendantes par groupe, *P < 0.05, **P < 0.01.

Effet du propranolol sur la génération de sphéroïdes tumoraux des MO-LAS

Afin de poursuivre l'étude du mécanisme d'action du propranolol sur les cellules MO-LAS, nous avons développé un modèle 3D de sphéroïdes, également appelés sphéroïdes tumoraux multicellulaires (STMC). Dans un premier temps nous avons validé que la lignée était capable de former des sphéroïdes. (Figure 44A, B). Une fois validé, le bêtabloquant a été ajouté aux cellules à J0 pour évaluer son effet sur la propension des cellules à s'assembler en sphéroïdes compacts. Le propranolol a impacté la formation de sphéroïdes par les cellules MO-LAS, et ce de manière dose-dépendante et dès les premières heures après ensemencement (Figure 44C). Ainsi, l'aire des sphéroïdes des cellules non traitées diminue drastiquement ($3 \times 10^6 \mu\text{m}^2$ à 0 h vs $1 \times 10^6 \mu\text{m}^2$ à 10 h), dû au réarrangement spatial des cellules qui s'assemblent pour former un sphéroïde compact. Tout en gardant sa densité, l'aire du sphéroïde augmente à partir de 24 h, signe de la croissance et de la prolifération cellulaire au sein du sphéroïde (Figure 44A, B, C). Le traitement au propranolol au moment de l'ensemencement induit une inhibition de cette compaction de manière dose-dépendante. En effet, les cellules s'assemblent moins et forment un ensemble cellulaire non compact sans structure 3D qui ne semble pas correspondre à des sphéroïdes. De plus, l'aire reste constante au cours du temps (Figure 44C). Ainsi le temps de doublement est fortement augmenté pour la dose 10 μM et le taux de croissance des sphéroïdes est diminué drastiquement par le propranolol (Figure 44D, E). Le test MTS réalisé sur les sphéroïdes à J5 après dissociation mécanique et enzymatique pour la quantification des cellules vivantes montre que le propranolol n'induit pas une diminution de la quantité de cellules vivantes, il n'y a donc pas une mort cellulaire importante au sein des sphéroïdes aux doses 10 et 50 μM (Figure 44F). Ces résultats montrent que le propranolol n'induit pas de mort cellulaire dans ce modèle mais agit plutôt en inhibant la formation et la croissance des sphéroïdes.

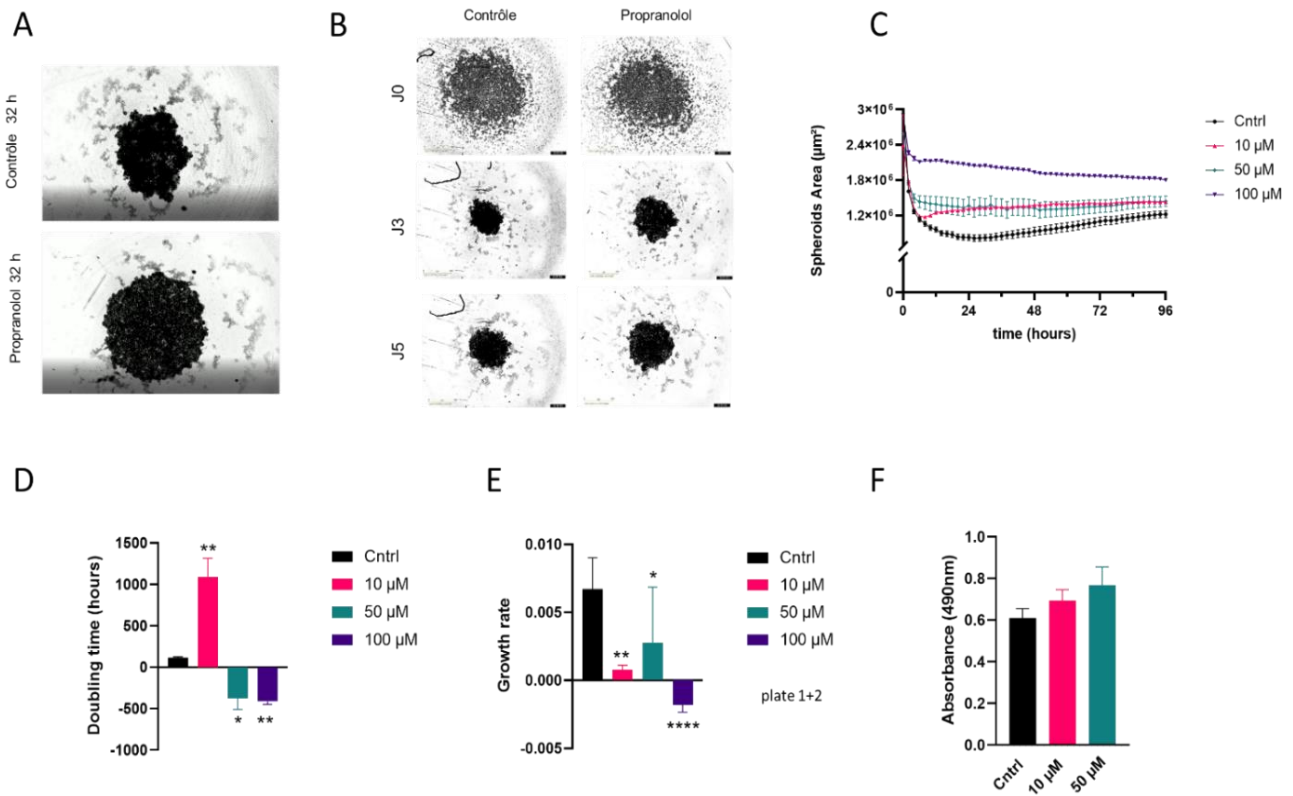


Figure 44 : Effet du propranolol sur la génération de sphéroïdes tumoraux dans la lignée MO-LAS.

Les sphéroïdes ont été générés par l'ensemencement de 1×10^4 cellules en suspension dans des plaques 96 puits à fond rond en présence de 0,5% de méthylcellulose (ratio 1 :1) \pm propranolol. **(A)** Images représentatives de sphéroïdes tumoraux à 32 h \pm propranolol. **(B)** Images représentatives de la morphologie du même sphéroïde formé à J0, J3 et J5 après agrégation et compaction de la suspension cellulaire traitée ou non au propranolol. Echelle : 800 μm . **(C)** Analyse quantitative de l'aire des sphéroïdes tumoraux en μm^2 au cours du temps \pm propranolol. **(D)** Temps de doublement en heures et **(E)** taux de croissance des sphéroïdes \pm propranolol. **(F)** Analyse du test de survie MTS réalisé sur les sphéroïdes à J5. Les données sont représentées sous forme de moyenne \pm SEM. N=2 expériences indépendantes par groupe, *P < 0.05, **P < 0.01, et ****P < 0.0001.

Effet du propranolol sur les sphéroïdes formés par la lignée MO-LAS

Nous avons ensuite étudié l'effet du propranolol sur les sphéroïdes déjà formés par la lignée tumorale MO-LAS. Ainsi, le propranolol a été ajouté aux cellules 24 h après ensemencement et formation des sphéroïdes. Les résultats ont montré que l'ajout du propranolol après la formation des sphéroïdes modifie la densité des sphéroïdes dès 10 μM , en comparaison du contrôle. Les sphéroïdes traités perdent progressivement leur densité, les cellules semblent se désolidariser, ce qui se traduit par une augmentation de l'aire occupée par les cellules et un aspect clairsemé. Leur dissociation mécanique devient aisée en comparaison des sphéroïdes non traités. (Figure 45).

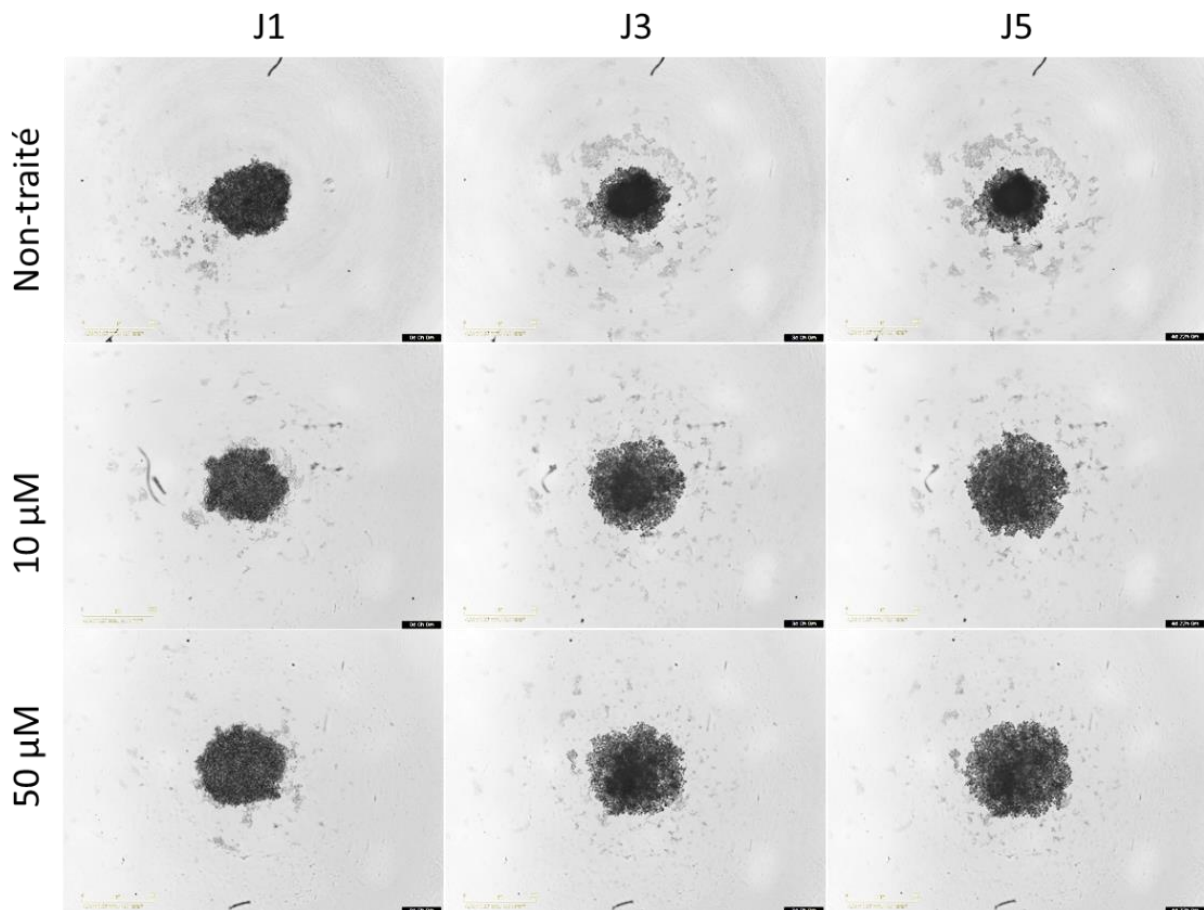


Figure 45 : Effet du propranolol sur les sphéroïdes tumoraux dans la lignée MO-LAS. Les sphéroïdes ont été générés par l'ensemencement de 1×10^4 cellules en suspension dans des plaques 96 puits à fond rond en présence de 0,5% de méthylcellulose (ratio 1 :1). Le propranolol a été ajouté aux cellules 24 h après, à J1. Images représentatives de la morphologie des sphéroïdes à J1, J3 et J5 \pm propranolol. Echelle : 800 μm .

Effet de la sous expression d'ADRB2 sur les sphéroïdes tumoraux traités au propranolol ou à l'aténolol

Pour explorer l'effet du propranolol sur les sphéroïdes tumoraux, le récepteur ADRB2 a été testé comme cible du bêtabloquant dans notre modèle 3D *in vitro*. Après formation des sphéroïdes (48 h pour les MO-LAS et 72 h pour les ISO-HAS) (Figure 46A, C), les cellules shCT et shADRB2 ont été traitées par 10 et 50 μM de propranolol. Le propranolol dès 10 μM induit une dissociation des sphéroïdes formés par les cellules MO-LAS shCT et ISO-HAS shCT qui se traduit par l'augmentation rapide de l'aire des sphéroïdes (à 72 h aire des sphéroïdes $> 7 \times 10^5 \mu\text{m}^2$ pour les MO-LAS shCT et à 96 h $> 9 \times 10^5 \mu\text{m}^2$ pour les ISO-HAS shCT) en comparaison des contrôles non traités où les sphéroïdes apparaissent noirs du fait de leur compaction (à 72 h aire des sphéroïdes $< 6 \times 10^5 \mu\text{m}^2$ pour les MO-LAS shCT non traitées et à 96 h $< 6 \times 10^5 \mu\text{m}^2$ pour les ISO-HAS shCT non traitées) (Figure 46B, D). L'implication du récepteur ADRB1 dans la réponse au propranolol a également été évaluée. Le traitement des deux lignées tumorales avec 50 μM d'aténolol qui bloque sélectivement les récepteurs ADRB1 induit la même augmentation rapide de l'aire des sphéroïdes tumoraux, suggérant que le ciblage d'ADRB1 conduit aux mêmes effets que le propranolol sur la cohésion des cellules. De manière intéressante, l'extinction d'ADRB2 par shARN conduit aussi à l'augmentation de l'aire des sphéroïdes associée à une absence de cohésion des cellules. A partir de 24 h, on observe une diminution lente de l'aire. De plus, l'effet du propranolol sur l'aire des sphéroïdes est perdu lorsque les deux lignées tumorales sous expriment ADRB2. De manière étonnante, sur ces sphéroïdes invalidés pour ADRB2, l'aténolol a un effet additif sur la diminution, à partir de 24 h, de l'aire occupée par les lignées MO-LAS et ISO-HAS ($P=0.01$ et $P=0.0009$ respectivement) (Figure 46C,D). L'ensemble de ces résultats suggère un effet « on target » du propranolol sur les récepteurs ADRB1 et ADRB2, mais nécessite davantage d'investigation sur les mécanismes de cohésion cellulaire mis en œuvre et sur les rôles d'ADRB1 et d'ADRB2 grâce à un shADRB1 et au bêtabloquant spécifique d'ADRB2 ICI118.551 que nous venons d'acquérir.

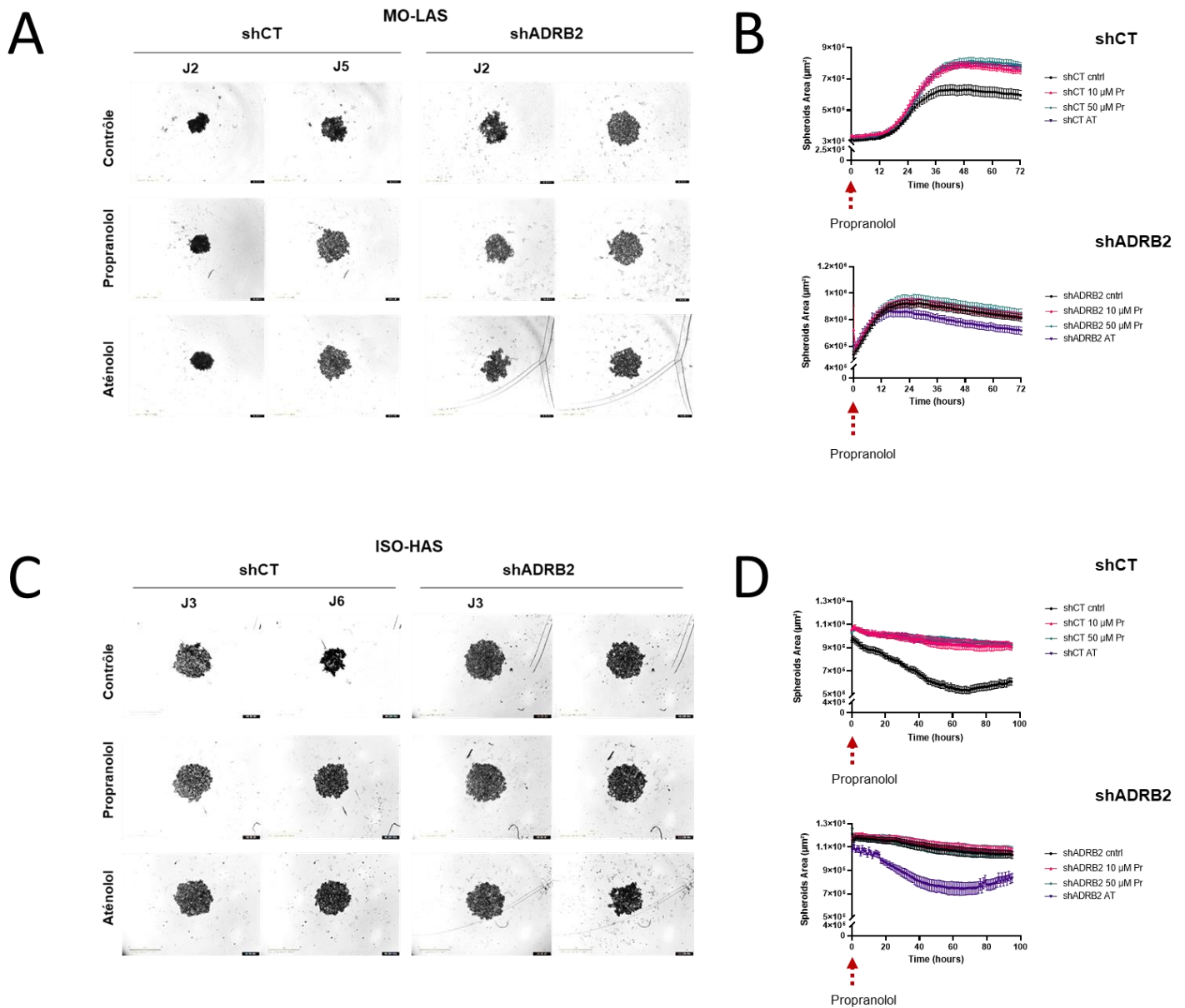


Figure 46 : Effet du propranolol et de l'aténolol sur les sphéroïdes tumoraux des cellules invalidées pour ADRB2. (A-C) Photos représentatives des sphéroïdes tumoraux formés par les cellules MO-LAS et ISO-HAS shCT et shADRB2 après 72 h (MO-LAS) et 96 h (ISO-HAS) d'incubation avec le propranolol ou l'aténolol. Les images ont été obtenues à un objectif x10 avec la caméra intégrée au système IncuCyte. Echelle : 1 mm. **(B-D)** Analyse quantitative de la croissance des sphéroïdes tumoraux représentée par l'aire des sphéroïdes formés par les cellules MO-LAS et ISO-HAS shCT et shADRB2 ensemencées à une densité de 1×10^4 cellules dans des plaques 96 puits à fond rond en présence de 0,5% de méthylcellulose (ratio 1 :1). Les sphéroïdes tumoraux ont été traités ou non avec 10 et 50 μM de propranolol ou avec 50 μM d'aténolol. Les données sont représentées sous forme de moyenne \pm SEM. N=3 expériences indépendantes par groupe.

DISCUSSION

Hémangiome infantile :

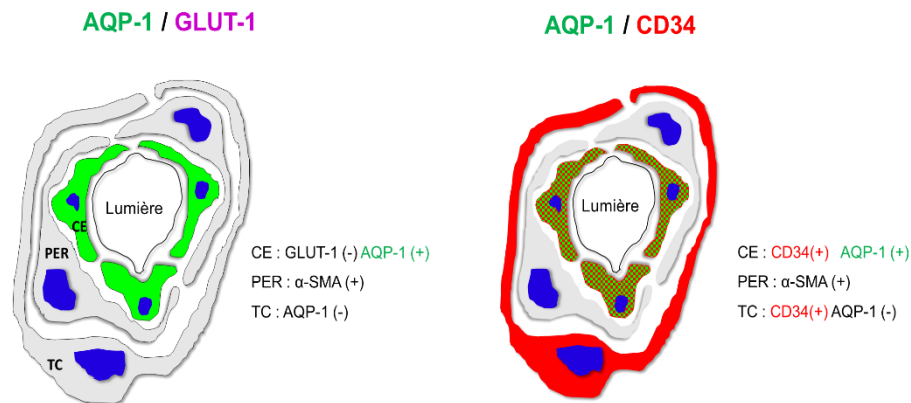
Nous avons révélé la protéine aquaporine 1 (AQP1) comme nouveau marqueur de diagnostic de l'hémangiome infantile et avons mis en évidence le rôle clé de la noradrénaline, des télocytes et d'AQP1 dans la réponse anti-tumorale de l'hémangiome infantile au propranolol. Les résultats obtenus *in vitro* sur l'angiosarcome fournissent des pistes qui pourraient participer au repositionnement du bêtabloquant pour le traitement de tumeurs vasculaires.

L'objectif de ces travaux a été de mettre au point des modèles permettant d'étudier la sensibilité et les mécanismes d'action du propranolol dans les tumeurs vasculaires bénigne et maligne, en particulier dans l'hémangiome infantile et dans l'angiosarcome. D'abord, un modèle de xéno greffe de la lignée tumorale de glioblastome U87 a permis de révéler AQP1 comme cible thérapeutique du propranolol. Le traitement des souris immunodéficientes par le propranolol a significativement réduit la taille des tumeurs greffées par un effet dépendant des récepteurs ADRB2. Aucun effet additif du propranolol n'a été observé lorsque les souris étaient greffées avec les cellules shAQP1, suggérant que l'effet anti-tumoral du propranolol et l'inhibition d'AQP1 concernent une voie biologique commune. La sous expression d'AQP1 par shARN et par un inhibiteur d'AQP1 dans des modèles murins de cancer du sein triple négatif et de mésothéliome malin respectivement ont aussi diminué la croissance tumorale et le poids des tumeurs induites^{173,174}. Ces résultats soulignent le potentiel thérapeutique du ciblage d'AQP1 dans les tumeurs surexprimant la protéine comme le glioblastome.

L'étude de la localisation d'AQP1 dans un large panel d'hémangiomes infantiles a révélé un profil histopathologique unique de la protéine dans cette tumeur, qui présente un endothélium GLUT-1⁺/CD34⁺/AQP1⁻, des péricytes α -SMA⁺ et des télocytes périvasculaires GLUT-1⁻/CD34⁺/AQP1⁺, en comparaison des vaisseaux

normaux dont l'endothélium est GLUT-1/CD34+/AQP1⁺ et les télocytes sont GLUT-1⁻/CD34+/AQP1⁻ (Figure 47). Le profil observé dans l'hémangiome infantile est caractéristique des barrières hémato-tissulaires présentes dans le cerveau, le placenta et les testicules et dans les tumeurs du système nerveux central comme le glioblastome, qui présentent un endothélium marqué par des jonctions serrées.

Vaisseau normal



Vaisseau pathologique type HI

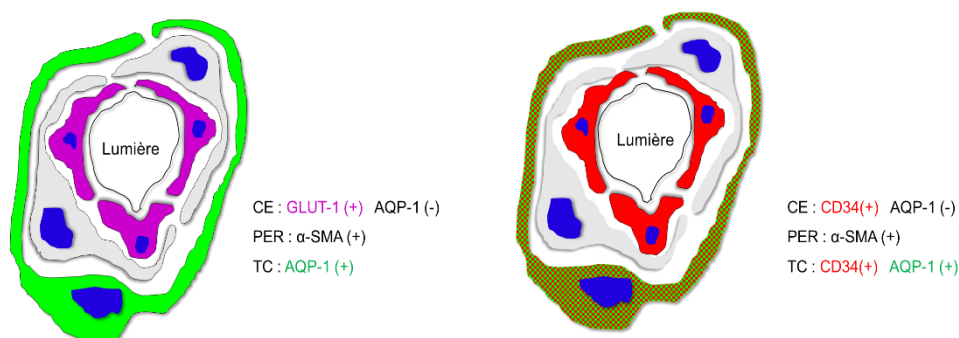


Figure 47 : Représentation schématique de vaisseaux normaux et d'hémangiome infantile pour l'expression de GLUT-1, AQP1 et CD34.

L'hypoxie est décrite comme un élément pivot dans le développement de l'hémangiome infantile. AQP1 peut être régulée par l'hypoxie par l'intermédiaire de HIF-1 α . En effet, l'hypoxie induit l'expression d'AQP1 *in vitro* dans des cellules de Schwann et l'extinction de HIF-1 α dans ces cellules diminue l'induction de l'expression endogène d'AQP1¹⁷⁵. Le rôle d'AQP1 dans la pathogenèse de l'hémangiome infantile

pourrait dépendre d'une régulation positive de la protéine par l'hypoxie dans les télocytes, qui participerait ainsi à l'augmentation de l'angiogenèse dans la tumeur (Figure 48). Dans ce sens, notre modèle d'hémangiome infantile *in vitro* d'angiogenèse basé sur les cellules vasculaires et périvasculaires dérivées d'hémangiome infantile a révélé un rôle clé d'AQP1 dans l'angiogenèse et dans la réponse anti-angiogénique au propranolol à faibles doses (dès 3 μ M). Il a également révélé un effet pro-angiogénique de la noradrénaline qui s'accompagne d'une élévation d'AQP1 dans les télocytes *in vitro* (Figure 50). Dans ces conditions le propranolol rétablit un niveau basal d'AQP1 et inhibe l'angiogenèse.

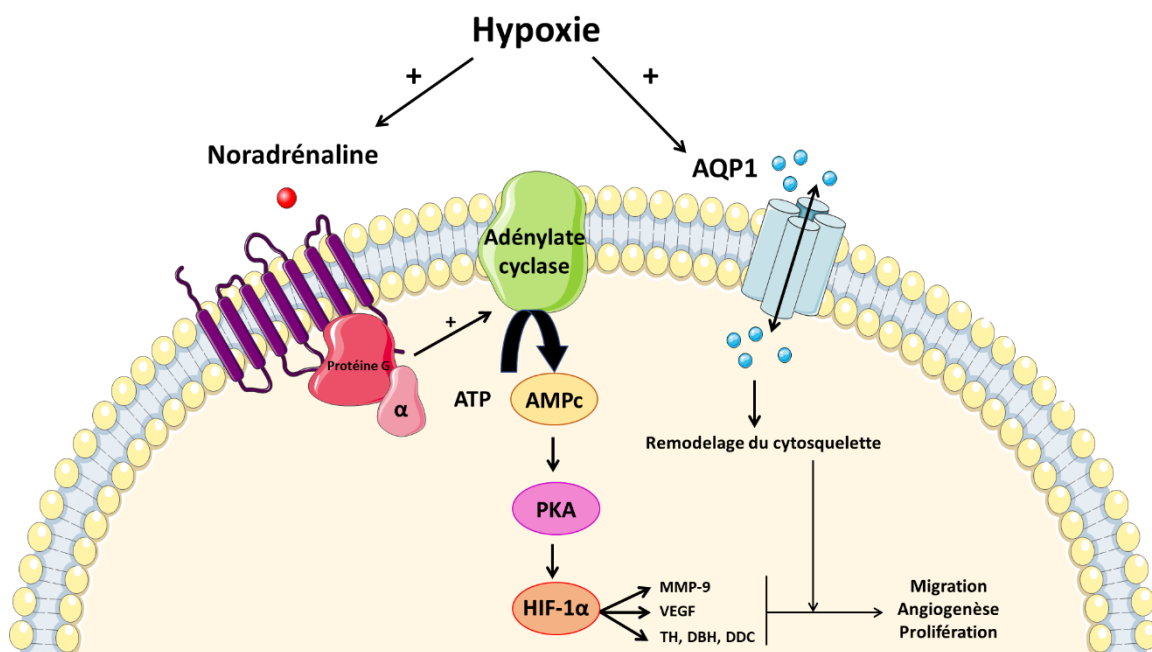


Figure 48 : Modèle proposé de régulation d'AQP1 dans le télocyte d'hémangiome infantile par l'hypoxie et la noradrénaline.

L'effet anti-angiogénique du propranolol dans notre modèle est dépendant 1) d'un effet pro-angiogénique apporté par la noradrénaline et reversé par le propranolol probablement en créant un effet compétitif sur les récepteurs ADRB, et 2) de la présence en co-culture des trois types cellulaires majoritaires provenant de la tumeur : les cellules endothéliales, les péricytes et les télocytes. Cela suggère que la croissance des hémangiomes infantiles et l'action du propranolol dépendent d'un dialogue intercellulaire endocrine et/ou paracrine au sein des vaisseaux de la tumeur.

Pour poursuivre l'étude, il serait intéressant d'invalider le récepteur ADRB2, majoritaire dans l'HI, sur chacun des types cellulaires de l'hémangiome infantile pour déterminer si le propranolol a un effet « on » ou « off target » dans ce modèle et identifier quel type cellulaire « fixant » le propranolol est responsable de l'effet thérapeutique.

Nos résultats de l'étude de l'expression et de la localisation des enzymes de la voie de biosynthèse des catécholamines ont montré que les cellules vasculaires et périvasculaires des hémangiomes infantiles expriment les enzymes de synthèse de la noradrénaline, tyrosine hydroxylase (TH), DOPA décarboxylase (DDC) et dopamine β -hydroxylase (DBH). Les dosages réalisés sur les trois types cellulaires isolés de tissus frais d'hémangiomes infantiles ont également montré leur capacité de sécrétion de la noradrénaline en culture, mais à des niveaux relativement bas, à la limite du seuil de détection. Ceci peut s'expliquer par l'impossibilité clinique et éthique d'obtenir des biopsies ou reliquats chirurgicaux d'hémangiomes infantiles en phase proliférative très précoce, dont les cellules auraient a priori la plus forte activité adrénergique. En effet, notre étude histologique sur les enzymes de synthèse de la noradrénaline montre que leur expression décroît rapidement avec l'involution. Néanmoins, nous avons pu confirmer que les trois types cellulaires d'hémangiome infantile sur lesquels porte cette étude ont la capacité enzymatique de synthétiser et de sécréter de manière localisée la noradrénaline au stade prolifératif, ce qui pourrait expliquer l'efficacité du propranolol au stade précoce de la tumeur. Du fait de l'expression des enzymes de biosynthèse des catécholamines et des récepteurs ADRB par les cellules, des régulations autocrines et paracrines par la noradrénaline peuvent avoir lieu au sein de la tumeur et augmenter l'angiogenèse avec la régulation d'AQP1. Le *switch* anti-angiogénique à l'origine de l'involution peut s'expliquer par l'arrêt de la synthèse de la noradrénaline en lien avec une modération de l'hypoxie due à la maturation vasculaire améliorant la perfusion de la tumeur. De la même manière, le traitement au propranolol, en antagonisant les effets de la noradrénaline sur les récepteurs ADRB, induirait ce *switch* anti-angiogénique et la régression rapide de la tumeur après quelques mois de traitement. La détermination du rôle de la régulation éventuelle d'AQP1 dans l'involution naturelle nécessite une étude sur un large panel de patients, mais sa

régulation par la noradrénaline et le propranolol *in vitro* (Figure 50) suggère une diminution d'AQP1 avec l'involution.



Figure 49 : Modèle proposé de la signalisation vasculaire et périvasculaire dans l'HI et son implication dans la réponse au propranolol. Les cellules endothéliales, les péricytes et les télocytes expriment les enzymes de synthèses des catécholamines et sont donc capables d'une sécrétion locale de noradrénaline. Celle-ci peut agir de manière auto- ou paracrine pour stimuler la signalisation bêta-adrénergique. Elle pourrait également stimuler AQP1 pour, *in fine*, participer au profil pro-angiogénique de l'HI. Le propranolol, en antagonisant la fixation de la noradrénaline sur les récepteurs ADRB, exerce un effet anti-angiogénique. CE : cellules endothéliales, MC : mastocytes, PER : péricytes, TC : télocytes.

Angiosarcome :

L'expression d'AQP1 et du récepteur ADRB2 a été étudiée par immunomarquage dans deux échantillons d'angiosarcomes épithélioïdes. La masse tumorale, formée de cellules d'origine endothéliale, exprime AQP1 et CD31 ; un marquage plus faible de CD34 et ADRB2 a été observé.

Nous avons étudié les effets du propranolol *in vitro* sur les lignées tumorales humaines ISO-HAS et MO-LAS, utilisées comme modèle d'étude de l'angiosarcome. Les deux lignées cellulaires expriment de manière semblable AQP1, ADRB2 et CD31. Les cellules expriment aussi faiblement le récepteur ADRB1. Les deux lignées possèdent des propriétés tubulogéniques propres et ont montré un profil de réponse au propranolol bien distinct. Le bêtabloquant a inhibé la tubulogénèse et la migration de la lignée MO-LAS, mais a très faiblement impacté celle des cellules ISO-HAS dans ces tests. La surexpression d'AQP1 a en revanche fortement augmenté la migration des cellules ISO-HAS, les rendant sensibles à l'ajout de propranolol. Ces différences peuvent être liées au fait que les deux lignées ISO-HAS et MO-LAS ont été isolées de deux angiosarcomes différents, un hémangiosarcome et un lymphangiosarcome respectivement et à leur niveau d'expression différent d'AQP1. Les résultats de sphéroïdes ont montré que le propranolol empêche la formation de sphéroïdes compactes par les cellules MO-LAS et ISO-HAS et ce, dès 10 μ M, sans induire de cytotoxicité. Le traitement au propranolol après formation des sphéroïdes par les cellules MO-LAS et ISO-HAS entraîne une augmentation rapide de l'aire des sphéroïdes tumoraux correspondant à une dissociation cellulaire (décompaction). La surexpression d'AQP1 dans la lignée ISO-HAS n'a pas modifié la formation de sphéroïdes ni la réponse au propranolol dans nos résultats préliminaires (Figure 51), ce qui suggère l'intervention de mécanismes différents dans les modèles scratch et sphéroïdes.

Les cellules MO-LAS et ISO-HAS expriment faiblement le récepteur ADRB1 en plus du récepteur ADRB2 (Figure 35), et bien que la littérature et nos travaux suggèrent un effet ant-angiogénique et anti-tumoral passant par le récepteur ADRB2, le propranolol

étant non sélectif des récepteurs ADRB1/ADRB2, il peut éventuellement agir en se fixant sur les deux types de récepteurs. Pour étudier le rôle d'ADRB2, l'effet du propranolol sur les sphéroïdes des cellules MO-LAS et ISO-HAS transduites par shARN (shCT ou shADRB2) a été étudié. De manière intéressante, le shADRB2 a eu le même effet de décompaction des sphéroïdes que le propranolol et cet effet du propranolol est perdu sur les cellules shADRB2, ce qui suggère un effet majeur et « on target » du bêtabloquant sur ce récepteur dans les deux lignées. L'implication du récepteur ADRB1 dans la réponse au propranolol a aussi été étudiée par le traitement des cellules avec l'aténolol, antagoniste sélectif des récepteurs ADRB1. L'aténolol induit le même effet que le propranolol sur les cellules contrôles (dissociation du sphéroïdes traduit par l'augmentation de son aire). En revanche, il a significativement diminué l'aire occupée par les deux lignées tumorales invalidées pour le récepteur ADRB2. Ce résultat suggère un possible rôle du récepteur ADRB1 dans la formation de sphéroïdes et dans la réponse au propranolol, mais nécessite l'utilisation d'un shADRB1 pour le confirmer car même les bêtabloquants dits cardio-sélectif (ADRB1) ont une affinité, bien que moindre, sur les récepteurs ADRB2, qui sera fonction de la dose utilisée.

Discussion générale

D'un point de vue mécanistique, nos travaux sur les modèles *in vivo* et *in vitro* ont montré un effet « on target » du propranolol sur les récepteurs bêta-adrénergiques majoritairement associé à l'angiogenèse, la migration et l'interaction cellule-cellule. L'axe ADRB2-AQP1 s'est avéré prépondérant dans ces effets, les acteurs intermédiaires restent cependant à déterminer.

D'autre part, plusieurs études ont montré un effet anti-tumoral du propranolol indépendant (« off target ») des récepteurs ADRB¹⁷⁶, associé à une inhibition de la migration et de l'angiogenèse mais aussi de la viabilité cellulaire. Overman *et al.* ont montré que le propranolol inhibe le facteur de transcription SOX18. De plus, le propranolol, l'énantiomère R(+) et un inhibiteur de SOX18 empêchent la différenciation des cellules souches d'hémangiome infantile, mais pas l'énantiomère

S(-)¹⁷⁷. Dans la même étude, *in vitro*, le propranolol potentialise la cytotoxicité de la vinblastine sur une lignée humaine d'angiosarcome invalidée pour le récepteur ADRB2. Une autre étude a montré que l'énantiomère R(+) inhibe la croissance tumorale dans un modèle *in vivo* d'hémangiome infantile¹⁷⁸. Ces auteurs s'appuient sur le fait que l'énantiomère S(-) possède la plus forte activité antagoniste des récepteurs bêta-adrénergiques, l'énantiomère R(+) étant 47 fois moins bêtabloquant¹⁷⁹. Or en clinique, le propranolol est administré sous une formulation racémique des deux énantiomères. Les effets du propranolol résultent donc de la combinaison des effets des deux énantiomères. Ces études montrent l'intérêt de prendre en compte la stéréospécificité des deux énantiomères pour les récepteurs ADRB et suggèrent l'utilisation de l'énantiomère R(+) et du blocage de SOX18 dans le traitement des tumeurs vasculaires. En clinique, plusieurs bêtabloquants différents ont montré un effet sur l'hémangiome infantile et ont été associés à un effet protecteur des cancers, il reste donc encore des zones d'ombre à explorer quant au meilleur usage et aux mécanismes d'action de ces molécules.

Ce travail de thèse contribue à relever les défis actuels de la cancérologie pour le développement de nouvelles thérapies anti-tumorales.

Le propranolol est une molécule bien tolérée dont le repositionnement en cancérologie présente un intérêt économique et clinique. Sur cette base, des études cliniques sont en cours pour évaluer l'effet thérapeutique du propranolol sur les angiosarcomes en monothérapie ou en combinaison des chimiothérapies (NCT04518124, Pays-Bas, NCT02732678, France). Compte-tenu de l'expression par l'angiosarcome des récepteurs ADRB et du rôle de la voie bêta-adrénergique dans le développement et la croissance tumorale, il a été accordé en 2016 par l'Agence Médicale Européenne au propranolol le statut de médicament orphelin pour le traitement des sarcomes des tissus mous. Les modèles développés dans cette étude ont eu pour but de mieux comprendre les mécanismes d'action du propranolol et d'identifier de nouvelles cibles et des marqueurs prédictifs permettant d'aiguiller l'usage de cette drogue en clinique.

Ces résultats suggèrent, aux côtés d'autres études, une possible inclusion du propranolol dans un schéma thérapeutique, seul ou en combinaison aux

chimiothérapies, pour le traitement des angiosarcomes. L'utilisation d'AQP1 en tant que marqueur prédictif de réponse est à envisager et pourrait donner lieu à des collaborations avec les études cliniques angiosarcome et propranolol pour affiner les résultats de manière rétrospective. La poursuite de notre étude protéomique pourrait déboucher sur d'autres marqueurs et éventuellement des cibles thérapeutiques complémentaires.

CONCLUSION

Grâce au modèle *in vitro* d'hémangiome infantile, nous avons montré un rôle clé de la protéine AQP1, des télocytes et de la noradrénaline dans la réponse anti-angiogénique de l'hémangiome infantile au propranolol. Les résultats obtenus sur l'angiosarcome ont montré un effet inhibiteur du propranolol sur des processus tumoraux, encourageant à poursuivre les recherches autour d'un repositionnement du bêtabloquant dans ces tumeurs.

PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

1. Article publié

François Moisan, **Sandra Oucherif**, Priscilla Kaulanjan-Checkmodine, Sorilla Prey, Benoît Rousseau, Marc Bonneau, Stéphane Claverol, Etienne Gontier, Sabrina Lacomme, Lea Dousset, Thierry Couffinhal, Jerome Toutain, Maya Loot, Muriel Cario-André, Marie-Laure Jullié, Christine Léauté-Labrèze, Alain Taieb, Hamid Reza Rezvani. Critical role of Aquaporin-1 and telocytes in infantile hemangioma response to propranolol beta blockade

Proc Natl Acad Sci U S A. 2021 Feb 16. doi: 10.1073/pnas.2018690118.

2. Article soumis JCI

Sandra Oucherif, Priscilla Kaulanjan-Checkmodine, Sorilla Prey, Etienne Gontier, Sabrina Lacomme, Maya Loot, Marijana Licina, Christine Léauté-Labrèze, Alain Taieb, François Moisan, Hamid Reza Rezvani. Infantile hemangioma sensitivity to propranolol treatment relies on the presence of noradrenaline

3. Communications orales

- European Society for Dermatological Research (ESDR). 18-21 septembre 2019. Bordeaux, France. **S Oucherif**, P Kaulanjan-Checkmodine, S Prey, M Loot, C Leaute-Labreze, HR Rezvani, A Taieb, F Moisan. Infantile Hemangioma angiogenesis and sensitivity to propranolol rely on a cross talk between vascular and perivascular stromal cells.
- European Society for Dermatological Research (ESDR). 22-25 septembre. 2021. Congrès virtuel. **S Oucherif**, P Kaulanjan-Checkmodine, S Prey, M Loot, C Leaute-Labreze, HR Rezvani, A Taieb, F Moisan. Critical role of Aquaporin-1 and telocytes in infantile hemangioma response to propranolol beta blockade.

- European Society for Dermatological Research (ESDR), Pierre Fabre Symposium “Novel aspects in vascular biology of the skin. 18-21 septembre 2019. Bordeaux, France. F Moisan, **S Oucherif**, P Kaulanjan-Checkmodine, S Prey, M Loot, C Leaute-Labreze, HR Rezvani, A Taieb. Telocytes in infantile hemangioma: target cells for propranolol?
- International Society for the Study of Vascular Anomalies. 14-15 Mai 2020. Congrès virtuel. F Moisan, **Oucherif S**, P Kaulanjan-Checkmodine, S Prey, M Loot, C Leaute-Labreze, HR Rezvani, A Taieb. Critical role of Aquaporin-1 and telocytes in infantile hemangioma response to propranolol.
- Journées dermatologiques de Paris. 4 décembre 2021. Paris, France. F Moisan, **Oucherif S**, P Kaulanjan-Checkmodine, S Prey, M Loot, C Leaute-Labreze, HR Rezvani, A Taieb. Rôle critique de l'Aquaporine-1 et des télocytes dans la réponse de l'hémangiome infantile au propranolol.

4. Communications affichées

- Journée Scientifique de l'Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé. Poster affiché. 14 mai 2019. Bordeaux, France. **S Oucherif**, P Kaulanjan-Checkmodine, S Prey, M Loot, C Leaute-Labreze, HR Rezvani, A Taieb, F Moisan. Infantile Hemangioma angiogenesis and sensitivity to propranolol rely on a cross talk between vascular and perivascular stromal cells.
- European Society for Dermatological Research (ESDR). Poster affiché. 18-21 septembre 2019. Bordeaux, France. **S Oucherif**, P Kaulanjan-Checkmodine, S Prey, M Loot, C Leaute-Labreze, HR Rezvani, A Taieb, F Moisan. Infantile Hemangioma angiogenesis and sensitivity to propranolol rely on a cross talk between vascular and perivascular stromal cells.

- Journées Cancéropôle Grand Sud-Ouest (GSO). Poster affiché. 20 au 22 novembre 2019. Arcachon, France. **S Oucherif**, P Kaulanjan-Checkmodine, S Prey, M Loot, C Leaute-Labreze, HR Rezvani, A Taieb, F Moisan. Infantile Hemangioma angiogenesis and sensitivity to propranolol rely on a cross talk between vascular and perivascular stromal cells.
- Annual SBM Department Day. Poster affiché. 2 décembre 2020. Congrès virtuel. **S Oucherif**, P Kaulanjan-Checkmodine, S Prey, M Loot, C Leaute-Labreze, HR Rezvani, A Taieb, F Moisan. Critical role of Aquaporin-1 and telocytes in infantile hemangioma response to propranolol beta-blockade.

BIBLIOGRAPHIE

1. Cole, S. W. & Sood, A. K. Molecular pathways: Beta-adrenergic signaling in cancer. *Clinical Cancer Research* vol. 18 1201–1206 (2012).
2. Prey, S. *et al.* Mast cells as possible targets of propranolol therapy: an immunohistological study of beta-adrenergic receptors in infantile hemangiomas. *Histopathology* (2014) doi:10.1111/his.12421.
3. Chakroborty, D., Sarkar, C., Basu, B., Dasgupta, P. S. & Basu, S. Catecholamines regulate tumor angiogenesis. *Cancer Research* vol. 69 3727–3730 (2009).
4. Risau, W. *et al.* Vasculogenesis and angiogenesis in embryonic-stem-cell-derived embryoid bodies. *Development* vol. 102 471–478 (1988).
5. Risau, W. & Flamme, I. Vasculogenesis. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* vol. 11 73–91 (1995).
6. Risau, W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* vol. 386 671–674 (1997).
7. Ribatti, D., Vacca, A., Nico, B., Roncali, L. & Dammacco, F. Postnatal vasculogenesis. *Mechanisms of Development* vol. 100 157–163 (2001).
8. Moschetta, M. *et al.* Role of endothelial progenitor cells in cancer progression. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer* vol. 1846 26–39 (2014).
9. Feige, J. J. L'angiogenèse tumorale: Progrès récents et défis persistants. *Bulletin du Cancer* vol. 97 1305–1310 (2010).
10. M, S. Vascular endothelial growth factor receptor-1 (VEGFR-1/Flt-1): a dual regulator for angiogenesis. *Angiogenesis* **9**, 225–230 (2006).
11. Shibuya, M. Vascular endothelial growth factor receptor-1 (VEGFR-1/Flt-1): a dual regulator for angiogenesis. *Angiogenesis* vol. 9 225–230 (2006).
12. Olsson, A. K., Dimberg, A., Kreuger, J. & Claesson-Welsh, L. VEGF receptor signalling - In control of vascular function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* vol. 7 359–371 (2006).
13. Lamalice, L., Le Boeuf, F. & Huot, J. Endothelial cell migration during angiogenesis. *Circulation Research* vol. 100 782–794 (2007).

14. Eklund, L. & Olsen, B. R. Tie receptors and their angiopoietin ligands are context-dependent regulators of vascular remodeling. *Experimental Cell Research* vol. 312 630–641 (2006).
15. Akwii, R. G., Sajib, M. S., Zahra, F. T. & Mikelis, C. M. Role of Angiopoietin-2 in Vascular Physiology and Pathophysiology. *Cells* vol. 8 471 (2019).
16. Dvorak, H. F. Angiogenesis: Update 2005. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* vol. 3 1835–1842 (2005).
17. Goldstein, D. S., Eisenhofer, G. & Kopin, I. J. Sources and significance of plasma levels of catechols and their metabolites in humans. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* vol. 305 800–811 (2003).
18. Sawada, H., Oeda, T. & Yamamoto, K. Catecholamines and Neurodegeneration in Parkinson's Disease—From Diagnostic Marker to Aggregations of α -Synuclein. *Diagnostics* vol. 3 210–221 (2013).
19. Kvetnansky, R., Sabban, E. L. & Palkovits, M. Catecholaminergic systems in stress: Structural and molecular genetic approaches. *Physiological Reviews* vol. 89 535–606 (2009).
20. Luttrell, L. M. *et al.* B-Arrestin-Dependent Formation of B2 Adrenergic Receptor-Src Protein Kinase Complexes. *Science* vol. 283 655–661 (1999).
21. Zhang, X. *et al.* Genome-wide analysis of cAMP-response element binding protein occupancy, phosphorylation, and target gene activation in human tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* vol. 102 4459–4464 (2005).
22. De Rooij, J. *et al.* Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP. *Nature* vol. 396 474–477 (1998).
23. Liggett, S. B. Update on current concepts of the molecular basis of β 2-adrenergic receptor signaling. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* vol. 110 (2002).
24. Daly, C. J. & McGrath, J. C. Previously unsuspected widespread cellular and tissue distribution of β -adrenoceptors and its relevance to drug action. *Trends in Pharmacological Sciences* vol. 32 219–226 (2011).
25. Chida, Y., Hamer, M., Wardle, J. & Steptoe, A. Do stress-related psychosocial factors contribute to cancer incidence and survival? *Nature Clinical Practice Oncology* vol. 5 466–475 (2008).

26. Sloan, E. K. *et al.* The sympathetic nervous system induces a metastatic switch in primary breast cancer. *Cancer Research* vol. 70 7042–7052 (2010).
27. Thaker, P. H. *et al.* Chronic stress promotes tumor growth and angiogenesis in a mouse model of ovarian carcinoma. *Nat. Med.* **12**, 939–44 (2006).
28. Rains, S. L., Amaya, C. N. & Bryan, B. A. Beta-adrenergic receptors are expressed across diverse cancers. *Oncoscience* vol. 4 95–105 (2017).
29. Yang, E. V. *et al.* Norepinephrine up-regulates the expression of vascular endothelial growth factor, matrix metalloproteinase (MMP)-2, and MMP-9 in nasopharyngeal carcinoma tumor cells. *Cancer Research* vol. 66 10357–10364 (2006).
30. Lutgendorf, S. K. *et al.* Stress-related mediators stimulate vascular endothelial growth factor secretion by two ovarian cancer cell lines. *Clinical Cancer Research* vol. 9 4514–4521 (2003).
31. Lutgendorf, S. K. *et al.* Biobehavioral influences on matrix metalloproteinase expression in ovarian carcinoma. *Clinical Cancer Research* vol. 14 6839–6846 (2008).
32. Lutgendorf, S. K. *et al.* Social isolation is associated with elevated tumor norepinephrine in ovarian carcinoma patients. *Brain, Behavior, and Immunity* vol. 25 250–255 (2011).
33. Nilsson, M. B. *et al.* Stress hormones regulate interleukin-6 expression by human ovarian carcinoma cells through a Src-dependent mechanism. *Journal of Biological Chemistry* vol. 282 29919–29926 (2007).
34. Basu, S. *et al.* Ablation of peripheral dopaminergic nerves stimulates malignant tumor growth by inducing vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis. *Cancer Research* vol. 64 5551–5555 (2004).
35. Chakroborty, D. *et al.* Dopamine regulates endothelial progenitor cell mobilization from mouse bone marrow in tumor vascularization. *Journal of Clinical Investigation* vol. 118 1380–1389 (2008).
36. Shahzad, M. M. K. *et al.* Stress effects on FosB- and interleukin-8 (IL8)-driven ovarian cancer growth and metastasis. *Journal of Biological Chemistry* vol. 285 35462–35470 (2010).

37. Yang, E. V. *et al.* Norepinephrine upregulates VEGF, IL-8, and IL-6 expression in human melanoma tumor cell lines: Implications for stress-related enhancement of tumor progression. *Brain, Behavior, and Immunity* vol. 23 267–275 (2009).
38. Guido Iaccarino, Michele Ciccarelli, Daniela Sorriento, Gennaro Galasso, Alfonso Campanile, Gaetano Santulli, Ersilia Cipolletta, Vincenzo Cerullo, Vincenzo Cimini, Giovanna Giuseppina Altobelli, Federico Piscione, Ornella Priante, Lucio Pastore, Massimo, W. J. K. and B. T. Ischemic Neoangiogenesis Enhanced by α_2 -Adrenergic Receptor Overexpression-2005-Iaccarino.pdf. *Circ Res.* (2005).
39. Sood, A. K. *et al.* Adrenergic modulation of focal adhesion kinase protects human ovarian cancer cells from anoikis. *J. Clin. Invest.* **120**, 1515–23 (2010).
40. Hara, M. R. *et al.* A stress response pathway regulates DNA damage through β_2 -adrenoreceptors and β -arrestin-1. *Nature* vol. 477 349–353 (2011).
41. Inbar, S. *et al.* Do stress responses promote leukemia progression? an animal study suggesting a role for epinephrine and prostaglandin-e2 through reduced nk activity. *PLoS ONE* vol. 6 (2011).
42. Powe, D. G. *et al.* Beta-blocker drug therapy reduces secondary cancer formation in breast cancer and improves cancer specific survival. *Oncotarget* vol. 1 628–638 (2010).
43. de Giorgi, V. *et al.* Treatment with β -blockers and reduced disease progression in patients with thick melanoma. *Archives of Internal Medicine* vol. 171 779–781 (2011).
44. Lowenthal, D. T., Saris, S. D., Packer, J., Haratz, A. & Conry, K. Mechanisms of action and the clinical pharmacology of beta-adrenergic blocking drugs. *American Journal of Medicine* vol. 77 119–127 (1984).
45. Reiter, M. J. Cardiovascular drug class specificity: β -blockers. *Progress in Cardiovascular Diseases* vol. 47 11–33 (2004).
46. do Vale, G. T., Ceron, C. S., Gonzaga, N. A., Simplicio, J. A. & Padovan, J. C. Three Generations of β -blockers: History, Class Differences and Clinical Applicability. *Current Hypertension Reviews* vol. 15 22–31 (2018).
47. Léauté-Labrèze, C., Harper, J. I. & Hoeger, P. H. Infantile haemangioma. *The*

- Lancet* vol. 390 85–94 (2017).
48. Storch, C. H. & Hoeger, P. H. Propranolol for infantile haemangiomas: Insights into the molecular mechanisms of action. *British Journal of Dermatology* vol. 163 269–274 (2010).
 49. Greenberger, S. & Bischoff, J. Pathogenesis of infantile haemangioma. *British Journal of Dermatology* vol. 169 12–19 (2013).
 50. Yu, Y., Varughese, J., Brown, L. F., Mulliken, J. B. & Bischoff, J. Increased Tie2 expression, enhanced response to angiopoietin-1, and dysregulated angiopoietin-2 expression in hemangioma-derived endothelial cells. *Am. J. Pathol.* **159**, 2271–80 (2001).
 51. Yuan, S. M. *et al.* The adipogenesis in infantile hemangioma and the expression of adipogenic-related genes. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* vol. 10 11596–11602 (2017).
 52. Munden, A. *et al.* Prospective study of infantile haemangiomas: Incidence, clinical characteristics and association with placental anomalies. *British Journal of Dermatology* vol. 170 907–913 (2014).
 53. Goelz, R. & Poets, C. F. Incidence and treatment of infantile haemangioma in preterm infants. *Archives of Disease in Childhood: Fetal and Neonatal Edition* vol. 100 F85–F91 (2015).
 54. North, P. E., Waner, M., Mizeracki, A. & Mihm, M. C. GLUT1: A newly discovered immunohistochemical marker for juvenile hemangiomas. *Human Pathology* vol. 31 11–22 (2000).
 55. Boye, E. *et al.* Clonality and altered behavior of endothelial cells from hemangiomas. *J. Clin. Invest.* **107**, 745–52 (2001).
 56. Walter, J. W. *et al.* Somatic mutation of vascular endothelial growth factor receptors in juvenile hemangioma. *Genes Chromosomes and Cancer* vol. 33 295–303 (2002).
 57. Jinnin, M. *et al.* Suppressed NFAT-dependent VEGFR1 expression and constitutive VEGFR2 signaling in infantile hemangioma. *Nature Medicine* vol. 14 1236–1246 (2008).
 58. North, P. E., Waner, M. & Brodsky, M. C. Are infantile hemangioma of placental origin? *Ophthalmology* vol. 109 223–224 (2002).

59. Huang, S. A. *et al.* Severe Hypothyroidism Caused by Type 3 Iodothyronine Deiodinase in Infantile Hemangiomas. *New England Journal of Medicine* vol. 343 185–189 (2000).
60. Takahashi, K. *et al.* Cellular markers that distinguish the phases of hemangioma during infancy and childhood. *Journal of Clinical Investigation* vol. 93 2357–2364 (1994).
61. Chang, J. *et al.* Proliferative hemangiomas: Analysis of cytokine gene expression and angiogenesis. *Plastic and Reconstructive Surgery* vol. 103 1–10 (1999).
62. Kleinman, M. E. *et al.* Hypoxia-induced mediators of stem/progenitor cell trafficking are increased in children with hemangioma. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **27**, 2664–70 (2007).
63. Greenberger, S., Boscolo, E., Adini, I., Mulliken, J. B. & Bischoff, J. Corticosteroid Suppression of VEGF-A in Infantile Hemangioma-Derived Stem Cells. *New England Journal of Medicine* vol. 362 1005–1013 (2010).
64. Augustin, H. G., Young Koh, G., Thurston, G. & Alitalo, K. Control of vascular morphogenesis and homeostasis through the angiopoietin - Tie system. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* vol. 10 165–177 (2009).
65. Koh, G. Y. Orchestral actions of angiopoietin-1 in vascular regeneration. *Trends in Molecular Medicine* vol. 19 31–39 (2013).
66. Calicchio, M. L., Collins, T. & Kozakewich, H. P. Identification of signaling systems in proliferating and involuting phase infantile hemangiomas by genome-wide transcriptional profiling. *American Journal of Pathology* vol. 174 1638–1649 (2009).
67. Perry, B. N. *et al.* Pharmacologic blockade of angiopoietin-2 is efficacious against model hemangiomas in mice. *Journal of Investigative Dermatology* vol. 126 2316–2322 (2006).
68. Boscolo, E. *et al.* JAGGED1 signaling regulates hemangioma stem cell-to-pericyte/vascular smooth muscle cell differentiation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* vol. 31 2181–2192 (2011).
69. Dornhoffer, J. R. *et al.* The expression of renin-angiotensin-aldosterone axis components in infantile hemangioma tissue and the impact of propranolol treatment. *Pediatric Research* vol. 82 155–163 (2017).

70. Itinteang, T., Brasch, H. D., Tan, S. T. & Day, D. J. Expression of components of the renin-angiotensin system in proliferating infantile haemangioma may account for the propranolol-induced accelerated involution. *Journal of Plastic, Reconstructive and Aesthetic Surgery* vol. 64 759–765 (2011).
71. Drolet, B. A. & Frieden, I. J. Characteristics of infantile hemangiomas as clues to pathogenesis: Does hypoxia connect the dots? *Archives of Dermatology* vol. 146 1295–1299 (2010).
72. Kleinman, M. E. *et al.* Increased circulating AC133+ CD34+ endothelial progenitor cells in children with hemangioma. *Lymphatic research and biology* vol. 1 301–307 (2003).
73. Ramakrishnan, S. K. & Shah, Y. M. A central role for hypoxia-inducible factor (HIF)-2 α in hepatic glucose homeostasis. *Nutrition and Healthy Aging* vol. 4 207–216 (2017).
74. Khan, Z. A. Z. A. *et al.* Multipotential stem cells recapitulate human infantile hemangioma in immunodeficient mice. *J. Clin. Invest.* **118**, 2592–9 (2008).
75. Smoller, B. R. & Apfelberg, D. B. Infantile (juvenile) capillary hemangioma: A tumor of heterogeneous cellular elements. *Journal of Cutaneous Pathology* vol. 20 330–336 (1993).
76. Dadras, S. S., North, P. E., Bertocini, J., Mihm, M. C. & Detmar, M. Infantile hemangiomas are arrested in an early developmental vascular differentiation state. *Modern Pathology* vol. 17 1068–1079 (2004).
77. Dosanjh, A. *et al.* In vitro characteristics of neonatal hemangioma endothelial cells: Similarities and differences between normal neonatal and fetal endothelial cells. *Journal of Cutaneous Pathology* vol. 27 441–450 (2000).
78. Rakocevic, J. *et al.* Endothelial cell markers from clinician's perspective. *Experimental and Molecular Pathology* vol. 102 303–313 (2017).
79. Boscolo, E., Mulliken, J. B. & Bischoff, J. Pericytes from infantile hemangioma display proangiogenic properties and dysregulated angiopoietin-1. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **33**, 501–9 (2013).
80. Zhaofu, L. & Dongqing, C. Cardiac telocytes in regeneration of myocardium after myocardial infarction. *Advances in Experimental Medicine and Biology* vol. 913 229–239 (2016).

81. Kucybala, I. *et al.* A comprehensive guide to telocytes and their great potential in cardiovascular system. *Bratislava Medical Journal* vol. 118 302–309 (2017).
82. Gherghiceanu, M. & Popescu, L. M. Cardiac telocytes - Their junctions and functional implications. *Cell and Tissue Research* vol. 348 265–279 (2012).
83. Marini, M. *et al.* Telocytes in normal and keratoconic human cornea: an immunohistochemical and transmission electron microscopy study. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* vol. 21 3602–3611 (2017).
84. Díaz-Flores, L., Gutiérrez, R., Gómez, M. G., Sáez, F. J. & Madrid, J. F. Behaviour of telocytes during physiopathological activation. *Seminars in Cell and Developmental Biology* vol. 55 50–61 (2016).
85. Cretoiu, S. M. & Popescu, L. M. Telocytes revisited. *Biomolecular Concepts* vol. 5 353–369 (2014).
86. Richter, M. & Kostin, S. The failing human heart is characterized by decreased numbers of telocytes as result of apoptosis and altered extracellular matrix composition. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* vol. 19 2597–2606 (2015).
87. Pieri, L., Vannucchi, M. G. & Faussonne-Pellegrini, M. S. Histochemical and ultrastructural characteristics of an interstitial cell type different from ICC and resident in the muscle coat of human gut. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* vol. 12 1944–1955 (2008).
88. Díaz-Flores, L. *et al.* CD34+ stromal cells/fibroblasts/fibrocytes/telocytes as a tissue reserve and a principal source of mesenchymal cells. Location, morphology, function and role in pathology. *Histology and Histopathology* vol. 29 831–870 (2014).
89. Fertig, E. T., Gherghiceanu, M. & Popescu, L. M. Extracellular vesicles release by cardiac telocytes: Electron microscopy and electron tomography. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* vol. 18 1938–1943 (2014).
90. Galiger, C. *et al.* Phenotypical and ultrastructural features of Oct4-positive cells in the adult mouse lung. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* vol. 18 1321–1333 (2014).
91. Díaz-Flores, L., Gutiérrez, R., Sáez, F. J., Díaz-Flores, L. & Madrid, J. F. Telocytes in neuromuscular spindles. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*

- vol. 17 457–465 (2013).
92. Zhou, J. *et al.* Distribution and characteristics of telocytes as nurse cells in the architectural organization of engineered heart tissues. *Science China Life Sciences* vol. 57 241–247 (2014).
 93. Khalifa, M. A., Montgomery, E. A., Ismiil, N. & Azumi, N. What are the CD34+ cells in benign peripheral nerve sheath tumors? Double immunostaining study of CD34 and S-100 protein. *American Journal of Clinical Pathology* vol. 114 123–126 (2000).
 94. Weiss, S. W. & Nickoloff, B. J. CD-34 is expressed by a distinctive cell population in peripheral nerve, nerve sheath tumors, and related lesions. *American Journal of Surgical Pathology* vol. 17 1039–1045 (1993).
 95. Tan, S. T., Wallis, R. A., He, Y. & Davis, P. F. Mast cells and hemangioma. *Plastic and Reconstructive Surgery* vol. 113 999–1011 (2004).
 96. Biswas, A., Richards, J. E., Massaro, J. & Mahalingam, M. Mast cells in cutaneous tumors: Innocent bystander or maestro conductor? *International Journal of Dermatology* vol. 53 806–811 (2014).
 97. Wang, F. Q. *et al.* M2-polarised macrophages in infantile haemangiomas: Correlation with promoted angiogenesis. *Journal of Clinical Pathology* vol. 66 1058–1064 (2013).
 98. Hamam, D., Ali, D., Kassem, M., Aldahmash, A. & Alajez, N. M. Micrnas as regulators of adipogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Stem Cells and Development* vol. 24 417–425 (2015).
 99. Sethuraman, G., Yenamandra, V. & Gupta, V. Management of infantile hemangiomas: Current trends. *Journal of Cutaneous and Aesthetic Surgery* vol. 7 75 (2014).
 100. Greenberger, S., Adini, I., Boscolo, E., Mulliken, J. B. & Bischoff, J. Targeting NF- κ B in infantile hemangioma-derived stem cells reduces VEGF-A expression. *Angiogenesis* vol. 13 327–335 (2010).
 101. Léauté-Labrèze, C. *et al.* Propranolol for Severe Hemangiomas of Infancy. *New England Journal of Medicine* vol. 358 2649–2651 (2008).
 102. Léauté-Labrèze, C. *et al.* A Randomized, Controlled Trial of Oral Propranolol in Infantile Hemangioma. *New England Journal of Medicine* vol. 372 735–746

- (2015).
103. Chisholm, K. M. *et al.* β -Adrenergic receptor expression in vascular tumors. *Mod. Pathol.* **25**, 1446–51 (2012).
 104. Fredriksson, J. M., Lindquist, J. M., Bronnikov, G. E. & Nedergaard, J. Norepinephrine induces vascular endothelial growth factor gene expression in brown adipocytes through a β -adrenoreceptor/cAMP/protein kinase A pathway involving Src but independently of Erk1/2. *Journal of Biological Chemistry* vol. 275 13802–13811 (2000).
 105. Ji, Y. *et al.* The role of β -adrenergic receptor signaling in the proliferation of hemangioma-derived endothelial cells. *Cell Div.* **8**, 1 (2013).
 106. Zhang, L. *et al.* Preliminary study on plasma RPN concentration of patients with infantile hemangioma treated with propranolol. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine* vol. 6 342–345 (2013).
 107. Young, R. J., Brown, N. J., Reed, M. W., Hughes, D. & Woll, P. J. Angiosarcoma. *The Lancet Oncology* vol. 11 983–991 (2010).
 108. Rouhani, P., Fletcher, C. D. M., Devesa, S. S. & Toro, J. R. Cutaneous soft tissue sarcoma incidence patterns in the U.S.: An analysis of 12,114 cases. *Cancer* vol. 113 616–627 (2008).
 109. Cao, J., Wang, J., He, C. & Fang, M. Angiosarcoma: a review of diagnosis and current treatment. *American journal of cancer research* vol. 9 2303–2313 (2019).
 110. Naka, N. *et al.* Angiosarcoma in Japan. A review of 99 cases. *Cancer* vol. 75 989–996 (1995).
 111. Lahat, G. *et al.* Outcome of locally recurrent and metastatic angiosarcoma. *Annals of Surgical Oncology* vol. 16 2502–2509 (2009).
 112. Antonescu, C. R. *et al.* KDR activating mutations in human angiosarcomas are sensitive to specific kinase inhibitors. *Cancer Research* vol. 69 7175–7179 (2009).
 113. Behjati, S. *et al.* Recurrent PTPRB and PLCG1 mutations in angiosarcoma. *Nature Genetics* vol. 46 376–379 (2014).
 114. Mutations of p53 tumor-suppressor gene in angiosarcoma - PubMed.
 115. JM, G. *et al.* Mutational status of K-ras and TP53 genes in primary sarcomas of the heart. *Br. J. Cancer* **82**, 1183–1185 (2000).

116. Chan, J. Y. *et al.* Multiomic analysis and immunoprofiling reveal distinct subtypes of human angiosarcoma. *Journal of Clinical Investigation* vol. 130 5833–5846 (2020).
117. Fraga-Guedes, C. *et al.* Angiosarcoma and atypical vascular lesions of the breast: diagnostic and prognostic role of MYC gene amplification and protein expression. *Breast Cancer Research and Treatment* vol. 151 131–140 (2015).
118. Cornejo, K. M. *et al.* The utility of MYC and FLT4 in the diagnosis and treatment of postradiation atypical vascular lesion and angiosarcoma of the breast. *Human Pathology* vol. 46 868–875 (2015).
119. Zietz, C. *et al.* MDM-2 oncoprotein overexpression, p53 gene mutation, and VEGF up- regulation in angiosarcomas. *American Journal of Pathology* vol. 153 1425–1433 (1998).
120. Tokuyama, W., Mikami, T., Masuzawa, M. & Okayasu, I. Autocrine and paracrine roles of VEGF/VEGFR-2 and VEGF-C/VEGFR-3 signaling in angiosarcomas of the scalp and face. *Human Pathology* vol. 41 407–414 (2010).
121. Naito, S. *et al.* Overexpression of Ets-1 transcription factor in angiosarcoma of the skin. *Pathology Research and Practice* vol. 196 103–109 (2000).
122. Dictor, M., Bendsøe, N., Runke, S. & Witte, M. Major basement membrane components in Kaposi's sarcoma, angiosarcoma and benign vascular neogenesis. *Journal of Cutaneous Pathology* vol. 22 435–441 (1995).
123. Tsunematsu, S. *et al.* Surgically diagnosed primary hepatic angiosarcoma. *Internal Medicine* vol. 57 687–691 (2018).
124. Ishida, Y., Otsuka, A. & Kabashima, K. Cutaneous angiosarcoma: Update on biology and latest treatment. *Current Opinion in Oncology* vol. 30 107–112 (2018).
125. Hata, M. Radiation therapy for angiosarcoma of the scalp: Total scalp irradiation and local irradiation. *Anticancer Research* vol. 38 1247–1253 (2018).
126. Florou, V. & Wilky, B. A. Current and Future Directions for Angiosarcoma Therapy. *Current Treatment Options in Oncology* vol. 19 (2018).
127. NT, H., LA, A., MJ, M. & B, T. A review of soft-tissue sarcomas: translation of biological advances into treatment measures. *Cancer Manag. Res.* **10**, 1089–1114 (2018).

128. Ravi, V. *et al.* Antitumor response of VEGFR2- and VEGFR3-amplified angiosarcoma to pazopanib. *JNCCN Journal of the National Comprehensive Cancer Network* vol. 14 499–502 (2016).
129. Chow, W. *et al.* Growth attenuation of cutaneous angiosarcoma with propranolol-mediated β -blockade. *JAMA Dermatology* vol. 151 1226–1229 (2015).
130. Pasquier, E. *et al.* Effective Management of Advanced Angiosarcoma by the Synergistic Combination of Propranolol and Vinblastine-based Metronomic Chemotherapy: A Bench to Bedside Study. *EBioMedicine* **6**, 87–95 (2016).
131. Galván, D. C., Ayyappan, A. P. & Bryan, B. A. Correction: Regression of primary cardiac angiosarcoma and metastatic nodules following propranolol as a single agent treatment. *Oncoscience* **5**, 1 (2019).
132. Amaya, C. N. *et al.* Non-selective beta blockers inhibit angiosarcoma cell viability and increase progression free- and overall-survival in patients diagnosed with metastatic angiosarcoma. *Oncoscience* vol. 5 109–119 (2018).
133. Lamy, S., Lachambre, M.-P., Lord-Dufour, S. & Béliveau, R. Propranolol suppresses angiogenesis in vitro: inhibition of proliferation, migration, and differentiation of endothelial cells. *Vascul. Pharmacol.* **53**, 200–8.
134. Porcelli, L. *et al.* The β -adrenergic receptor antagonist propranolol offsets resistance mechanisms to chemotherapeutics in diverse sarcoma subtypes: a pilot study. *Scientific Reports* vol. 10 (2020).
135. Saha, J. *et al.* Propranolol Sensitizes Vascular Sarcoma Cells to Doxorubicin by Altering Lysosomal Drug Sequestration and Drug Efflux. *Frontiers in Oncology* vol. 10 (2021).
136. Montoya, A. *et al.* The beta adrenergic receptor antagonist propranolol alters mitogenic and apoptotic signaling in late stage breast cancer. *Biomedical Journal* vol. 42 155–165 (2019).
137. Pasquier, E. *et al.* Propranolol potentiates the anti-angiogenic effects and anti-tumor efficacy of chemotherapy agents: implication in breast cancer treatment. *Oncotarget* **2**, 797–809 (2011).
138. Verkman, A. S. Aquaporins in clinical medicine. *Annual Review of Medicine* vol. 63 303–316 (2012).
139. Verkman, A. S. Water permeability measurement in living cells and complex

- tissues. *Journal of Membrane Biology* vol. 173 73–87 (2000).
140. Jamot, M. Les aquaporines de l'épiderme humain. Expression, localisation et modifications au cours de la différenciation. 43 (2011).
 141. Borgnia, M., Nielsen, S., Engel, A. & Agre, P. Cellular and molecular biology of the aquaporin water channels. *Annual Review of Biochemistry* vol. 68 425–458 (1999).
 142. Agre, P. *et al.* Aquaporin water channels - From atomic structure to clinical medicine. *Journal of Physiology* vol. 542 3–16 (2002).
 143. Murata, K. *et al.* Structural determinants of water permeation through aquaporin-1. *Nature* vol. 407 599–605 (2000).
 144. Wang, J. *et al.* Aquaporins as diagnostic and therapeutic targets in cancer: How far we are? *Journal of Translational Medicine* vol. 13 96 (2015).
 145. Azad, A. K. *et al.* Human Aquaporins: Functional Diversity and Potential Roles in Infectious and Non-infectious Diseases. *Frontiers in Genetics* vol. 12 344 (2021).
 146. Papadopoulos, M. C. & Verkman, A. S. Aquaporin water channels in the nervous system. *Nature Reviews Neuroscience* vol. 14 265–277 (2013).
 147. Kumari, S. S. & Varadaraj, K. Aquaporin 0 plays a pivotal role in refractive index gradient development in mammalian eye lens to prevent spherical aberration. *Biochemical and Biophysical Research Communications* vol. 452 986–991 (2014).
 148. Gomes, D. *et al.* Aquaporins are multifunctional water and solute transporters highly divergent in living organisms. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* vol. 1788 1213–1228 (2009).
 149. Nielsen, S. *et al.* Aquaporins in the kidney: From molecules to medicine. *Physiological Reviews* vol. 82 205–244 (2002).
 150. Papadopoulos, M. C. & Saadoun, S. Key roles of aquaporins in tumor biology. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* vol. 1848 2576–2583 (2015).
 151. Saadoun, S., Papadopoulos, M. C., Davies, D. C., Bell, B. A. & Krishna, S. Increased aquaporin I water channel expression in human brain tumours. *British Journal of Cancer* vol. 87 621–623 (2002).
 152. Saadoun, S., Papadopoulos, M. C., Davies, D. C., Krishna, S. & Bell, B. A.

- Aquaporin-4 expression is increased in oedematous human brain tumours. *Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry* vol. 72 262–265 (2002).
153. JH, Y., CX, Y., XJ, C. & YS, Z. Expression of aquaglyceroporins in epithelial ovarian tumours and their clinical significance. *J. Int. Med. Res.* **39**, 702–711 (2011).
154. Chou, C. L. *et al.* Reduced water permeability and altered ultrastructure in thin descending limb of Henle in aquaporin-1 null mice. *Journal of Clinical Investigation* vol. 103 491–496 (1999).
155. Rodríguez, A., Catalán, V., Gómez-Ambrosi, J. & Frühbeck, G. Aquaglyceroporins serve as metabolic gateways in adiposity and insulin resistance control. *Cell Cycle* vol. 10 1548–1556 (2011).
156. Zelenina, M., Zelenin, S. & Aperia, A. Water Channels (Aquaporins) and Their Role for Postnatal Adaptation. *Pediatric Research* vol. 57 47R-53R (2005).
157. Nejsum, L. N. The renal plumbing system: Aquaporin water channels. *Cellular and Molecular Life Sciences* vol. 62 1692–1706 (2005).
158. Boury-Jamot, M. *et al.* Expression and function of aquaporins in human skin: Is aquaporin-3 just a glycerol transporter? *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* vol. 1758 1034–1042 (2006).
159. Hara-Chikuma, M. *et al.* Chemokine-dependent T cell migration requires aquaporin-3-mediated hydrogen peroxide uptake. *Journal of Experimental Medicine* vol. 209 1743–1752 (2012).
160. Hara-Chikuma, M., Watanabe, S. & Satooka, H. Involvement of aquaporin-3 in epidermal growth factor receptor signaling via hydrogen peroxide transport in cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* vol. 471 603–609 (2016).
161. Hu, J. & Verkman, A. S. Increased migration and metastatic potential of tumor cells expressing aquaporin water channels. *FASEB J.* **20**, 1892–4 (2006).
162. Jiang, Y. Aquaporin-1 activity of plasma membrane affects HT20 colon cancer cell migration. *IUBMB Life* **61**, 1001–1009 (2009).
163. Schwab, A., Fabian, A., Hanley, P. J. & Stock, C. Role of ion channels and transporters in cell migration. *Physiological Reviews* vol. 92 1865–1913 (2012).
164. Stock, C. & Schwab, A. Ion channels and transporters in metastasis. *Biochimica*

- et Biophysica Acta - Biomembranes* vol. 1848 2638–2646 (2015).
165. Vacca, A. *et al.* Microvessel overexpression of aquaporin 1 parallels bone marrow angiogenesis in patients with active multiple myeloma. *British Journal of Haematology* vol. 113 415–421 (2001).
 166. Saadoun, S., Papadopoulos, M. C., Hara-Chikuma, M. & Verkman, A. S. Impairment of angiogenesis and cell migration by targeted aquaporin-1 gene disruption. *Nature* vol. 434 786–792 (2005).
 167. Inhibition of aquaporin-1 dependent angiogenesis impairs tumour growth in a mouse model of melanoma - Springer.
 168. Esteva-Font, C., Jin, B. J. & Verkman, A. S. Aquaporin-1 gene deletion reduces breast tumor growth and lung metastasis in tumor-producing MMTV-PyVT mice. *FASEB Journal* vol. 28 1446–1453 (2014).
 169. Hoque, M. O. *et al.* Aquaporin 1 is overexpressed in lung cancer and stimulates NIH-3T3 cell proliferation and anchorage-independent growth. *American Journal of Pathology* vol. 168 1345–1353 (2006).
 170. Wu, Z. *et al.* RNAi-mediated silencing of AQP1 expression inhibited the proliferation, invasion and tumorigenesis of osteosarcoma cells. *Cancer Biology and Therapy* vol. 16 1332–1340 (2015).
 171. Masuzawa, M. *et al.* Establishment and characterization of a novel lymphangiosarcoma cell line (MO-LAS) compared with the hemangiosarcoma cell line (ISO-HAS). *Cancer Medicine* vol. 1 39–46 (2012).
 172. Masuzawa, M. *et al.* Establishment of a human hemangiosarcoma cell line (ISO-HAS). *Int. J. Cancer* **81**, 305–308 (1999).
 173. Klebe, S. *et al.* Blockade of Aquaporin 1 Inhibits Proliferation, Motility, and Metastatic Potential of Mesothelioma In Vitro but not in an In Vivo Model. (2015) doi:10.1155/2015/286719.
 174. Ji, Y., Liao, X., Jiang, Y., Wei, W. & Yang, H. Aquaporin 1 knockdown inhibits triple-negative breast cancer cell proliferation and invasion invitro and invivo. *Oncology Letters* vol. 21 (2021).
 175. Zhang, J. *et al.* AQP1 expression alterations affect morphology and water transport in Schwann cells and hypoxia-induced up-regulation of AQP1 occurs in a HIF-1 α -dependent manner. *Neuroscience* vol. 252 68–79 (2013).

176. Lee, J. C., Modiri, O., England, R. W., Shawber, C. J. & Wu, J. K. Propranolol Therapy in Infantile Hemangioma: It Is Not Just about the Beta. *Plastic and Reconstructive Surgery* vol. 147 875–885 (2021).
177. Overman, J. *et al.* R-propranolol is a small molecule inhibitor of the SOX18 transcription factor in a rare vascular syndrome and hemangioma. *eLife* vol. 8 (2019).
178. Sasaki, M. *et al.* Propranolol exhibits activity against hemangiomas independent of beta blockade. *npj Precision Oncology* vol. 3 (2019).
179. BARRETT, A. M. & CULLUM, V. A. The biological properties of the optical isomers of propranolol and their effects on cardiac arrhythmias. *British Journal of Pharmacology* vol. 34 43–55 (1968).

ANNEXES

Annexe 1 : Résultats sur l'induction d'AQP1 par la noradrénaline dans les télocytes d'hémangiome infantile.

Dans la partie 1 sur le rôle des télocytes et d'AQP1 dans notre modèle *in vitro* d'hémangiome infantile publié dans PNAS, la noradrénaline était ajoutée dans le milieu pour les différents tests *in vitro* évaluant l'effet du propranolol (matériels et méthodes de l'article 1). Le rôle de la noradrénaline dans l'angiogenèse et dans la réponse au propranolol n'a été réellement étudié que par la suite dans la partie 2 (article 2) de ce manuscrit. Néanmoins nous avons pu montrer sur 3 patients que la noradrénaline induit une augmentation du niveau protéique d'AQP1 dans les télocytes d'hémangiome infantile après 2 h de traitement et que l'ajout de propranolol entraîne un retour au niveau basal de cette expression. Cette régulation peut expliquer l'effet pro-angiogénique de la noradrénaline et anti-angiogénique du propranolol dans notre modèle 3 cellules d'hémangiome infantile.

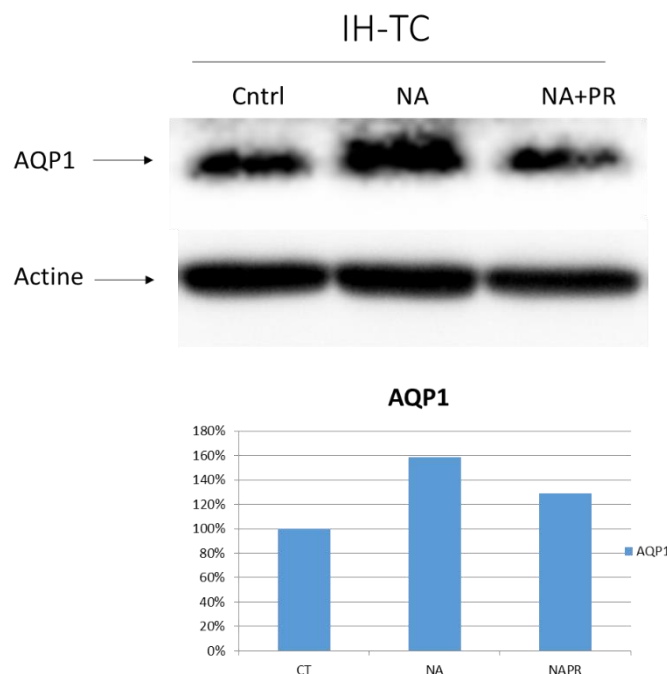


Figure 50 : Modulation d'AQP1 dans les télocytes d'hémangiome infantiles *in vitro*.

Annexe 2 : Résultats préliminaires sur la surexpression d'AQP1 dans les sphéroïdes des ISO-HAS

Nous avons également étudié l'effet du propranolol sur la formation de sphéroïdes par la lignée ISO-HAS surexprimant ou non AQP1. Les résultats ont montré que la lignée ISO-HAS est capable de former des sphéroïdes (Figure 46). L'ajout du bêtabloquant inhibe la formation de sphéroïdes compacts, sans effet supplémentaire de la surexpression d'AQP1. Il est à noter que les cellules ISO-HAS expriment faiblement le récepteur ADRB1, il serait donc intéressant d'évaluer l'effet du propranolol sur les sphéroïdes des cellules ISO-HAS shADRB1 et shADRB2, pour déterminer si la drogue agit en « on » ou « off target » dans cette lignée.

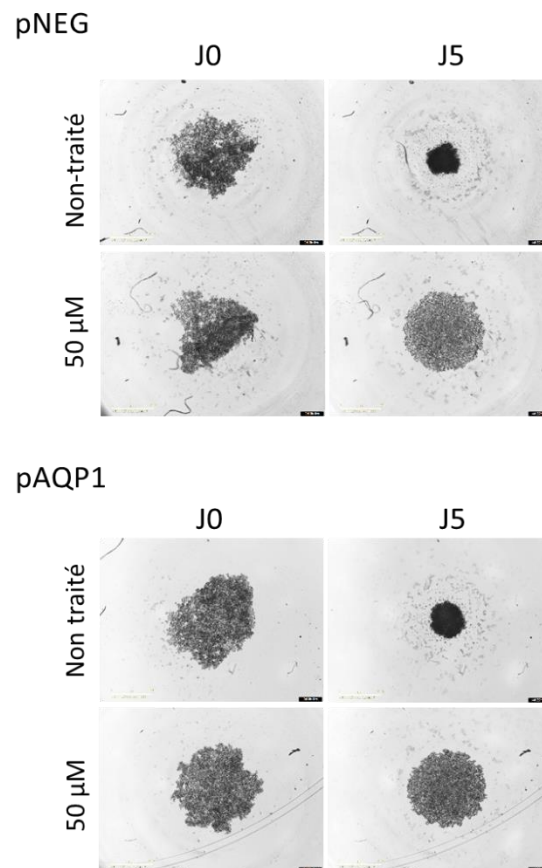


Figure 51 : Effet du propranolol sur la formation de sphéroïdes par les cellules ISO-HAS surexprimant AQP1. Les sphéroïdes ont été générées par l'ensemencement de 1×10^4 cellules en suspension dans des plaques 96 puits à fond rond en présence de 0,5% de méthylcellulose (ratio 1 :1) \pm propranolol. Images représentatives de la morphologie du même sphéroïde des cellules ISO-HAS pNEG et pAQP1 formé à J0 et J5 après agrégation et compaction de la suspension cellulaire. Echelle : 800 μ m.

Étude du ciblage de la voie bêta-adrénergique par le propranolol dans le traitement des tumeurs vasculaires cutanées

Le propranolol est actuellement le traitement de première intention des hémangiomes infantiles (HI), tumeurs vasculaires cutanées bénignes touchant 5 à 10% des nouveau-nés. La découverte de l'efficacité du propranolol dans le traitement des HI par notre équipe a ouvert une nouvelle voie thérapeutique pour les tumeurs vasculaires, en particulier les angiosarcomes, qui sont des tumeurs malignes très rares et de mauvais pronostic. Cependant, les mécanismes d'action ainsi que les cibles moléculaires et cellulaires du bêtabloquant sont à ce jour loin d'être complètement élucidés. Le repositionnement du propranolol comme traitement anti-tumoral nécessite d'une part une meilleure compréhension de ses mécanismes d'action et d'autre part l'identification de marqueurs prédictifs de réponse. Le propranolol agit en se fixant sur les récepteurs bêta-adrénergiques, empêchant l'activation de la voie bêta-adrénergique par les agonistes naturels que sont les catécholamines. Il n'existe actuellement pas de modèles satisfaisant d'HI ni d'angiosarcome pour l'étude de l'efficacité du propranolol, d'où la nécessité de mettre au point de nouveaux modèles d'étude. Ce travail de recherche s'inscrit dans cet axe. Outre la compréhension des effets anti-tumoraux du propranolol, ces modèles doivent permettre l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques. Dans un premier temps, un modèle *in vivo* de glioblastome nous a permis d'identifier la protéine aquaporine 1 (AQP1) comme cible du propranolol. L'étude de l'expression et de la localisation d'AQP1 dans l'HI a révélé un profil histopathologique unique de la protéine, fortement exprimée au niveau périvasculaire, précisément par les télocytes, identifiés par microscopie électronique. Dans un deuxième temps, nous avons développé un modèle *in vitro* d'HI répondant à de faibles doses de propranolol et avons testé l'effet de la drogue sur un paramètre clé du développement des HI, l'angiogenèse. Nous avons évalué l'importance fonctionnelle des télocytes et testé AQP1 comme cible dans ce modèle. Les résultats ont mis en évidence le rôle clé des télocytes et d'AQP1 dans la réponse anti-tumorale au propranolol dans l'HI. Ce modèle a également permis l'étude de l'impact de la noradrénaline et a révélé un rôle important de cette catécholamine dans la tubulogénèse de l'HI et dans sa réponse au propranolol. Nous avons également montré une quantité élevée de noradrénaline et des enzymes de synthèse des catécholamines dans les HI. Enfin, nous avons testé les effets du propranolol sur la migration, l'interaction cellule-cellule ainsi que sur la formation de sphéroïdes de lignées humaines d'angiosarcome. Grâce à l'établissement de ces modèles d'étude 2D et 3D, nous avons mis en évidence un effet inhibiteur du bêtabloquant à faible dose sur la migration et l'invasion des cellules tumorales d'angiosarcome et nous avons pu investiguer le rôle du récepteur bêta-2 adrénergique et d'AQP1 dans cet effet. L'ensemble de ces résultats permettent de mieux comprendre l'activité anti-tumorale du propranolol et de mieux appréhender d'éventuels nouveaux essais précliniques et cliniques.

Mots clés : Propranolol, Angiogenèse, Aquaporine 1, Catécholamines, Dermatologie

Targeting of the beta-adrenergic pathway with propranolol in cutaneous vascular tumors

Propranolol is currently the first-line treatment for severe infantile hemangioma (IH), which is the most frequent tumor of infancy, affecting 5-10% of newborns. Neither the molecular mechanism of action of propranolol nor the cellular and molecular targets of the drug has been identified with a strong proof of concept. Propranolol is a non-selective beta-adrenergic receptors inhibitor that antagonizes the effect of catecholamines, and thus, prevents the activation of beta-adrenergic pathway. The serendipitous discovery of the propranolol efficiency in IH treatment by our team has opened up a new therapeutic strategy for the treatment of other vascular tumors, in particular angiosarcomas, which are rare malignant tumors with a poor prognosis. The repositioning of propranolol requires a better understanding of the antitumor mechanism of action of this betablocker as well as the identification of new predictive markers of response. There are currently no satisfactory models of IH or angiosarcoma for studying the efficacy of propranolol. Therefore, there is a need to develop new models for a better understanding of the antitumor effects of propranolol to, ultimately, identify new therapeutic targets. First, we showed that propranolol antitumor activity was associated with alteration of Aquaporin 1 (AQP1), a water and ion channel involved in tumor cell migration, invasion and angiogenesis. Immunofluorescence staining revealed a unique histological profile of AQP1 in IH, which is highly expressed in the perivascular space by stromal cells named telocytes that we recently identified in IH. We developed an IH *in vitro* model using lesional patient-derived cells to investigate the role of telocytes in the antiangiogenic effect of propranolol in IH, the impact of noradrenaline and to test AQP1 as a target of the beta blockade response. This 3D model showed an involvement of noradrenaline in IH tubulogenic properties and revealed a critical role of AQP1 and telocytes in the antitumor response of propranolol. Moreover, we showed high levels of noradrenaline and catecholamines synthesis enzymes in IH. Finally, we studied the effects of propranolol in 2D and 3D *in vitro* models using human angiosarcoma cell lines and showed an inhibitory effect of low doses of this betablocker on the migration, cell-cell interactions and invasion of the human angiosarcoma tumor cell lines. Then we investigated the role of the beta-2 adrenergic receptor and AQP1 in this effect.

All together, these results provide a better understanding of the antitumor activity of propranolol and a pave the way for new preclinical and clinical trials.

Keywords: Propranolol, Angiogenesis, Aquaporin 1, Catecholamines, Dermatology

INSERM U1035, Biothérapie des Maladies Génétiques, Inflammatoires et Cancers, Université de Bordeaux.