

Université Bordeaux Segalen

Année 2012

Thèse n° 1935

# THESE

Pour le

## DOCTORAT DE L'UNIVERSITE BORDEAUX II

Mention : Sciences, Technologie, Santé

Option : Biologie Cellulaire et Physiopathologie

Présentée et soutenue publiquement

Le 9 octobre 2012

Par **Qinyu YAO**

Née le 28 octobre 1984 à Xi'an, Chine

ROLE DE LA PROTEINE SONIC HEDGEHOG DANS LA MIGRATION  
DES CELLULES MUSCULAIRES LISSES ET LE RECRUTEMENT DES  
CELLULES MURALES SUR LES NEOVAISSEAUX :  
IMPLICATION DANS L'ACTION DE PDGF BB

### Membres du Jury

M. Jean-Pierre SAVINEAU	Professeur	Président
M. Martial RUAT	Directeur de Recherche	Rapporteur
M. Jean-Jacques FEIGE	Directeur de Recherche	Rapporteur
Mme. Muriel LAFFARGUE	Chargé de Recherche	Membre
M. Martin HAGEDORN	Maitre de Conférences	Membre
M. Alain-Pierre GADEAU	Chargé de Recherche	Directeur de thèse



## REMERCIEMENTS

---

### *Aux membres du jury*

*Monsieur FEIGE et Monsieur RUAT,*

*Je vous remercie d'avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse et pour votre participation au jury. Merci pour la lecture de ce manuscrit.*

*Monsieur SAVINEAU,*

*Je vous remercie de m'accompagner pendant mes études universitaires. Merci pour votre aide sur les moments difficiles de mon master un et d'avoir accepté de participer à mon jury.*

*Madame LAFFARGUE et Monsieur HAGEDORN,*

*Merci pour vos participations dans cette thèse et particulièrement merci pour vos questions et discussions intéressantes et très utiles aux congrès ou aux séminaires.*

### *A mes directeurs de thèse*

*Monsieur DESGRANGES et Monsieur GADEAU,*

*Un grand merci de m'avoir accueillie dans votre équipe. Merci d'avoir dirigé mon travail et avoir guidé mes réflexions scientifiques. Merci d'avoir été là tout au long de ces années. Un grand remerciement d'avoir été si patients quand nous ne nous comprenions pas. Merci d'avoir corrigé toujours mot par mot, mes rapports, mes présentations et en particulier cette thèse. Je sais que ce n'était pas du tout facile. Merci Alain pour vos idées qui faisaient toujours avancer ce travail. Encore un grand merci à Claude pour votre gentillesse et d'avoir consacré votre temps personnel à cette thèse. Encore pleins de mercis que je ne sais pas comment dire.*

### *Aux filles DESGADEAU*

*Merci Marie-Ange pour les discussions scientifiques quotidiennes à chaque fois que j'en ai eu besoin. Merci pour ton écoute de tous mes soucis (papiers administratifs, etc). Merci de m'avoir accompagnée quand j'avais envie de parler en comptant les milliards de cellules (Même si ça t'arrange aussi !). Merci à nos pharmaciens (attention, pas pharmaciennes) qui vont bientôt devenir thésardes sénières ou intermédiaires, pour votre soutien sans faille et solidarité qui amènent la bonne ambiance. Encore merci d'avoir répondu à mes cinquante*

*milles "pourquoi" qui cassent des fois la tête. Merci Isabelle pour ton aide, surtout pour ta gentillesse. Merci de m'avoir prêtée ta clé à chaque fois. Tu seras tranquille quand je partirai ! Merci à Fanny pour ta bonne humeur et ta présence au début de cette thèse.*

#### ***Aux membres de l'Unité 1034***

*Je remercie également tous les membres de l'Unité 1034 qui m'ont aidée et soutenue.*

*Merci aux gens au fond du couloir et du plateau technique qui m'ont donnée toujours un coup de main. Merci à Béa, Annabelle et Jérôme pour vos aides sans faille. Merci à Catherine pour ta bonne humeur et petites chansons/danses au café. Merci à Nathalie de m'avoir amenée à la poterie et m'avoir aidée à créer mes œuvres "exceptionnelles". Merci aux deux petits Raj et Claire, pour votre solidarité. Merci à Fred pour ta bonne motivation scientifique. Merci également à Betty, Nancy, Myriam, Cécile.A pour vos soutiens et en particulier Christelle pour toutes les soirées et repas que tu as organisés. Merci à Jean-Marie pour votre aide; Merci à Cécile.D, Pascale et Thierry pour m'avoir donné des bons conseils pendant ces années.*

#### ***A mes parents, grand-parents et TT***

*Merci de m'avoir soutenue même si vous n'avez pas toujours compris ce que je faisais, même si vous ne comprenez pas non plus ce que j'écris pour l'instant. Merci d'être toujours là pour moi et comme je vous le dis, c'est une bonne et belle expérience de faire une thèse si loin.*

# TABLE DE MATIERE

<b><u>TABLE DE MATIERE</u></b> .....	1
<b><u>ABREVIATIONS</u></b> .....	11
<b><u>INTRODUCTION</u></b> .....	16
<b>Chapitre I:</b> Système vasculaire et maturation des vaisseaux.....	17
I. Structure des vaisseaux .....	17
II. Formation et croissance des vaisseaux.....	19
<b>Chapitre II :</b> Facteurs impliqués dans la maturation des vaisseaux .....	27
I. Facteurs à action indirecte sur les cellules endothéliales .....	27
II. Facteurs à effet direct sur les cellules murales.....	30
<b>Chapitre III :</b> Protéines Hedgehog : signalisation et rôle dans la formation des vaisseaux .....	39
I. Généralité sur les protéines Hedgehog.....	39
II. Voie de signalisation des protéines Hedgehog et fonctions cellulaires.....	41
III. Protéines Hedgehog et développement embryonnaire .....	53
IV. Protéines Hedgehog et développement vasculaire .....	57
V. Protéines Hedgehog et la vascularisation chez l'adulte .....	61
VI. Protéines Hedgehog et maturation-stabilisation des vaisseaux .....	65
<b>Chapitre IV :</b> Migration des cellules musculaires vasculaires.....	71
I. Migration cellulaire.....	71
II. Inducteurs de la migration des cellules musculaires lisses vasculaires.....	73
III. Acteurs directs de la migration des cellules musculaires lisses .....	74
IV. Voies de transduction impliquées dans la migration des cellules musculaires lisses.....	76
V. Migration cellulaire <i>in vitro</i> et recrutement cellulaire <i>in vivo</i> .....	79
<b><u>OBJECTIFS DE L'ETUDE</u></b> .....	81
<b><u>MATERIELS ET METHODES</u></b> .....	85
<b>Chapitre I:</b> <i>in vitro</i> .....	87
I. Culture cellulaire.....	87
II. Traitement des cellules.....	89
III. Tests de migration des CML .....	90
IV. Quantification des ARNm par RT-PCR quantitative .....	90
V. Détection des protéines .....	92
<b>Chapitre II:</b> <i>in vivo</i> .....	97
I. Les animaux .....	97
II. Modèle d'angiogenèse de la cornée .....	97
III. Statistiques .....	97
<b><u>RESULTATS</u></b> .....	101
<b>Partie I: Hh et migration des cellules musculaires lisses vasculaires <i>in vitro</i></b> .....	103
<b>Chapitre I:</b> mise en évidence du rôle de la voie Hedgehog dans l'effet chimiotactique exercé par les cellules endothéliales sur les cellules musculaires lisses.....	105

I. Mise en évidence de la sécrétion de facteurs chimiotactiques par les cellules endothéliales .....	105
II. Rôle de la voie Hh dans l'effet chimiotactique des milieux conditionnés par les cellules endothéliales .....	107
III. Hypothèse de travail : Hh dans la migration des cellules musculaires lisses induite par les cellules endothéliales .....	108
<b>Chapitre II</b> : Rôle des protéines Hedgehog endothéliales dans la migration des cellules musculaires lisses .....	111
I. Expression des ARNm des Hedgehog par les cellules endothéliales .....	111
II. Activation de la voie Hedgehog par les milieux conditionnés par les HUVEC .....	113
III. Effet de l'épuisement en protéines Hh dans des milieux conditionnés des HUVEC sur leur activité chimiotactique pour les cellules musculaires lisses .....	113
IV. Conclusion .....	114
<b>Chapitre III</b> : effet direct des protéines Hedgehog sur les cellules musculaires lisses .....	115
I. Expression des éléments de la voie Hedgehog dans les cellules musculaires lisses ...	115
II. Effet des protéines Hh recombinantes sur les voies de signalisation intracellulaires ..	115
III. Hh recombinant et chimiotactisme des cellules musculaires lisses .....	118
<b>Chapitre IV</b> : Production des protéines Hh par les CML et leurs rôles dans la migration des cellules musculaires lisses .....	121
I. Activation de l'expression des Hedgehog et de leur signalisation dans les cellules musculaires lisses par les milieux conditionnés des cellules endothéliales .....	121
II. Caractérisation des facteurs sécrétés par les HUVEC dans les milieux conditionnés..	129
III. Identification des facteurs stimulant l'expression de Shh .....	129
<b>Chapitre V</b> : Mécanismes d'action de Shh autocrine dans la migration des cellules musculaires lisses induite par PDGF BB .....	142
I. Modulation des voies de transduction du signal .....	143
II. Activation de la voie Gli1 et conséquences .....	149
<b>Partie II: Hh, maturation et stabilisation des néovaisseaux <i>in vivo</i></b> .....	159
I. Modèle d'angiogenèse de la cornée chez la souris .....	161
II. Rôle de la voie Hedgehog dans l'angiogenèse de la cornée induite par le VEGF .....	163
III. Rôle de la voie Hedgehog dans la stabilisation des vaisseaux .....	177
IV. Conclusion .....	179
<b><u>CONCLUSION GENERALE ET DISCUSSION</u></b> .....	181
<b>Chapitre I</b> : Shh dans la migration des cellules murales .....	185
I. Implication de la voie de signalisation Hedgehog dans l'effet chimiotactique des cellules endothéliales pour les cellules musculaires lisses .....	185
II. Les protéines Hedgehog recombinantes activent les voies Hedgehog mais ne sont pas chimiotactiques pour les cellules musculaires lisses .....	185
III. Participation du Shh autocrine à la migration des cellules musculaires lisses induites par les facteurs endothéliaux, en particulier le PDGF BB .....	187
IV. Mécanisme du Shh autocrine dans la migration des cellules musculaires lisses induite par le PDGF BB .....	188
V. Conclusion .....	191
<b>Chapitre II</b> : Shh dans la musculation et la stabilisation des vaisseaux .....	192

I. Expression de Shh durant la néovascularisation .....	192
II. Rôle de Shh dans la maturation des néovaisseaux .....	192
III. Shh est impliqué dans la stabilisation des vaisseaux.....	195

<b><u>BIBLIOGRAPHIE</u></b> .....	197
-----------------------------------	-----



# **ABBREVIATIONS**

<b>ALK :</b>	Activin receptor-Like Kinase
<b>ADN :</b>	Acide DésoxyriboNucléique
<b>Akt/PKB :</b>	Protein kinase B
<b>AMPc :</b>	Adénosine monophosphate cyclique
<b>Ang1 :</b>	Angiopoïétine 1
<b><math>\alpha</math>-SMA :</b>	$\alpha$ -Smooth Muscle Actin
<b>ARN :</b>	Acide ribonucléique
<b>BDNF :</b>	Brain-Derived Neurotrophic Factor
<b>BMP :</b>	Bone Morphogenic Protein
<b>BOC :</b>	Brother Of Cdon
<b>BrdU :</b>	Bromodésoxyuridine
<b>BSA :</b>	Bovine Serum Albumin
<b>CADASIL :</b>	artériopathie cérébrale autosomique dominante
<b>CCN (CTGF) :</b>	Connective Tissue Growth Factor
<b>Cdon :</b>	Cell adhesion molecule-related/Down-regulated by oncogenes
<b>CE :</b>	Cellules Endothéliales
<b>Ci<sup>55</sup> :</b>	Cubitus interruptus
<b>Ci<sup>Act</sup> :</b>	forme activatrice de Ci
<b>Ci<sup>Rep</sup> :</b>	forme répressive de Ci
<b>CK1 :</b>	Casein Kinase 1
<b>CML :</b>	Cellules Musculaires Lisses
<b>Cos2 :</b>	Costal2
<b>Dll :</b>	Delta like ligand
<b>Dhh :</b>	Desert hedgehog
<b>ECGM :</b>	Endothelial Cell Growth Medium
<b>Edg :</b>	Endothelial differentiation gene
<b>EGF</b>	Epidermal Growth Factors
<b>EGR2 :</b>	Early Growth Response Protein 2
<b>EPC :</b>	Endothelial Progenitor Cells

<b>ERK1/2 :</b>	Extracellular signal-Regulated Kinase1/2
<b>FAK :</b>	Focal Adhesion Kinase
<b>FGF :</b>	Fibroblast Growth Factor
<b>Foxf1 :</b>	Forkhead transcription factor 1
<b>Fu :</b>	Kinase Fused
<b>GANT :</b>	Gli antagonist
<b>Gas2 :</b>	Growth arrest specific2
<b>Gli :</b>	Glioma-associated oncogene homolog
<b>Gli<sup>A</sup> :</b>	forme activatrice de Gli
<b>Gli<sup>Rep</sup> :</b>	forme répressive de Gli
<b>GPC :</b>	Glypican
<b>GRK :</b>	G-protein coupled Receptror Kinase
<b>GSK3<math>\beta</math> :</b>	Glycogen Synthase Kinase 3 $\beta$
<b>HB-EGF :</b>	Heparin-Binding EGF-like growth factor
<b>HGF :</b>	Hepatocyte Growth Factor
<b>Hh :</b>	Hedgehog
<b>HIF-1<math>\alpha</math> :</b>	Hypoxia-Inducible Factor-1 $\alpha$
<b>HIP :</b>	Hedgehog interacting protein
<b>HUVEC :</b>	Human Umbilical Vein Endothelial Cells
<b>IFT :</b>	Intraflagellar Transport
<b>IGF-1 :</b>	Insulin Growth Factor-1
<b>Ihh :</b>	Indian hedgehog
<b>IL :</b>	Interleukine
<b>ILK :</b>	Integrin-Linked Kinase
<b>iNOS :</b>	Inducible Nitric Oxide Synthase
<b>MAPK :</b>	Mitogen Activated Protein Kinase
<b>MBE :</b>	Membrane Basale Extracellulaire
<b>MC :</b>	Milieu Conditionné
<b>MCP-1 :</b>	Monocyte Chemotactic Protein-1

<b>MEC :</b>	Matrice extracellulaire
<b>MLCP :</b>	phosphate de la chaîne légère de myosine
<b>MMP :</b>	Matrix Metalloproteinase
<b>MSC :</b>	cellules souches mésenchymateuses
<b>N-Hh :</b>	Partie N-terminale de Hedgehog
<b>NG2 :</b>	Neuron-gial antigen 2
<b>NO :</b>	Monoxyde d'azote
<b>OPN :</b>	ostéopontine
<b>PAI-1 :</b>	Plasminogen Activator Inhibitor 1
<b>PBS :</b>	Phosphate Buffered Saline
<b>PDGF BB :</b>	Platelet-Derived Growth Factor BB
<b>PDGFR :</b>	récepteur du PDGF
<b>PI3K :</b>	Phosphoinositide 3-Kinase
<b>PIP3 :</b>	Phosphatidylinositol 1,4,5-triphosphate
<b>PKA :</b>	Protein Kinase A
<b>PKC :</b>	Protein kinase C
<b>PIGF :</b>	Placenta Growth Factor
<b>PFA :</b>	Paraformaldéhyde
<b>Ptch-1 :</b>	Patched-1
<b>RAB23 :</b>	Ras-related protein 23
<b>Raldh2 :</b>	Retinal aldehyde dehydrogenase
<b>RCPG :</b>	récepteur à 7 domaines transmembrannaires couplé aux protéines G
<b>RGS5 :</b>	Regulator of G-protein Signaling type 5
<b>RTK :</b>	Récepteur à activité tyrosine kinase
<b>RT-PCR :</b>	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
<b>S1P :</b>	Sphingosine-1-phosphate
<b>SANT :</b>	Smo antagonist
<b>SCF :</b>	Stem Cell Factor
<b>SDF1-<math>\alpha</math> :</b>	Stromal-Derived Factor 1- $\alpha$

<b>SDS :</b>	Sodium Dodécyl Sulfate
<b>SH2 :</b>	Src Homology domain 2
<b>Shh :</b>	Sonic hedgehog
<b>siRNA :</b>	short interfering RNA
<b>Smo :</b>	Smoothened
<b>SRF :</b>	Serum Response Factor
<b>SRP :</b>	Signal Recognition Particle
<b>SVF :</b>	Sérum de Veau Foetal
<b>TBS :</b>	Tris Buffer Saline
<b>TIMP-3 :</b>	Tissue inhibitor of metalloproteinase-3
<b>TGF-<math>\beta</math> :</b>	Transforming Growth Factor- $\beta$
<b>TNC :</b>	Ténascine C
<b>VEGF :</b>	Vascular Endothelial Growth Factor
<b>VEGFR-1/Flt-1 :</b>	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1
<b>WASP :</b>	Wiskott-Aldrich Syndrome Protein

# INTRODUCTION

Mon travail a porté sur le rôle des protéines Hedgehog sur la migration des cellules musculaires lisses vasculaires et la maturation des néovaisseaux.

Dans cette partie introductive, j'ai regroupé quelques éléments bibliographiques qui m'ont été utiles pour aborder et interpréter ce travail. Ils portent sur :

- le système vasculaire et la maturation des vaisseaux sanguins;
- les facteurs impliqués dans la maturation des vaisseaux sanguins;
- les protéines Hedgehogs, leur signalisation et leur rôle dans la formation des vaisseaux;
- la migration des cellules musculaires lisses vasculaires.

# CHAPITRE I : SYSTEME VASCULAIRE ET MATURATION DES VAISSEAUX

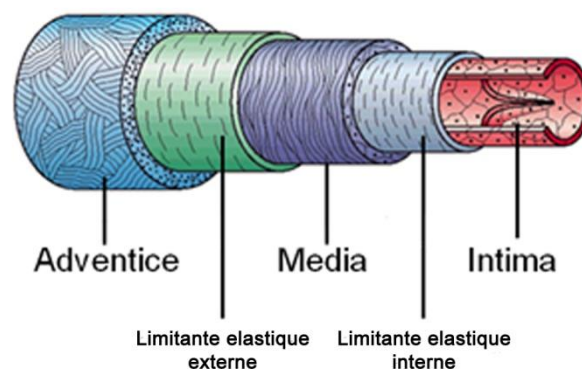
---

## I. STRUCTURE DES VAISSEAUX

Le système vasculaire permet d'une part de distribuer dans les tissus, le sang qui transporte les molécules nécessaires aux cellules, et d'autre part d'éliminer les déchets métaboliques. On peut distinguer dans le système vasculaire le réseau artériel et le réseau veineux. Dans chaque catégorie on trouve des vaisseaux de gros calibre (artères, veines), de calibre moyen (artérioles, veinules) et de petit calibre (capillaires).

### 1. Les vaisseaux de gros calibre

Les gros troncs vasculaires sont constitués de trois tuniques morphologiquement distinctes, de l'intérieur vers l'extérieur du vaisseau : l'intima, la média et l'adventice (**Fig. 1**). L'importance et la complexité de ces trois tuniques dépendent du type de vaisseau sanguin.



**Figure 1 : Structure du vaisseau : vaisseau élastique**

#### A. Intima

L'intima est principalement constituée de l'intérieur vers l'extérieur, d'une monocouche de cellules endothéliales (CE) reposant sur une fine couche de tissu conjonctif. Les CE sont directement en contact avec le sang. Dans certains cas, l'intima des grosses artères dites élastiques peut contenir des cellules musculaires lisses (CML) particulières dites myointimales. Quel que soit le diamètre de la paroi, il n'y a toujours qu'une seule couche de CE. Ces CE sont en forme de losange et leur juxtaposition constitue une mosaïque. Leur grand axe est allongé dans le sens de l'écoulement sanguin, cette orientation déterminée par les forces de cisaillement appliquées à leur surface. L'endothélium établit une barrière semi-

sélective entre la lumière des vaisseaux et les tissus environnants, contrôlant le passage des grosses molécules et le transit des globules blancs. L'augmentation de la perméabilité de la monocouche endothéliale conduit à un œdème tissulaire.

## **B. Média**

La média forme une couche d'aspect compact et d'épaisseur régulière. Elle comprend des cellules murales de type CML disposées concentriquement entre des lames élastiques, des fibres de collagène et des protéoglycanes, en proportion variable selon le type d'artère.

*Les artères élastiques* possèdent beaucoup de fibres d'élastine et de collagène dans la média. Il y a aussi une lame de tissu conjonctif entre la média et l'intima (la limitante élastique interne) et entre la média et l'adventice (la limitante élastique externe). Le contenu en élastine contribue à l'élasticité de la paroi permettant la variation du diamètre du vaisseau selon la pression. Le collagène a pour rôle de s'opposer à une trop forte variation du diamètre, et contrôle la rigidité du vaisseau et va permettre de réduire l'extensibilité de la paroi. Grâce aux CML et à leur contenu en tissu conjonctif, les artères peuvent s'adapter aux variations de pression sanguine.

*La paroi des artères musculaires* se différencie de celle des artères élastiques par le fait qu'elle est composée de plusieurs couches de CML et de très peu de fibres élastiques. En raison de la grande quantité de CML dans leur paroi, ces artères sont plus contractiles c'est-à-dire capables de faire varier le diamètre de leur lumière en se contractant (vasoconstriction) ou en se relâchant (vasodilatation).

*Les artères musculo-élastiques* contiennent à la fois des fibres musculaires capables de se contracter, et de l'élastine. La tension exercée sur les parois vasculaires est la résultante de la composante musculaire et de la composante élastique.

## **C. Adventice**

L'adventice est une couche essentiellement conjonctive (tissu conjonctif lâche). Elle contient des fibres de collagène, quelques fibres élastiques et des fibroblastes. Elle sert de support aux vaisseaux sanguins nourriciers (vasa vasorum) et lymphatiques, et aux nerfs artériels. L'adventice est plus ou moins importante selon le type de vaisseau, mais son organisation est à peu près la même quel que soit le type de vaisseau. Cependant, dans les veines, la média et l'adventice sont souvent difficiles à distinguer.



## 2. Les artérioles et les veinules

Les artérioles sont les vaisseaux de moyen calibre (diamètre inférieur à 0,5 mm) amenant le sang dans les capillaires. Ils font suite aux artères de gros calibre. Leur paroi est innervée par le système nerveux sympathique et peut ainsi se contracter, entraînant à la fois une réduction du flux sanguin tissulaire et une augmentation de la résistance à l'écoulement sanguin. Les veinules sont les vaisseaux ramenant le sang des capillaires vers le cœur. Ils prennent naissance après le versant veineux capillaire et dirigent le sang désoxygéné et chargé de déchets vers l'oreillette droite du cœur puis les poumons. Les artérioles possèdent une couverture plus importante de cellules murales (CML ou péricytes) que les veinules (**Fig. 2**).

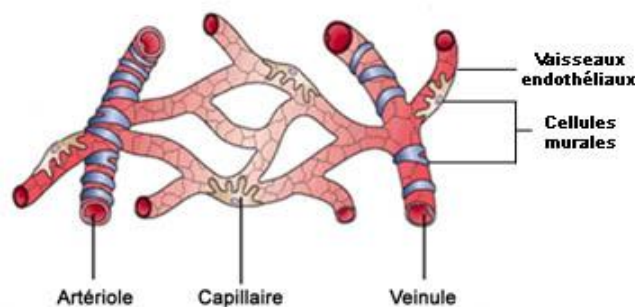


Figure 2 : Représentation schématique des vaisseaux de petit et moyen calibre

## 3. Les capillaires

Les capillaires sont connectés aux artérioles et aux veinules, et interagissent intimement avec les tissus. Ce sont eux qui amènent le sang au niveau des cellules et permettent leur oxygénation, nutrition et collecte des déchets. Ce sont les plus petits vaisseaux sanguins de l'organisme. Leur paroi est souple et fragile, composée d'une monocouche de CE et d'une couche clairsemée de péricytes, entourée d'une simple et fine membrane basale structurée par quelques fines fibres de collagène (**Fig. 2**).

## II. FORMATION ET CROISSANCE DES VAISSEAUX

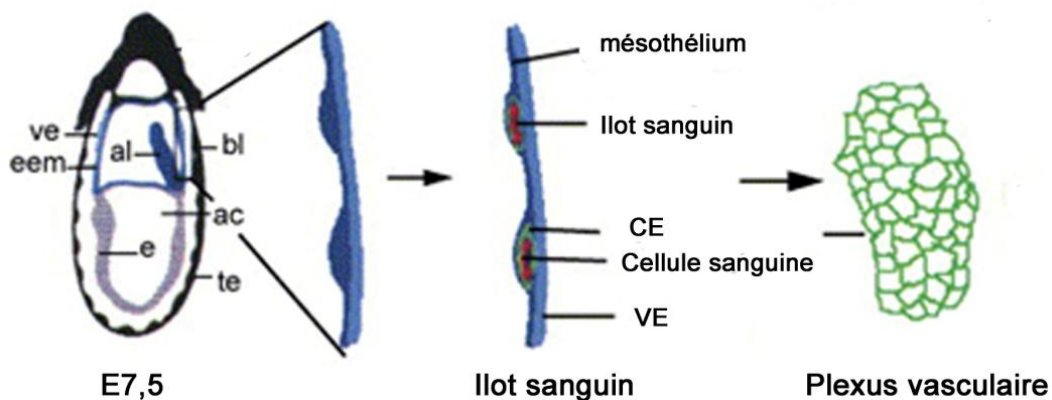
Chez les vertébrés, le système circulatoire est le premier système fonctionnel qui se développe. La morphogenèse vasculaire peut être schématiquement résumée en 3 processus majeurs : vasculogenèse, angiogenèse et maturation des vaisseaux. Ces processus sont régulés par nombre de voies de signalisation. Certaines sont limitées au système vasculaire. D'autres sont moins spécifiques et partagées avec la formation d'autres systèmes durant la morphogenèse embryonnaire, telles que l'ostéogenèse et la neurogenèse. Grâce à ces trois

mécanismes, le système circulatoire est formé et remodelé en un système vasculaire fonctionnel très complexe. Il régule nombre de processus physiologiques tels que l'oxygénation tissulaire, le transport de nutriments, l'élimination de déchets, la réponse immunitaire, la régulation de la température et le maintien de la pression sanguine.

## 1. Vasculogénèse

La vasculogénèse consiste en la formation d'un plexus vasculaire primitif, peu organisé, à partir de précurseurs endothéliaux appelés angioblastes (Byrd and Grabel, 2004).

Chez la souris, le sac vitellin est le premier site de formation des vaisseaux sanguins de l'embryon. Il est composé de deux couches de cellules extra-embryonnaires endodermiques viscérales et mésodermiques ou mésothéliales. Les îlots sanguins se forment 7,5 jours après la conception à partir de la masse mésodermique située à l'intérieur de l'endoderme viscéral. Cette masse contient des hémangioblastes qui sont des précurseurs communs des CE et des érythrocytes. Les précurseurs des CE créent une poche intérieure contenant des érythrocytes primitifs, puis forment un premier réseau vasculaire en tubes d'un diamètre uniforme appelé plexus vasculaire primaire. Ce plexus est ensuite remodelé afin de former les vaisseaux vitellins (**Fig. 3**).



**Figure 3 : Représentation schématique de la vasculogénèse chez les embryons murins :**  
 ac : cavité amniotique ; al : allantoïde ; bi : îlots sanguins ; e : épiblaste ; eem : mésoderme extraembryonnaire ; te : trophoctoderme ; ve : endoderme viscéral (d'après (Byrd and Grabel, 2004))

## 2. Angiogenèse

L'angiogenèse est le processus de croissance de nouveaux vaisseaux sanguins (néovascularisation) à partir des vaisseaux préexistants (Geudens and Gerhardt, 2011).

L'angiogenèse non pathologique chez l'adulte est un évènement rare. Elle est observée dans les cas de la grossesse, du cycle menstruel et à la suite de la cicatrisation ou d'exercices physiques prolongés et intensifs. Elle se produit aussi à la suite d'un épisode ischémique tissulaire. L'angiogenèse pathologique accompagne des processus pathologiques, tels que le développement de tumeurs et l'inflammation chronique. Dans ce cas, les vaisseaux formés demeurent instables et partiellement fonctionnels.

### **A. Bourgeonnement vasculaire**

Le bourgeonnement vasculaire est une étape cruciale dans l'initiation de l'angiogenèse. Il est guidé par des CE spécialisées que l'on appelle les "tip cells", qui répondent aux stimulations angiogéniques et aux facteurs de guidance. Ces CE forment des filopodes très longs qui détectent des signaux attractifs ou répulsifs. Elles jouent donc un rôle dans la guidance des vaisseaux sanguins néo-formés vers des directions précises. Elles sont connectées aux "stalk cells", un autre type de CE spécialisées qui contribuent à la formation des tubes endothéliaux.

### **B. Elongation des vaisseaux endothéliaux**

Les "tip cells" prolifèrent rarement. Au contraire, les "stalk cells" prolifèrent très fortement et par conséquent participent à l'élongation du bourgeon endothélial en croissance dont la direction est définie par les "tip cells" en fonction de l'environnement.

### **C. Formation de la lumière vasculaire**

Le deuxième rôle important des "stalk cells" dans un vaisseau en formation est d'établir une lumière vasculaire. Les "stalk cells" conservent leur polarité apico-basale et permettent la constitution d'une lumière vasculaire continue.

## **3. Maturation des vaisseaux**

Durant les évènements précoces de la morphogenèse vasculaire, le réseau vasculaire est très dynamique. Avec l'augmentation des forces de cisaillement et de la pression sanguine, les vaisseaux doivent acquérir une structure plus stable et un calibre réglable (Iruela-Arispe and Davis, 2009; Wagenseil and Mecham, 2009). De la même façon les nouveaux vaisseaux formés chez l'adulte par angiogenèse dans les conditions physiologiques, doivent eux aussi être maturés pour devenir fonctionnels.

Les néo-vaisseaux qui se développent au cours des processus pathologiques, tels que les tumeurs et l'inflammation chronique, restent instables et non fonctionnels. Ainsi, les vaisseaux tumoraux sont fonctionnels dans le sens où ils transportent du sang et sont capables de supporter la croissance de la tumeur, mais ils possèdent un série d'anomalies qui les rendent fragiles, perméables et peu efficaces, provoquant des hémorragies et des oedèmes (Carmeliet and Jain, 2000; Dvorak, 2002). Le flux sanguin est limité par un défaut de hiérarchisation anatomique. La désorganisation du système vasculaire conduit à l'ischémie et à la nécrose des tissus normaux. La maturation des vaisseaux est complexe et on peut distinguer plusieurs étapes qui ne sont pas exclusives et pas temporellement liées. Elle débute en même temps que la formation des vaisseaux.

## **A. Différentes étapes de la maturation des vaisseaux**

### ***a. Remodelage vasculaire***

Un remodelage vasculaire intervient avec l'établissement de nouvelles connections dans le réseau vasculaire. Certaines branches sont stabilisées tandis que d'autres régressent. Le facteur important dans la régulation du remodelage vasculaire est l'oxygène. Il a été montré qu'un niveau élevé d'oxygène entraîne une réduction de la complexité du réseau vasculaire tandis qu'un niveau faible d'oxygène maintient la densité de ce réseau vasculaire. Par conséquent ceci permet que la densité vasculaire soit adaptée correctement à l'oxygénation tissulaire (Claxton and Fruttiger, 2005).

Un autre paramètre important est la force de cisaillement qui régule le diamètre des vaisseaux. Une augmentation de la force de cisaillement entraîne une distensibilité vasculaire par une action sur les CE qui régulent la vasoconstriction/vasodilatation du vaisseau.

### ***b. Recrutement des cellules murales***

Le recrutement des cellules murales, CML pour les gros vaisseaux et péricytes pour les capillaires, les veinules postcapillaires et les artérioles terminales, permet la muscularisation des vaisseaux (myogenèse vasculaire). L'identification ou la discrimination des CML et des péricytes est complexe. Plusieurs marqueurs sont utilisés:  $\alpha$ -Smooth Muscle actin ( $\alpha$ -SMA), desmine, "Neuron-gial antigen 2" (NG2), "Platelet-Driven Growth Factor Receptor  $\beta$ " (PDGFR $\beta$ ), aminopeptidase A et "Regulator of G-protein Signaling 5" (RGS5) (**Tab. 1**). Il faut noter qu'aucun marqueur n'est absolument spécifique d'un seul de ces types

cellulaires et que leurs expressions sont aussi dynamiques et varient entre les organes et les stades du développement vasculaire.

Table 1. Murine Pericyte Markers				
Pericyte Marker	Gene Symbol	Examples of Other Cell Types Expressing the Marker	Comments	References
<b>Validated Markers</b>				
PDGFR- $\beta$ (platelet-derived growth factor receptor-beta)	Pdgfrb	Interstitial mesenchymal cells during development; smooth muscle; in the CNS certain neurons and neuronal progenitors; myofibroblasts; mesenchymal stem cells	Receptor tyrosine kinase; functionally involved in pericyte recruitment during angiogenesis; useful marker for brain pericytes	Lindahl et al., 1997; Winkler et al., 2010
NG2 (chondroitin sulfate proteoglycan 4)	Cspg4	Developing cartilage, bone, muscle; early postnatal skin; adult skin stem cells; adipocytes; vSMCs; neuronal progenitors; oligodendrocyte progenitors	Integral membrane chondroitin sulfate proteoglycan; involved in pericyte recruitment to tumor vasculature	Ozerdem et al., 2001; Ruiter et al., 1993; Huang et al., 2010
CD13 (alanyl (membrane) aminopeptidase)	Anpep	vSMCs, inflamed and tumor endothelium; myeloid cells; epithelial cells in the kidney, gut	Type II membrane zinc-dependent metalloprotease; useful marker for brain pericytes	Demietzel and Krause, 1991; Kunz et al., 1994
$\alpha$ SMA (alpha-smooth muscle actin)	Acta2	Smooth muscle; myofibroblasts; myoepithelium	Structural protein; quiescent pericytes do not express $\alpha$ SMA (e.g., CNS); expression in pericytes is commonly upregulated in tumors and in inflammation	Nehls and Drenckhahn, 1993
Desmin	Des	Skeletal, cardiac, smooth muscle	Structural protein; useful pericyte marker outside skeletal muscle and heart	Nehls et al., 1992
<b>New Markers Requiring Additional Validation</b>				
RGS5 (regulator of G protein signaling 5)	Rgs5	Cardiomyocytes?; vSMCs	Regulate heterotrimeric G proteins by activating GTPase activity; angiogenic pericyte marker	Bondjers et al., 2003; Cho et al., 2003
SUR2 (ATP-binding cassette, subfamily C (CFTR/MRP), member 9)	Abcc9	Skeletal, cardiac, smooth muscle; renal tubular epithelium	Regulatory subunit of ATP-sensitive potassium channels	Bondjers et al., 2006
Kir6.1 (potassium inwardly rectifying channel, subfamily J, member 8)	Kcnj8	vSMCs	Associates with SUR2	Bondjers et al., 2006
Endosialin	Cd248	vSMCs, myofibroblasts; fibroblasts; T cells	Transmembrane cell surface glycoprotein; expression on pericytes is dynamic; downregulated during development	Christian et al., 2008
DLK1 (delta-like 1 homolog)	Dlk1	vSMCs; hepatoblasts in the developing liver; adipocyte progenitors	Transmembrane cell surface protein	Bondjers et al., 2006

**Tableau 1 : Marqueurs d'identification des cellules murales (d'après Armulik et al., 2011)**

*i. Cellules murales*

Le terme "cellules murales" se réfère généralement aux CML qui couvrent les gros vaisseaux et aux péricytes qui recouvrent principalement les plus petits vaisseaux. Il faut noter toutefois que la localisation de ces deux types cellulaires n'est pas absolue et qu'il n'existe aucun marqueur cellulaire spécifique de chaque type cellulaire. La distribution de ces 2 types cellulaires est aussi différente, alors que les CML entourent le tube endothélial et forment une

monocouche, les péricytes eux s'étalent à leur surface (**Fig. 4**). Généralement, les cellules murales des gros vaisseaux expriment l' $\alpha$ -SMA, le PDGFR $\beta$ , tandis qu'elles n'expriment pas l' $\alpha$ -SMA au niveau des capillaires (Fruttiger, 2002). Le marqueur NG2 est à la fois trouvé dans les gros vaisseaux et dans les capillaires (Liu et al., 2010).



**Figure 4 : Couverture des vaisseaux par des cellules murales** (d'après (Armulik et al., 2011))

### ii. Distribution des cellules murales

Dans les microvaisseaux, les cellules murales partagent la membrane basale avec les CE et établissent des contacts focaux avec les CE via des jonctions spéciales. Elles contribuent à la stabilité mécanique des microvaisseaux.

La densité des cellules murales varie entre les différents organes. Le réseau vasculaire du système nerveux central présente un rapport CE/cellules murales de 1/1 à 3/1 (Mathisen et al., 2010). Dans les autres tissus ce rapport se situe entre 1/1 et 10/1. Ce rapport définit les caractéristiques spécifiques de l'étanchéité de la barrière endothéliale de chaque organe : cerveau > poumon > muscle (Diaz-Flores et al., 2009).

### iii. Origine des cellules murales

Les cellules murales peuvent avoir des origines différentes. Elles proviennent globalement de plusieurs pools de cellules progénitrices :

- un pool de cellules qui préexiste dans les tissus environnants et est activé en réponse aux stimuli mitogènes ou promigratoires ;
- des cellules progénitrices de péricytes issues de la moëlle osseuse, qui se caractérisent par l'expression des marqueurs PDGFR $\beta$  et Sca-1. Elles enveloppent les vaisseaux sanguins et se différencient en CML (Du et al., 2008; Mancuso et al., 2011) ;
- les cellules mésenchymateuses tissulaires peuvent aussi se différencier ultérieurement et contribuer à la muscularisation, par exemple dans le système vasculaire du poumon (Hirschi et al., 2003; Zhou et al., 2009) ;
- les CE peuvent aussi se transdifférencier en cellules murales via la réactivation du facteur de transcription myocardine. Cette transdifférenciation des CE a plus

particulièrement été démontrée dans des conditions pathologiques et dans des cellules en culture. Elle pourrait être responsable de l'hypertension artérielle pulmonaire caractérisée par un épaississement de la média des vaisseaux (Frid et al., 2002 ; Krenning et al., 2008; Zhu et al., 2006 ).

iv. Rôle du recrutement des cellules murales sur le réseau vasculaire

Le défaut du recrutement de cellules murales entraîne des vaisseaux hyperperméables et modifient les propriétés de la couche endothéliale, notamment sa perméabilité et la survie des CE (Benjamin et al., 1998; Hirschi et al., 1999; Hirschi et al., 1998).

L'augmentation anormale de la perméabilité vasculaire est associée avec nombres de pathologies, incluant l'état septique, l'œdème pulmonaire et les réactions allergiques (Wang and Dudek, 2009). Les péricytes régulent les jonctions serrées des CE dans la barrière hémato-encéphalique (Cardoso et al., 2010). Cette conclusion est basée sur des études *in vitro* de co-culture des CE et de péricytes qui démontrent que les péricytes augmentent la résistance électrique transendothéliale et diminuent la perméabilité de la monocouche endothéliale (Nakagawa et al., 2009). La perte de péricytes des microvaisseaux est la première déficience cellulaire décrite dans la rétinopathie diabétique. Cependant la réduction du nombre de péricytes par l'inhibition de la signalisation de "Platelet-Derived Growth Factor BB" (PDGF BB)/PDGFR $\beta$  n'est pas suffisante pour induire seule la rétinopathie (Enge et al., 2002).

Les péricytes jouent aussi un rôle dans la spécification du vaisseau. En effet dans le syndrome lymphœdème-distichiasis (mutation du gène *Foxc2* dans les CE lymphatiques), le recrutement ectopique de cellules murales sur les vaisseaux lymphatiques reprogramme les CE lymphatiques en un phénotype endothélial sanguin, incluant la diminution de VEGFR3 (marqueur des vaisseaux lymphatiques) et l'augmentation de PDGF BB (marqueur des vaisseaux sanguins) (Petrova et al., 2004).

## **B. Matrice extracellulaire du vaisseau**

La Matrice extracellulaire (MEC) est un composant important de la stabilité des vaisseaux. La MEC de la paroi vasculaire fournit un support structural et mécanique aux cellules. Elle est composée de nombreuses molécules, telles que les collagènes, les fibres élastiques, les hyaluronates, la fibronectine, la vitronectine, la laminine, les glycosaminoglycans, les protéoglycanes et les glycoprotéines adhésives. La membrane basale extracellulaire des CE (MBE) est plus spécifiquement composée de laminine, de collagène IV,

de fibronectine et de nidogène 1 et 2 (Senger and Davis, 2011). Outre sa fonction structurale, la MEC permet l'interaction CE-cellules murales et la cohésion du vaisseau. Les cellules vasculaires et périvasculaires se lient aux composants de la MEC via des récepteurs membranaires, incluant différentes intégrines. Les interactions des récepteurs avec les molécules de la MEC influencent la forme des cellules vasculaires, leurs comportements et leurs réponses aux cytokines et facteurs de croissance (Davis and Senger, 2008).

Les péricytes en produisant la "Tissue Inhibitor of MetalloProteinase-3" (TIMP-3) participent à la stabilisation des vaisseaux comme démontré dans des modèles d'angiogenèse *in vitro* (Stratman et al., 2009).

Récemment, il a été démontré que la synthèse de cette MBE nécessite non seulement la tubulogenèse des CE, mais aussi un contact cellulaire hétérotypique, en particulier CE-pericytes (Hall-Glenn et al., 2012; Stratman et al., 2009 ). En contrepartie, une autre étude démontre qu'un défaut de la formation de MBE via l'inactivation de CCN2, un gène codant pour une protéine matricielle exprimée dans les CE, provoque un recrutement des péricytes réduit sur des capillaires dermiques (Hall-Glenn et al., 2012).



## CHAPITRE II : FACTEURS IMPLIQUES DANS LA MATURATION DES VAISSEAUX

---

Suite à la formation des vaisseaux endothéliaux, le recrutement des cellules murales est une étape cruciale permettant la maturation et la survie des vaisseaux. Plusieurs facteurs indispensables à ce processus de recrutement ont été identifiés par invalidation de gènes chez la souris (angiopoïétines 1[Ang1], Sphingosine-1-Phosphate [S1P], PDGF BB, etc). Les études *in vitro* et *in vivo* ultérieures ont montré que les cellules répondant à la plupart de ces facteurs sont les CE, suggérant un effet indirect de ces facteurs sur les cellules murales. Il existe cependant quelques facteurs dont les cibles directes sont les cellules murales, comme le PDGF BB, le "Transforming Growth Factor- $\beta$ " (TGF- $\beta$ ) et Notch-3.

### I. FACTEURS A ACTION INDIRECTE SUR LES CE

Les cellules murales sont des cellules accessoires autour des vaisseaux endothéliaux, qui reçoivent des informations biologiques à partir des CE. Il a été démontré que la perte de la couverture des CE par les cellules murales peut être une conséquence de la dysfonction des CE (Jones et al., 2001).

#### 1. Ang1

L'Ang1 a été identifiée en 1996; elle se lie à son récepteur Tie2. L'axe Ang1/Tie2 est un acteur reconnu de la formation et de la stabilisation des vaisseaux.

#### A. **Rôle dans la maturation et la stabilisation des vaisseaux**

Les souris déficientes en Tie2 développent des défauts cardiaques et des hémorragies (Dumont et al., 1994). L'invalidation d'Ang1 entraîne un phénotype similaire, mais légèrement moins sévère (Suri et al., 1996). L'analyse ultrastructurale suggère que les vaisseaux sanguins déficients en Tie2 ne possèdent pas de péricytes (Patan, 1998). Une mutation sur le gène Tie2 induit une malformation veineuse caractérisée par une couverture inégale ou un manque complet de CML vasculaires autour de certaines veines. (Vikkula et al., 1996). De plus, une mauvaise association entre les CE et les cellules périvasculaires ou la matrice extracellulaire est observée dans les souris déficientes en Ang1, suggérant que la signalisation Ang1 participe à l'adhésion entre ces composants du vaisseau (Suri et al., 1996).

## **B. Mécanisme dans la maturation et la stabilisation des vaisseaux**

La signalisation Tie2 ne joue pas de rôle direct dans le recrutement des cellules murales. La perte de cellules murales est une conséquence de l'apoptose des CE (Jones et al., 2001; Puri et al., 1999). Ceci est confirmé par le fait que la couverture initiale des vaisseaux endothéliaux par des péricytes est normale chez les souris Tie2-déficientes, et que les cellules murales sont rapidement éliminées à partir de E15,5. L'inactivation de Tie2 induit l'apoptose des CE et la déficience en cellules murales observée chez les souris déficientes en Tie2 ou Ang1 est la conséquence de la mort des CE (Jones et al., 2001).

Par ailleurs, la signalisation Ang-1/Tie2 dans la CE pourrait être nécessaire pour la stabilisation des vaisseaux. En effet, on sait que la fixation d'Ang-1 sur Tie2 entraîne l'expression de sérotonine, d'"Heparin-Binding EGF-like growth factor" (HB-EGF), de PDGF BB, de TGF $\beta$  et de " Bone Morphogenic Protein " (BMP), qui sont connus comme régulateurs du recrutement des cellules murales et de la stabilisation des vaisseaux (Augustin et al., 2009). Par opposition, Ang-2 est un régulateur antagoniste des CE et conduit à la déstabilisation et au décrochage des cellules murales (Hu and Cheng, 2009).

### **2. S1P**

La S1P extracellulaire active une famille de récepteurs (S1P<sub>1</sub> à 5) à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G. Ces récepteurs sont aussi connus comme "endothelial differentiation gene (Edg)-réceptors". S1P<sub>1</sub> et S1P<sub>3</sub> sont des récepteurs impliqués dans la croissance vasculaire. S1P<sub>1</sub> est aussi un récepteur majeur de la maturation vasculaire (Kono et al., 2004). Il est exprimé par l'endothélium des artères et des capillaires, mais on le retrouve aussi faiblement exprimé dans les CML de l'aorte dorsale (Liu et al., 2000).

#### **A. Rôle dans le recrutement des cellules murales**

Tous les embryons murins déficients en S1P<sub>1</sub> meurent d'un œdème et d'une hémorragie à cause d'un défaut de couverture de l'aorte par des CML (Liu et al., 2000). Les vaisseaux cérébraux et ceux des membres sont pauvrement pourvus en cellules murales (Allende et al., 2003). De plus, dans le membre, cette situation s'aggrave dans des conditions hypoxiques avec l'augmentation de l'expression d'"Hypoxia-Inducible Factor-1 $\alpha$ " (HIF-1 $\alpha$ ) et de "Vascular Endothelial Growth Factor" (VEGF), conduisant à une hypervascularisation (Chae et al., 2004).

## **B. Mécanisme dans le recrutement des cellules murales**

L'axe S1P/ S1P<sub>1</sub> joue aussi un rôle dans la maturation des vaisseaux en favorisant la survie des CE. Il renforce l'intégrité de l'endothélium en induisant l'assemblage des jonctions adhérentes (Garcia et al., 2001). Chez les souris déficientes en récepteur S1P<sub>1</sub> spécifiquement dans les CE, les embryons meurent de la perte de cellules murales et d'hémorragie due à un défaut de stabilisation des vaisseaux. Ce phénotype est équivalent à celui observé chez les souris déficientes en S1P<sub>1</sub> dans tous les types cellulaires (Allende et al., 2003). Par contre, l'inactivation de S1P<sub>1</sub> dans les CML vasculaires n'influence pas la stabilisation des vaisseaux. Ces données montrent que la signalisation S1P<sub>1</sub> dans l'endothélium est cruciale pour la régulation du recrutement des cellules murales et pour la stabilisation des vaisseaux.

Le défaut de la maturation vasculaire dans ces souris est attribué à une mauvaise interaction CE-cellules murales via la N-cadhérine. La N-cadhérine est décrite pour se localiser à l'interface des CE et des cellules murales (Gerhardt et al., 2000) où elle permet l'adhésion des cellules murales sur les CE. Cette interaction dépend de la signalisation S1P/S1P<sub>1</sub>/Gi/Rac et contribue ainsi au recrutement des cellules murales sur les néovaisseaux (Tillet et al., 2005).

Une autre étude montre que la signalisation S1P/S1P<sub>1</sub>/Gi/Rac participe aussi à la perméabilité vasculaire (McVerry and Garcia, 2005).

### **3. "Placenta Growth Factor"**

Le "Placenta Growth Factor" (PlGF) fait partie de la famille des VEGF. Sa fixation sur le " Vascular Endothelial Growth Factor Receptro-1" VEGFR-1 induit la transduction d'un signal intracellulaire. Le PlGF est considéré *in vitro* comme un facteur mitogène et migratoire pour les CML (Pan et al., 2010). Par contre, ses effets sur le recrutement des cellules murales et sur la maturation des vaisseaux sont controversés selon les modèles animaux utilisés. Alors que le PlGF a été impliqué dans le recouvrement des gros vaisseaux par les péricytes (Hedlund et al., 2009), il pourrait en même temps être responsable de la perte des péricytes et en conséquence de la rétinopathie associée au cancer (Cao et al., 2010). Une étude utilisant des souris PlGF<sup>-/-</sup> suggère cependant que les CML ne sont pas une cible directe du PlGF, puisque la présence des CML est comparable chez les souris PlGF<sup>-/-</sup> et les souris sauvages dans les vaisseaux induits par ischémie (Freitas-Andrade et al., 2012).

#### **4. Acide rétinoïque**

L'acide rétinoïque est aussi un facteur impliqué dans le recrutement des cellules murales et la stabilisation des vaisseaux. La souris déficiente en "retinal aldehyde dehydrogenase 2" (Raldh2), qui ne peut pas synthétiser l'acide rétinoïque, présente des vaisseaux dilatés et pauvres en cellules murales (Lai et al., 2003). Comme seules les CE, et pas les CML, expriment le récepteur de l'acide rétinoïque, le défaut de recrutement des cellules murales est plutôt le résultat d'une action indirecte sur les CE.

## **II. FACTEURS A EFFET DIRECT SUR LES CELLULES MURALES**

Contrairement aux facteurs cités dans les paragraphes précédents, nombre de facteurs jouent un rôle important dans la prolifération, l'adhésion, la migration et la survie des cellules murales, suggérant un effet potentiel direct dans le recrutement des cellules murales sur les vaisseaux. Parmi ces facteurs, certains (PDGF BB, HB-EGF) sont connus pour être sécrétés par les CE qui, par une action paracrine, vont agir sur les cellules murales; d'autres sont produits par les cellules murales elles-mêmes (ostéopontine (OPN) et Notch3) et vont agir par une action autocrine.

### **1. PDGF BB**

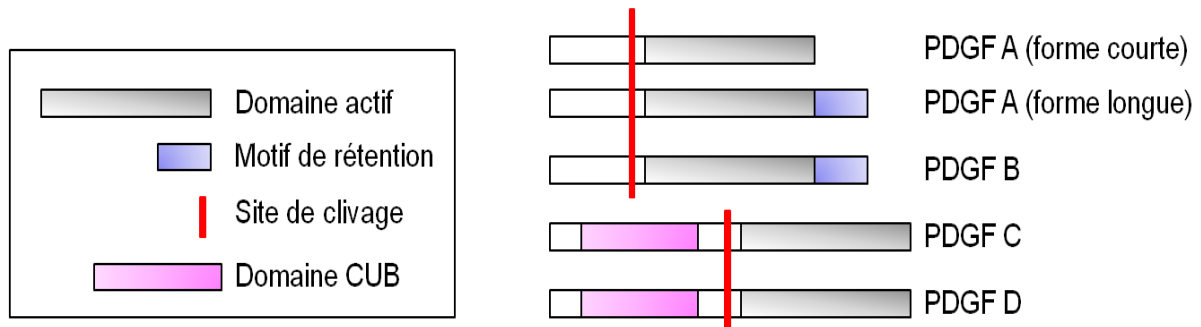
Le PDGF a été initialement découvert par Ross et al. en 1974 (Ross et al., 1974). Ce facteur présent dans le sérum est libéré par les plaquettes pendant la coagulation du sang. Par la suite différentes formes de PDGF ont été mises en évidence. Les PDGF agissent comme facteurs de croissance et induisent différentes réponses cellulaires. Les PDGF sont impliqués dans diverses fonctions biologiques comme la régulation de la prolifération cellulaire, de la survie, de la migration cellulaire, du réarrangement du cytosquelette et de la stimulation de la synthèse des composants de la MEC (Basciani et al., 2010). Les PDGF sont responsables de nombreux processus physio-pathologiques tels que l'athérosclérose, le cancer et l'hypertension artérielle pulmonaire (Barst, 2005 ; Calzolari and Malatesta, 2010 ; Kher and Marsh, 2004).

#### **A. La famille PDGF**

Chez les mammifères, les polypeptides PDGF A, PDGF B, PDGF C et PDGF D sont codés par 4 gènes situés sur des chromosomes différents (Ball et al., 2010).

Le PDGF A et le PDGF B sont sécrétés. Ils sont retenus dans la MEC par une extension riche en amino-acides basiques localisée en position C-terminale. Il existe aussi une forme soluble du PDGF A issue d'un épissage alternatif, dépourvue de cette extension.

Les chaînes du PDGF C et du PDGF D sont sécrétées sous des formes latentes et sont activées par un clivage protéolytique du domaine CUB (domaine homologue aux facteurs du complément cl<sub>r</sub>/cl<sub>s</sub>) qui empêche la liaison aux récepteurs du PDGF (**Fig. 5**).



**Figure 5 : Les différentes formes de PDGF** (d'après Hoch et al., 2003)

Seuls les dimères des PDGF, que ce soit les homodimères (PDGF AA, PDGF BB, PDGF CC et PDGF BB) ou l'hétérodimère (PDGF AB), sont biologiquement actifs. La liaison entre les chaînes est réalisée par un pont disulfure.

## B. Les PDGFR

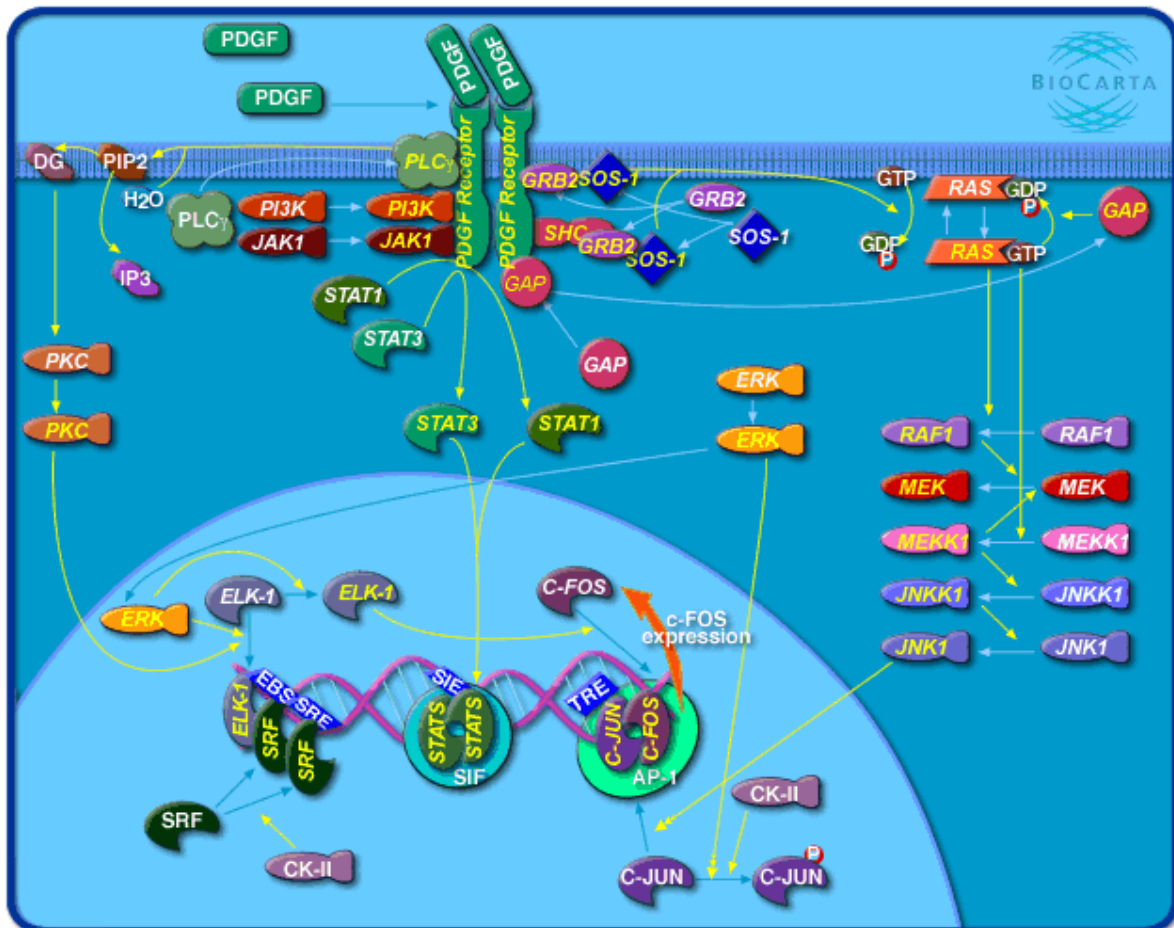
Les PDGF agissent en se liant à des récepteurs à tyrosine kinase composés de dimères des chaînes de PDGFR $\alpha$  et PDGFR $\beta$ . Ils possèdent des structures communes, dont cinq domaines extracellulaires immunoglobuline-like et deux domaines intracellulaires à tyrosine kinase. Les monomères se dimérisent pour former 3 types de récepteurs :  $\alpha\alpha$ ,  $\beta\beta$  et  $\alpha\beta$  en réponse à la fixation des différents ligands. En fonction de leur composition en chaînes  $\alpha$  ou  $\beta$  les récepteurs fixent des ligands différents :

- le PDGFR $\alpha\alpha$  fixe toutes les formes de PDGF sauf le PDGF DD,
- le PDGFR $\beta\beta$  ne lie que les homodimères BB et DD,
- et le PDGFR $\alpha\beta$  lie toutes les formes sauf AA.

Les interactions PDGF/PDGFR ont été confirmées *in vivo* uniquement pour les PDGF AA, PDGF BB et PDGF CC (Andrae et al., 2008).

### C. Voies de signalisation activées par PDGF BB

La fixation du PDGF BB sur son récepteur induit sa dimérisation et l'activation de la fonction tyrosine kinase, ce qui induit l'autophosphorylation du récepteur sur 8 résidus tyrosine. A l'image d'autres protéines à domaine "Src homology domain 2" (SH2), le PDGF BB induit une cascade complexe de signalisation (Tallquist and Kazlauskas, 2004) (**Fig. 6**) en activant :



**Figure 6 : les voies de signalisation activées par les PDGF** (d'après (Tallquist and Kazlauskas, 2004))

- la "Phosphoinositide 3-Kinase" (PI3K) qui par la phosphorylation de la protéine kinase B (PKB/Akt) permet l'assemblage de l'actine et l'activation de Ras, de la phospholipase D et de la "Protein Kinase C  $\xi$ " (PKC $\xi$ ),
- la phospholipase C $\gamma$  qui à terme permet d'activer la PKC et les réarrangements d'actine,
- la voie Ras via Grb2/Sos qui permet d'activer différentes kinases telles les "Mitogen Activated Protein Kinase" (MAPK),

- STAT qui interagit avec le récepteur PDGR $\beta$  et active un facteur de transcription STAT3, permettant l'expression des gènes impliqués dans la prolifération cellulaire,
- la protéine Src impliquée aussi dans le réarrangement du cytosquelette.

#### **D. Rôle dans le recrutement des cellules murales**

La compréhension du rôle de PDGF BB dans la maturation de vaisseaux est basée sur l'étude de souris transgéniques. L'invalidation de PDGF BB ou de son récepteur PDGFR $\beta$  dans les embryons murins conduit à une déficience en cellules murales sur les vaisseaux, ce qui les rend hyperperméables et provoque une léthalité périnatale (Hellstrom et al., 1999). Au cours de la pousse des vaisseaux l'expression du PDGF BB est particulièrement forte dans les "tip cells" endothéliales. Le PDGF BB sécrété est retenu par la MEC à la surface endothéliale via le motif de rétention et crée ainsi un gradient qui permet le recrutement des péricytes vers les CE (Gerhardt et al., 2003). L'ablation de ce motif de rétention a pour conséquence une diminution des péricytes recouvrant la paroi des microvaisseaux. Bien que les mutants vivent jusqu'à l'âge adulte, ils développent des gloméruloscléroses et des rétinopathies très sévères dues à la dysfonction des péricytes (Lindblom et al., 2003).

Dans des modèles animaux expérimentaux, le défaut de péricytes est observé chez les souris dans lesquelles on a administré un anticorps bloquant dirigé contre le PDGF BB ou des inhibiteurs de PDGR $\beta$ , démontrant l'importance de cette protéine pour la stabilisation des vaisseaux dans de nombreux organes ou tissus : le cœur, le placenta, le glomérule, la rétine etc (Betsholtz et al., 2005; Bjarnegard et al., 2004; Enge et al., 2002; Hellstrom et al., 2001; Hoch and Soriano, 2003; Tallquist et al., 2003; Uemura et al., 2002; Zymek et al., 2006). En absence de péricytes, les microvaisseaux sont perméables et sont le siège de multiples ruptures d'anévrismes. Les CE prolifèrent en excès et ne peuvent pas former de jonctions inter-endothéliales matures. La surface endothéliale endoluminale reste irrégulière avec de multiples repliements.

Il faut noter que les autres PDGF et PDGFR peuvent aussi être modulés et intervenir dans la maturation des vaisseaux. Ainsi, dans l'ostéosarcome de la souris, l'inhibition de HIF-1 provoque une surexpression de PDGF-C dans la tumeur et de PDGFR $\alpha$  dans les cellules murales qui sont toutes les 2 responsables de l'augmentation de cellules murales recrutées (Kuzmanov et al., 2011).

## **E. Mécanisme dans le recrutement des cellules murales**

Le PDGF BB est un des facteurs majeurs intervenant dans la maturation des vaisseaux.

Il agit selon différents mécanismes :

- il est considéré comme un mitogène pour les cellules issues du mésoderme, dont les CML et les péricytes (Hirschi et al., 1999) ;
- c'est un chimioattractant fort non seulement pour les CML (Sato et al., 1991), mais aussi pour les péricytes (Arimura et al., 2012);
- il favorise la transition de cellules mésenchymateuses en péricytes, participant ainsi à la couverture des vaisseaux endothéliaux par les cellules murales (Dhar et al., 2010) ;
- il module l'expression de la RGS5, une protéine activatrice puissante de la GTPase (Cho et al., 2003) qui est exprimée spécifiquement dans les péricytes et dont l'expression est corrélée avec l'état de maturation des vaisseaux (Mitchell et al., 2008);
- il augmente l'expression du collagène et diminue l'activité de la "Matrix Metalloproteinase"-2 (MMP-2) (French et al., 2008), deux phénomènes impliqués dans la stabilisation des vaisseaux.

Il faut cependant noter que le PDGF BB possède aussi une activité proangiogénique et peut donc aussi agir en déstabilisant les vaisseaux (Greenberg et al., 2008). Ce double rôle du PDGF BB permet à ce facteur de contrôler la balance angiogénèse/maturation.

## **2. TGF- $\beta$**

Le TGF- $\beta$  appartient à une super-famille qui contient 33 membres chez les mammifères. Il joue un rôle crucial durant l'embryogenèse et dans le maintien de l'homéostasie tissulaire chez l'adulte. Les perturbations dans la signalisation du TGF- $\beta$  conduisent à de multiples troubles, incluant le cancer, la fibrose, les maladies auto-immunes et les maladies cardiovasculaires (Goumans et al., 2009).

### **A. Rôle dans le recrutement des cellules murales**

Dans les cellules vasculaires, le TGF- $\beta$  est capable de se lier à ses récepteurs "Activin receptor-Like Kinase" (ALK) 1 et 5. Les souris mutantes pour ALK5 meurent à un stade précoce (E10,5) durant le développement embryonnaire en raison de défauts vasculaires majeurs. Même si des tubes endothéliaux peuvent se former, les vaisseaux de gros calibre sont



hyperdilatés, fragiles et ne contiennent pas de cellules murales, et les capillaires fusionnent et forment des structures cavernueuses (Oh et al., 2000; Urness et al., 2000) . .

Les cibles cellulaires du TGF- $\beta$ , CE ou cellules murales, restent encore à confirmer car ALK5 est exprimé non seulement par les CE mais aussi par les cellules murales. Ainsi l'effet du TGF- $\beta$  sur le recrutement des cellules murales pourrait s'expliquer par une action activatrice des cellules murales, ou une action inhibitrice de l'activation des CE. Il a été observé que ALK5 est exprimé préférentiellement dans les CML *in vivo*, suggérant que l'effet du TGF- $\beta$  serait restreint aux cellules murales (Seki et al., 2006). Cependant la déficience spécifique en ALK5 dans les CE entraîne le même phénotype vasculaire que celui des souris ALK5<sup>-/-</sup> (Carvalho et al., 2007) suggérant que c'est via les CE que le TGF- $\beta$  agit.

## **B. Mécanisme dans le recrutement des cellules murales**

Le TGF- $\beta$  est exprimé par plusieurs types cellulaires, y compris les CE et les cellules murales. Le TGF- $\beta$  est une molécule ambivalente qui induit à la fois l'angiogenèse via le récepteur ALK1 exprimé au niveau de CE et promeut la stabilisation des vaisseaux via ALK5 des CML. Cette double fonction dépend de sa concentration qui elle-même est dépendante du contexte local et va activer soit ALK1 soit ALK5 (Goumans et al., 2002) et conduire à la mise en route de processus totalement opposés.

Pour favoriser la maturation et la stabilisation des vaisseaux, le TGF- $\beta$  :

- atténue la réponse des CE aux stimuli pro-angiogéniques, et limite ainsi l'excès de croissance et termine le processus angiogénique (Goumans et al., 2002);
- joue un rôle stimulateur direct dans la synthèse et le dépôt de la MEC. Il inhibe ainsi la dégradation de la matrice provisoire autour des vaisseaux via l'induction de "Plasminogen Activator Inhibitor 1" (PAI-1) dans les CE (Chambers et al., 2003);
- régule la différenciation des cellules mésenchymateuses en cellules murales. La couverture anormale de vaisseaux par les cellules murales est observée dans plusieurs lignées de souris qui portent des mutations des composants de la voie TGF- $\beta$ , ainsi que chez les patients atteints de la télangiectasie hémorragique héréditaire causée par des mutations de la voie TGF- $\beta$  (Bourdeau et al., 1999; Dickson et al., 1995; Li et al., 1999; Urness et al., 2000; Yang et al., 1999).

### **3. Notch3**

On trouve 4 récepteurs Notch (Notch1, 2, 3 et 4) chez les mammifères, alors que cinq ligands ont été identifiés, incluant Jagged1, Jagged2, "Delta like ligand" (Dll)1, Dll3 et Dll4. Dans le système vasculaire, Notch1 et 4 sont exprimés dans l'endothélium, tandis que Notch3 fonctionne dans les CML.

#### **A. Rôle dans le recrutement des cellules murales**

Malgré un rôle crucial de Notch1 et Notch4 dans le bourgeonnement endothélial au cours de l'angiogenèse, Notch3 est spécifiquement exprimé par les CML vasculaires. Des mutations de Notch3 chez l'homme entraînent l'artériopathie cérébrale autosomique dominante (CADASIL), qui est caractérisée par des accidents ischémiques cérébraux transitoires ou constitués sous-corticaux. Elles provoquent initialement des lésions vasculaires systémiques qui ultérieurement aboutissent à la dégénérescence des CML (Armulik et al., 2005).

Il a été démontré que Notch3 qui est exprimé dans des CML est indispensable pour leur propre maturation (Domenga et al., 2004). Les CML dépourvues de Notch3 sont altérées en taille et en forme, et ne peuvent pas s'associer aux CE, tandis que leur prolifération et leur survie ne sont pas modulées. L'expression réduite des marqueurs artériels suggère que les vaisseaux Notch3<sup>-/-</sup> évoluent vers un phénotype veineux.

#### **B. Mécanisme d'action dans le recrutement des cellules murales**

Jin et al. ont démontré que la signalisation de Notch3 dans les CML régule l'expression du PDGFR $\beta$ , qui dirige le recrutement des cellules murales. Le PDGFR $\beta$  est un gène cible direct de Notch3 dans les CML primaires en culture. Ainsi, l'expression de PDGFR $\beta$  est réduite dans les CML des souris Notch3<sup>-/-</sup>. De manière intéressante, les ligands de Notch sont incapables de réguler l'expression du PDGFR $\beta$  dans des CML provenant d'un patient CADASIL qui porte une mutation de Notch3 (Jin et al., 2008).

### **4. Autres facteurs**

Outres les 3 facteurs décrits ci-dessus dont le rôle dans le recrutement des cellules murales et dans la stabilisation des vaisseaux est bien caractérisé, il existe d'autres facteurs impliqués dans ce processus. Leurs rôles sont surtout basés sur des études de la migration des CML *in vitro* et les arguments *in vivo* sont limités.

### **A. "Heparin-Binding EGF-like Growth Factor"**

Le "Heparin-Binding EGF-like Growth Factor" (HB-EGF) agit en se fixant sur le récepteur à l'"Epidermal Growth Factor" (ErbB). Plusieurs études indiquent que le HB-EGF est essentiel pour le développement cardiovasculaire (Nanba et al., 2006). Il est aussi suggéré qu'il participe au recrutement des cellules murales sur les tubes endothéliaux. Stimulé dans les CE par l'Ang-1, l'HB-EGF entraîne la migration des CML (Iivanainen et al., 2003) vers les CE. Il a de plus été montré *in vitro* que le recrutement des péricytes sur des tubes endothéliaux demande la coordination du HB-EGF avec le PDGF BB (Stratman et al., 2010).

### **B. "Stromal-Derived Factor 1- $\alpha$ "**

L'implication de l'axe "Stromal-Derived Factor 1- $\alpha$  (SDF-1 $\alpha$ )/CXCR4 dans le recrutement des péricytes a récemment été mise en évidence. Le SDF-1 $\alpha$  stimule la formation des tubes endothéliaux *in vitro*, le recrutement des péricytes sur ces tubes et la génération de la MBE (Stratman et al., 2011). Il agit de manière coopérative avec des cytokines hématopoïétiques ("Stem Cell Factor" [SCF] et Interleukine-3 [IL-3]) et en synergie avec le PDGF BB (Song et al., 2009).

### **C. "Connective Tissue Growth Factor"**

La protéine "Connective Tissue Growth Factor" (CTGF ou CCN2), une protéine matricielle, est connue comme un facteur de croissance du tissu conjonctif. Elle est surtout impliquée dans la fibrose tissulaire. Son expression est abondante dans les CE. Très récemment, il a été démontré que CCN2 potentialise la signalisation d'Akt induite par le PDGF BB dans les cellules murales. Elle dirige le recrutement et l'adhésion des cellules murales sur les néovaisseaux et par conséquent favorise la formation de MBE par les CE. Ces données démontrent qu'elle agit sur la maturation et la stabilisation des vaisseaux par une action indirecte sur la CE (Hall-Glenn et al., 2012).

### **D. "Monocyte chemotactic protein-1"**

Ces dernières années, le rôle de la protéine "Monocyte chemotactic protein-1" (MCP-1) dans la formation des vaisseaux et les fonctions des CE vasculaires a été décrit (Cicha et al., 2011; Kawanami et al., 2011 ; Zhang et al., 2012 ). MCP-1 est aussi un facteur pro-migratoire pour les CML en culture (Fougerat et al., 2012), mais il n'existe que très peu d'arguments qui décrivent son rôle dans le recrutement des cellules murales et la maturation des vaisseaux.

Dans un modèle d'anneaux d'aorte de souris, le MCP-1 recombinant augmente de manière dose-dépendante le recrutement de cellules murales sur les tubes endothéliaux et cet effet est réduit si les anneaux proviennent de souris déficientes en MCP-1 (Aplin et al., 2010).

### E. Ténascine C

La ténascine C (TNC) est une glycoprotéine matricielle extracellulaire qui régule différentes réponses cellulaires telles que la différenciation, la migration et la prolifération cellulaire. Très récemment, elle a été impliquée dans le recrutement des CML sur l'artère coronaire proximale chez la caille et il a été montré qu'elle régule l'expression du marqueur de différenciation  $\alpha$ -SMA dans des cellules périvasculaires, indiquant aussi son rôle régulateur sur la différenciation cellulaire en CML (Ando et al., 2011).

La Figure 7 regroupe quelques facteurs et mécanismes impliqués dans le dialogue entre les CE et les cellules murales menant potentiellement au recrutement de ces dernières sur les néovaisseaux.

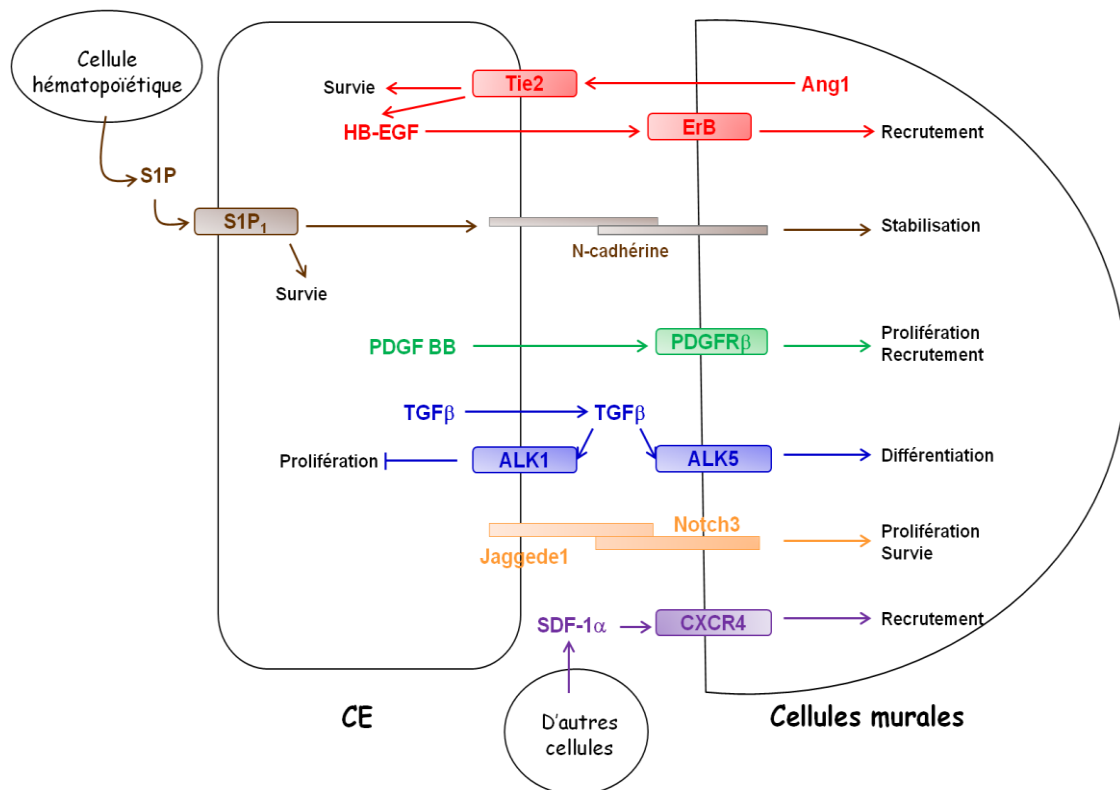


Figure 7 : Dialogue intercellulaire CE/cellules murales impliqués la maturation des vaisseaux (d'après (Armulik et al., 2011))

# CHAPITRE III : PROTEINES HEDGEHOG : SIGNALISATION ET ROLE DANS LA FORMATION DES VAISSEAUX

---

## I. GENERALITE SUR LES PROTEINES HEDGEHOG

Le gène Hedgehog (Hh) a été identifié chez la drosophile en 1978 par Wieschaus et Nusslein-Volhard (Nusslein-Volhard and Wieschaus, 1980). Chez la drosophile la propriété principale de la protéine Hh est son activité morphogénique dans le développement précoce, autrement dit, sa capacité d'imposer le devenir et le phénotype cellulaires et d'organiser les tissus en formation via l'activation de cascades de signalisation spécifiques en fonction de sa concentration.

### 1. Structure des protéines Hh

Contrairement à la drosophile et chez laquelle il n'existe qu'une protéine Hh, trois protéines Hh ont été identifiées chez les mammifères: Sonic (Shh), Indian (Ihh) et Desert Hedgehog (Dhh). Les gènes codant pour Shh, Ihh et Dhh se localisent sur des chromosomes différents : chromosome 5, 14 et 15 chez la souris et chromosome 7, 2 et 12 chez l'Homme, respectivement. Les protéines sont fortement conservées entre les différentes espèces (**Tab. 2**).

<b>Identité de la protéine Shh murine avec différentes espèces</b>			
	Drosophile Hh	Poisson zèbre Shh	Poulet Shh
Humain Shh	62%	68%	84%
<b>Identité des différentes protéines Hh entre l'humain et la souris</b>			
	Shh/Shh	Ihh/Ihh	Dhh/Dhh
Shh	92,4%	96,8%	97,3%

**Tableau 2: Identité des différentes protéines Hh entre espèces** (d'après Marigo et al., 1995; Pathi et al., 2001)

Les 3 protéines Hh des vertébrés sont synthétisées et modifiées post-transcriptionnellement par des mécanismes identiques. Elles sont générées sous la forme de pré-proprotéines d'environ 45 kDa. Celles-ci possèdent un peptide d'adressage (résidus 1 à 23, 1 à 27 et 1 à 22 pour Shh, Ihh et Dhh, respectivement) à leur extrémité N-terminale, qui est reconnu par une "Signal Recognition Particle" (SRP) durant sa translocation dans le réticulum

endoplasmique. Au terme de la translocation, la séquence signale est retirée par une peptidase spécifique. Les proprotéines Hh sont ensuite clivées par autoprotéolyse de la partie C-terminale en libérant deux polypeptides (Valentini et al., 1997).

- une séquence N-terminale de 19 kDa, appelée N-Hh (résidus 24 à 197, résidus 28 à 202 et résidus 23 à 198 pour Shh, Ihh et Dhh, respectivement) ;
- une séquence C-terminale de 26 kDa (résidus 198 à 462, résidus 203 à 411 et résidus 199 à 396 pour Shh, Ihh et Dhh, respectivement), dégradée après le clivage.

Chez la même espèce, les différentes protéines Hh possèdent un niveau de conservation très élevé, en particulier pour la partie N-terminale des protéines. Chez l'Homme, N-Shh a 91% d'identité avec N-Ihh et 76% avec N-Dhh. L'identité entre l'Ihh et Dhh est de 80% (**Fig. 8**).

	* * * * *	*	**	* * *	* * * * * * * *	*	* * * * * * * *	**	* * *
Shh	C <sup>24</sup> GPGRGF-G-	KRRHPKK-LTP	LAYKQFIPNV	AEKTLGASGR	YEGKISRNS	E	YEGKISRNS	E	
Ihh	C <sup>28</sup> GPGRV-VGS	RRRPPRK-LVP	LAYKQFSPNV	PEKTLGASGR	YEGKIARSSE	E	YEGKIARSSE	E	
Dhh	C <sup>23</sup> GPGRGPVG-	RRRYARKQLVP	LLYKQFVPGV	PERTLGASGP	AEGRVARGSE	E	AEGRVARGSE	E	
	**	*	* * * * *	* * * * * * * * * *	* * * * * * * *	*	**	*	* * * *
Shh	RFKELTPNYN	PDIIFKDEEN	TGADRLMTQR	CKDKLNALAI	SVMNQWPGVK		SVMNQWPGVK		
Ihh	RFKELTPNYN	PDIIFKDEEN	TGADRLMTQR	CKDRLNSLAI	SVMNQWPGVK		SVMNQWPGVK		
Dhh	RFRDLVPNYN	PDIIFKDEEN	SGADRLMTER	CKERVNALAI	AVMNMWPGVR		AVMNMWPGVR		
	* * * * * * * * *	* * * *	* * * *	* * * *	* * * * *	* * * *	* * *	* * *	* * * * * * * * *
Shh	LRVTEGWDED	GHHSEESLHY	EGRAVDITTS	DRDRSKYGML	ARLAVEAGFD		ARLAVEAGFD		
Ihh	LRVTEGWDED	GHHSEESLHY	EGRAVDITTS	DRDRNKYGLL	ARLAVEAGFD		ARLAVEAGFD		
Dhh	LRVTEGWDED	GHHAQDSLHY	EGRALDITTS	DRDRNKYGLL	ARLAVEAGFD		ARLAVEAGFD		
	* * * * *	*	* * * *	*	* * *	*	*	*	*
Shh	WVYYESKAHI	HCSVKAENSV	AAKSGG <sup>197</sup>						
Ihh	WVYYESKAHV	HCSVKSEHSA	AAKTGG <sup>202</sup>						
Dhh	WVYYESRNHV	HVSVKADNSL	AVRAGG <sup>198</sup>						

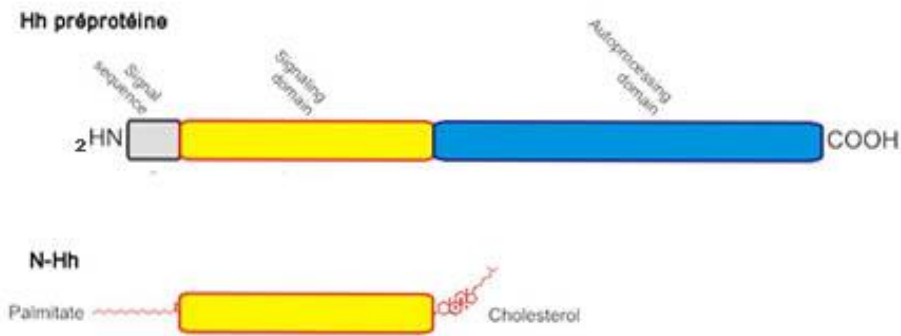
**Figure 8 : Alignement des séquences du domaine N-terminal de Shh, Ihh et Dhh humaines :**

\* indique les acides aminés identiques aux 3 protéines Hh.

## 2. Modifications post-transcriptionnelles des protéines Hh

Durant le clivage autoprotéolytique, une molécule de cholestérol se lie en C-terminal de N-Hh, permettant sa sécrétion sous une forme encapsulée ainsi que l'ancrage de N-Hh à la surface de la cellule (Kobune et al., 2004; Porter et al., 1996) (**Fig. 9**).

N-Shh est aussi soumise à une seconde modification importante : l'accrochage d'un palmitate sur le groupement  $\alpha$ -amine de la cystéine N-terminale (Buglino and Resh, 2010). Ces modifications semblent essentielles pour établir les structures secondaires et tertiaires ou pour la stabilité et l'activité des protéines Hh. La fixation de lipides sur Shh lui confère des propriétés lipophiles qui favorisent le mouvement de la protéine après sa sécrétion dans l'espace extracellulaire.



**Figure 9 : Représentation schématique de la structure des protéines Hh et de leur maturation**

## II. VOIE DE SIGNALISATION DES PROTEINES HH ET FONCTIONS CELLULAIRES

La voie Hh sera d'abord présentée chez la drosophile avant de se focaliser sur celle des mammifères et plus particulièrement sur son implication dans la fonction du cil primaire.

### 1. Voie de transduction du signal Hh chez la drosophile

De nombreuses études se sont attachées à décrire la voie de signalisation Hh chez la drosophile et ces données ont été compilées dans une revue récente (Ayers and Therond, 2010).

Les protéines Patched (Ptch) et Smoothened (Smo) sont responsables, respectivement, de la fixation et de la transduction du signal Hh.

En absence du ligand Hh, Ptch inhibe Smo via un mécanisme encore en discussion, ce qui bloque le transfert de Smo sur la membrane plasmique et donc son activation. Smo se retrouve finalement dans des vésicules intracellulaires et est dégradée. Un complexe de signalisation composé de "kinesin-like protein Costal2" (Cos2) et de la "kinase Fused" (Fu) ne peut pas se lier à Smo, ce qui entraîne la phosphorylation de la forme longue du facteur de transcription Cubitus interruptus (Ci<sup>155</sup>) par la "Protein Kinase A" (PKA). Ceci conduit à un clivage partiel de Ci par le protéasome, libérant la forme courte répresseur Ci<sup>Rep</sup>, qui est ensuite transloquée dans le noyau où elle réprime l'expression des gènes cibles de la voie Hh (**Fig. 10a**).

En présence du ligand Hh, Ptch ne peut plus réprimer Smo, permettant sa phosphorylation par la PKA et son accumulation sur la membrane plasmique. Le changement de conformation de Smo engendre l'activation de Ci<sup>155</sup> en Ci<sup>Act</sup> via un mécanisme mal connu,

ce qui se traduit par la transcription de gènes cibles. De plus, la forme activée de Smo peut recruter des protéines Gi et réguler ainsi le niveau d'adénosine monophosphate cyclique (AMPc). Smo activée peut aussi être phosphorylée par les kinases de la famille "G-protein coupled Receptor Kinase" (GRK), permettant son internalisation (**Fig. 10b**).

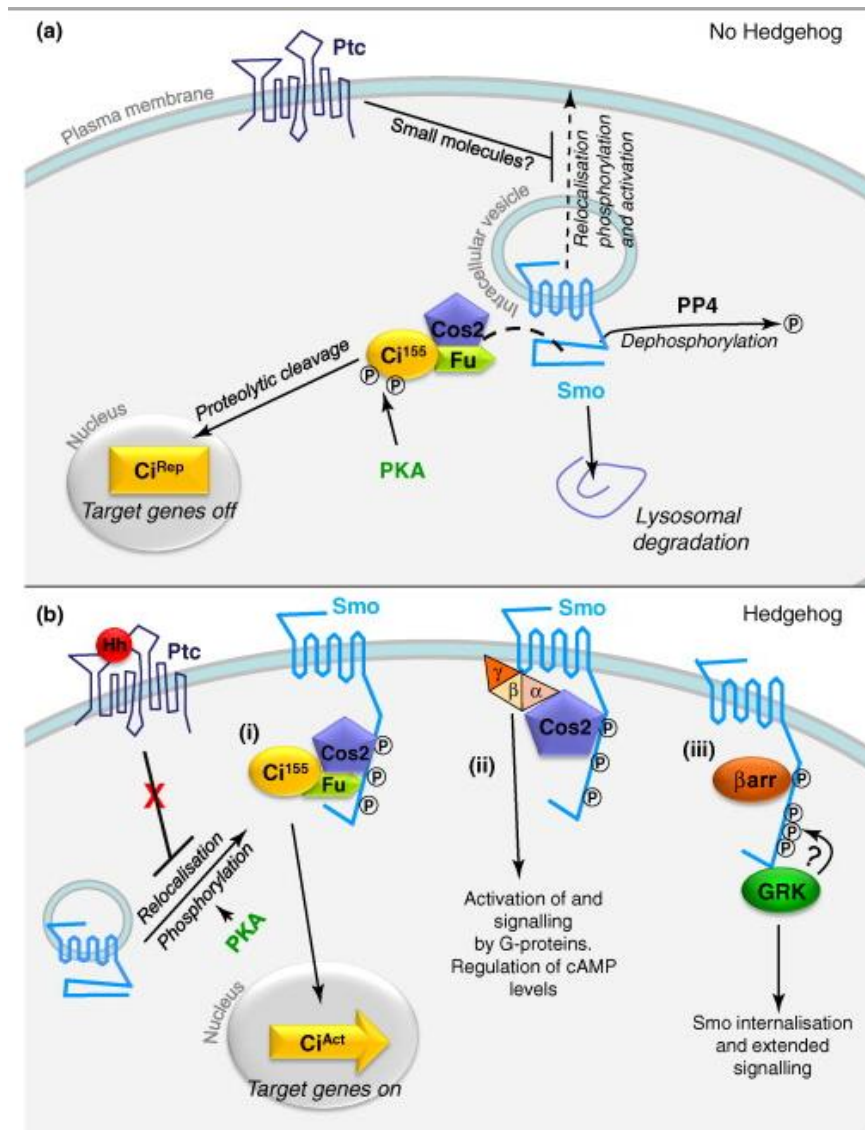


Figure 10 : Représentation schématique de la voie de transduction Hh chez la drosophile (d'après (Ayers and Therond, 2010))

## 2. Signalisation Hh chez les mammifères

Chez les mammifères, le fonctionnement de la voie Hh est comparable à celui chez la drosophile (voie canonique : Gli-dépendante), même si plusieurs différences ont été mises en évidence ces dernières années (voies non-canoniques : Gli-indépendante). La liste des membres principaux de la voie Hh chez la drosophile et leurs homologues chez les mammifères sont présentés dans le **Tableau 3**.



Gène drosophile	Homologues mammifères	Fonction	Conservé ?
Hh	Shh, Ihh, Dhh	Ligand de la signalisation	Oui
Ski	Hhat (Skn)	Palmitoylation	Oui
Disp	Disp1, Disp2	Sécrétion de ligand	Oui
Ptc	Ptch-1, Ptch-2	Récepteur, inhibition de Smo	Oui
Ihog, Boi	Cdo, Boc	Co-récepteur de Ptch	Oui
Smo	Smo	Récepteur, transducteur	Oui
Costal2	Cos2/Kif7	kinésine	Oui
Fu	Fu (stk36)	Transducteur positif	Non
Su(fu)	Sufu	Répresseur	Oui
Ci	Gli1, Gli2, Gli3	Activateur/répresseur de la transcription	Oui

**Tableau 3 : Composants essentiels de la voie de signalisation Hh chez la drosophile et chez les mammifères**  
(d'après (Wilson and Chuang, 2010))

### A. Voie canonique Gli-dépendante

La voie canonique Hh est une signalisation, comparable à celle de la drosophile, qui implique la transcription des gènes cibles dépendante de Gli. Elle est résumée dans la revue de Kasper 2006 (Kasper et al., 2006).

En absence du ligand Hh, la protéine Sufu forme un complexe avec les facteurs de transcription "Glioma-associated oncogene homolog" 2/3 (Gli2/3) et la protéine Cos2, et autorise la phosphorylation de Gli2/3 par PKA, "Glycogen Synthase Kinase 3β" (GSK3β) ou "Casein kinase 1" (CK1), ce qui conduit à la protéolyse partielle des Gli par le protéasome. La forme courte résultante, Gli répresseur (Gli<sup>rep</sup>) est transloquée dans le noyau, et réprime la transcription des gènes cibles de Gli en déacétylant les histones des gènes concernés (**Fig. 11**).

La fixation du ligand Hh sur son récepteur Ptch permet l'activation de son co-récepteur Smo. La phosphorylation de Smo via des kinases non-définies entraîne un recrutement du complexe Cos2-Gli2/3 et une désorganisation du complexe de kinases (PKA, GSK3β et CK1). Ceci conduit à la translocation de la forme active de Gli2/3 (Gli<sup>A</sup>) dans le noyau et permet la transcription de ces gènes cibles (**Fig. 11**).

Le cil primaire est une projection de la membrane plasmique vers le milieu extracellulaire. Il se compose notamment d'un axonème qui croît à partir du centriole. L'implication du cil dans la voie de signalisation Hh est apparue lors de l'étude de mutants de souris pour des gènes codant des protéines essentielles à la structure de l'organelle comme

"Intraflagellar Transport" 88 et 172 (IFT88 et IFT172). Ces mutants présentent un phénotype caractéristique d'une perte de la voie Hh Gli-dépendante. En effet, en présence de Shh, Smo s'accumule au niveau du cil. De même, Sufu et les facteurs de transcription Gli sont localisés au niveau de cette structure. Il est intéressant de noter qu'à l'inverse, chez la drosophile, le cil ne semble pas être impliqué dans le fonctionnement de la voie Hh (Ruat et al.).

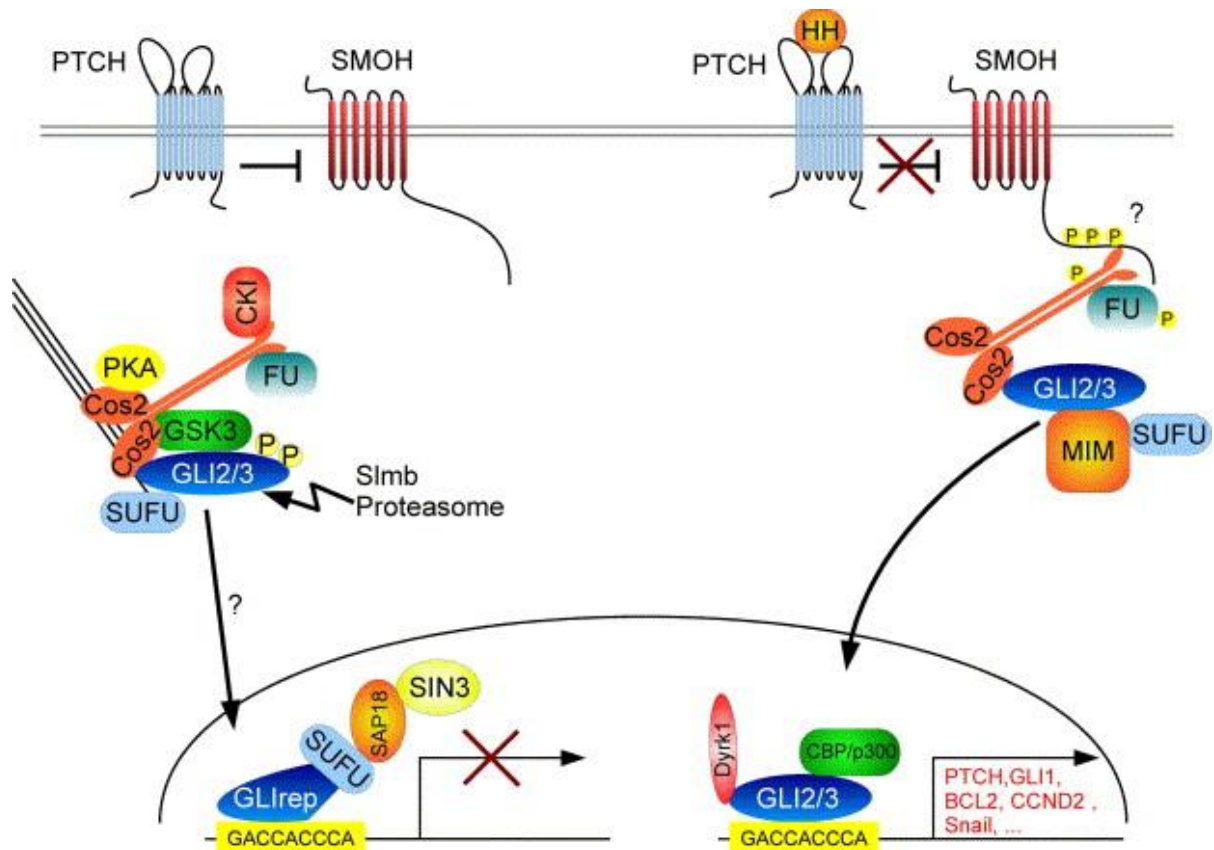


Figure 11 : Représentation schématique de la voie de transduction Hh chez les mammifères (d'après (Kasper et al., 2006))

## B. Voie non-canonique Gli-indépendante

La recherche dans le domaine de la signalisation Shh/Gli a longtemps été centrée sur une seule voie de signalisation : la voie canonique dépendante du facteur de transcription Gli. Cependant, depuis ces 10 dernières années, un nombre croissant de travaux viennent démontrer l'implication de voies non canoniques. Elles peuvent être divisées en 2 branches distinctes (Jenkins, 2009) (**Fig. 12**):

- une signalisation qui fait intervenir l'activation de Smo tout en restant indépendante du facteur de transcription Gli1. Par exemple, la réponse Gli1-dépendante est absente dans

les "Human Umbilical Vein Endothelial Cells" (HUVEC) en réponse aux protéines Hh qui stimulent directement la voie RhoA (Chinchilla et al., 2010; Renault et al., 2010). Le même mécanisme a été décrit dans les fibroblastes 3T3 avec une activation de l'axe PI3K/RhoA ou Rac1 (Polizio et al., 2011), même si la voie canonique est aussi active dans ces cellules.

- une voie qui n'implique que le récepteur Ptch-1, par conséquent indépendante de Smo et de Gli1. Récemment, il a été mis en évidence un rôle des protéines Hh dans la prolifération et la survie cellulaires via un mécanisme Smo-indépendant. En absence de ligand, Ptch-1 interagit physiquement avec la cycline B1 : la fixation des ligands Hh sur le récepteur Ptch-1 permet le changement de la configuration de Ptch-1 en libérant la cycline B1 qui migre ensuite dans le noyau, avec pour conséquence la stimulation de la prolifération cellulaire (Barnes et al., 2001).

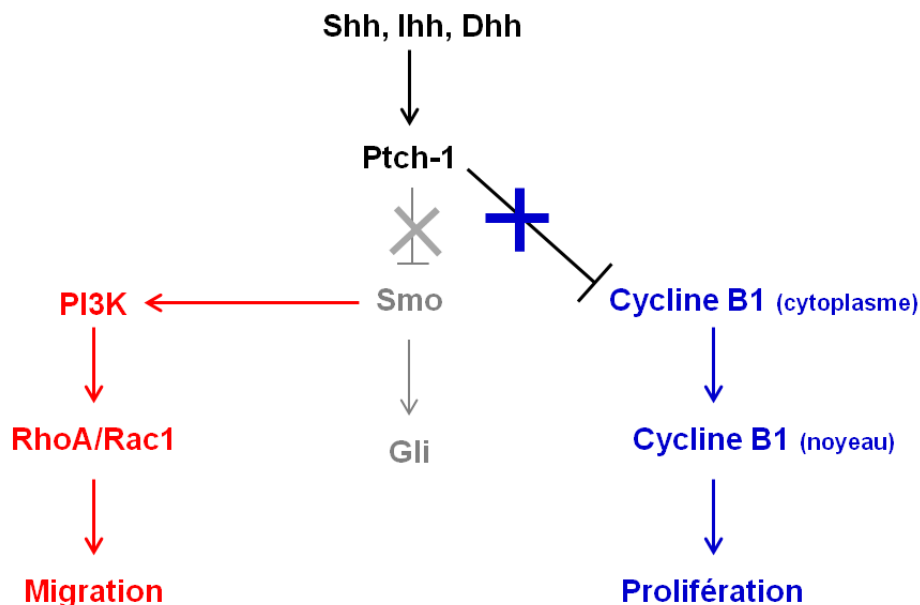


Figure 12 : Représentation schématique de voies non-canoniques Hh (d'après (Jenkins, 2009))

### 3. Dérégulation de la voie de signalisation Hh et cancer

La dérégulation de la signalisation Hh provoque des cancers, notamment le carcinome pancréatique. Plusieurs mécanismes peuvent être responsables de la sur-activation de la voie Hh dont l'activation constitutive de la voie, par exemple par des mutations des gènes Ptch-1 et Smo ou la surexpression des ligands Hh ou des facteurs de transcription Gli.

## **A. Mutation de Ptch-1 et de Smo :**

La première preuve de l'implication de la signalisation Hh dans la carcinogénèse survient en 1996 lorsque des mutations inactivant Ptch-1 sont identifiées dans les naevomatoses (carcinomes baso-cellulaires) et le syndrome de Gorlin (Hahn et al., 1996; Uden et al., 1996). Les malades développent des carcinomes baso-cellulaires et des médulloblastomes dans lesquels le gène codant pour Ptch-1 est inactivé via la perte de l'hétérozygotie.

Des mutations somatiques de Ptch-1 sont retrouvées dans des carcinomes baso-cellulaires et des médulloblastomes; ces mutations définissent une classe de tumeurs apparentées au syndrome de Gorlin dans laquelle la protéine Smo est constitutivement active en l'absence de la protéine fonctionnelle Ptch-1.

L'activation constitutive de Smo provoquée par des mutations de Smo est également décrite notamment dans le carcinome baso-cellulaire (Xie et al., 1998) et moins fréquemment dans le médulloblastome (Dey et al., 2012) et le chondrosarcome (Yan et al., 2008).

## **B. Surexpression du ligand Hh**

Une augmentation de l'expression de Shh et de Ihh a été montrée dans certains cancers dits "dépendant du ligand" (Rubin and de Sauvage, 2006; Teglund and Toftgard, 2010). Ce groupe inclut des cancers de la prostate (Fan et al., 2004; Karhadkar et al., 2004; Sanchez et al., 2004), du pancréas (Thayer et al., 2003), du tractus gastrointestinal (Berman et al., 2003), des poumons (Watkins et al., 2003), du foie (Sicklick et al., 2006), du sein (Kubo et al., 2004) et du cerveau (Kinzler et al., 1987).

## **C. Surexpression des facteurs de transcription Gli**

Le développement de certains cancers dépend de la modulation des facteurs de transcription Gli, faisant de ces facteurs des biomarqueurs de l'activité de la signalisation Hh dans le développement des cancers.

Ainsi il a été mis en évidence une surexpression de Gli :

- dans la tumorigénèse pancréatique médiée par KRAS (Kirsten rat sarcoma viral oncogen homologue) (Ji et al., 2011) ;
- dans le mélanome médié par "neuroblastoma rat sarcoma viral oncogen homologue" (NRAS) (Stecca et al., 2007) ;
- dans le cancer du sein métastatique médié par le TGF $\beta$  (Johnson et al., 2011b).

#### **4. Molécules influençant la signalisation Hh**

La signalisation de Hh est complexe. Elle est régulée par de nombreuses molécules, incluant des co-récepteurs, des protéines impliquées dans le transport intracellulaire des éléments de la voie Hh, ainsi que des agonistes/antagonistes naturels ou synthétiques.

##### **A. Régulateurs physiologiques**

A côté des récepteurs Ptch-1 et Smo, plusieurs autres récepteurs, agonistes et antagonistes physiologiques de la voie Hh ont été identifiés chez les mammifères, en particulier grâce à la technique d'inactivation génique chez la souris.

###### ***a. Boc et Cdon***

La "Cell adhesion molecule-related/Down-regulated by Oncogenes" (Cdon) et la "Brother of Cdon" (Boc) sont des protéines membranaires qui possèdent un domaine extracellulaire composé d'une série de domaines immunoglobuline et fibronectine. L'analyse structurale a identifié que la partie fibronectine est essentielle à la liaison de Shh. Cdon et Boc fonctionnent comme des régulateurs positifs de l'activité de la voie Hh (Tenzen et al., 2006). Leurs rôles fonctionnels sont principalement décrits dans la guidance d'axones via un renforcement du chimiotactisme (Okada et al., 2006), ainsi que dans la prolifération des progéniteurs des neurones (Izzi et al., 2011). Cdon et Boc stabilisent soit la protéine Shh, soit l'interaction entre Shh et son récepteur Ptch-1. Néanmoins, le niveau final de ces récepteurs sur la membrane est étroitement régulé par un mécanisme de rétrocontrôle négatif (Sanchez-Arrones et al., 2012).

###### ***b. "Growth arrest specific 1"***

La protéine codée par le gène "Growth arrest specific 1" Gas1 appartient à la famille des glycoprotéines liées à la membrane par une ancre glycosylphosphatidylinositol. En se liant à Shh, elle inhibe sa réponse sur les cellules présomitiques (Lee et al., 2001) et régule le développement du palais et des dents (Cobourne et al., 2004 ; Rice et al., 2006). Plusieurs mutations du gène Gas1 qui provoquent une diminution de l'interaction avec Shh, sont responsables du syndrome d'holoprosencéphalie (Pineda-Alvarez et al., 2012).

Récemment, il a été établi que Boc, Cdon et Gas1 jouent un rôle coopératif dans la maintenance et la spécification des progéniteurs neuronaux (Allen et al., 2011) et que

l'absence concomitante de ces trois molécules entraîne une perturbation de la prolifération cellulaire en réponse à Shh (Izzi et al., 2011).

***c. "Hedgehog interacting protein"***

La protéine "Hedgehog interacting protein" (Hip) a été caractérisée chez l'embryon de souris comme une glycoprotéine membranaire, capable de se lier à Shh avec une affinité comparable à celle décrite entre Shh et son principal récepteur Ptch-1. Elle constitue donc un second récepteur de Shh (Chuang and McMahon, 1999). Les études de surexpression et de perte de fonction chez la souris ont révélé que Hip est un antagoniste direct des protéines Hh car en se liant à ces protéines. Elle empêche leur interaction avec Ptch-1 et par conséquent la transmission du signal à l'intérieur de la cellule cible (Chuang et al., 2003).

L'analyse des embryons de souris invalidés à la fois pour Ptch-1 ou Hip a permis de mettre en évidence de très sévères défauts morphogénétiques et de montrer que le rétrocontrôle de l'action des morphogènes Hh est exercé conjointement par Ptch-1 et Hip dans plusieurs tissus (Jeong and McMahon, 2005).

***d. Protéines régulant la transduction du signal***

On connaît aujourd'hui plusieurs protéines qui participent à la voie de transduction du signal de Smo au facteur de transcription Gli1 : "Ras-related protein 23" (RAB23) qui est une protéine du transport vésiculaire chez la souris (Eggenchwiler et al., 2001), Iguna qui régule l'import nucléaire des facteurs de transcription Gli chez le poisson zèbre (Wolff et al., 2004), Talpid qui est un régulateur du clivage, de l'internalisation et de la dégradation de Gli (Davey et al., 2006), et  $\beta$ -arrestine qui module la distribution subcellulaire de Smo (Chen et al., 2004).

***e. Cholestérol***

Il est bien établi que la modification post-transcriptionnelle du ligand Hh dans la cellule productrice comprend l'addition covalente de cholestérol au C-terminal de la protéine clivée. L'inhibition pharmacologique de la biosynthèse du cholestérol entraîne une diminution de la réponse à Shh (Cooper et al., 2003). Le phénotype résultant ressemble à celui subissant un blocage de la voie Hh (Cooper et al., 1998).

Des mutations dans les enzymes nécessaires à la biosynthèse du cholestérol chez l'homme, notamment de la 7-déhydrocholestérol réductase, sont associées à l'apparition de défauts du développement neuronal en particulier l'holoprosencéphalie, la microcéphalie, et la

déformation squelettique (Wassif et al., 1998). Chez la souris la mutation de la 17 $\beta$ -hydroxystéroïde déshydrogénase qui conduit à la réduction du cholestérol contribue aussi à la dérégulation de l'activité des protéines Hh (Stottmann et al., 2011).

#### *f. Famille glypican*

Les glypicans appartiennent à la famille des protéoglycanes qui se lient à la surface exocytoplasmique de la membrane via une ancre glycosylphosphatidylinositol (Filmus et al., 2008). Six glypicans sont identifiés chez les mammifères (GPC1 à GPC6) et deux chez la drosophile (Dally et Dlp). Chez la drosophile, Dlp (mais pas Dally) est requis pour la signalisation optimale des protéines Hh en facilitant l'interaction entre les protéines Hh et son récepteur Ptch-1 au niveau de la surface cellulaire (Lum et al., 2003).

Chez les mammifères, il a été mis en évidence que GPC3 interagit avec les protéines Hh avec une très haute affinité et entre en concurrence avec Ptch-1 pour la liaison aux protéines Hh. Pour cela les embryons de souris GPC3<sup>-/-</sup> présentent une hyperactivité de la voie Hh, et la surexpression de GPC3 inhibe l'activité des protéines Hh dans les fibroblastes embryonnaires murins (Capurro et al., 2008). De façon opposée, il a été montré plus récemment que GPC5, se lie à Shh et à Ptch-1 via les chaînes glycosaminoglycanes et stimule la signalisation de Hh en facilitant/stabilisant l'interaction entre Shh et son récepteur Ptch-1 (Li et al., 2011).

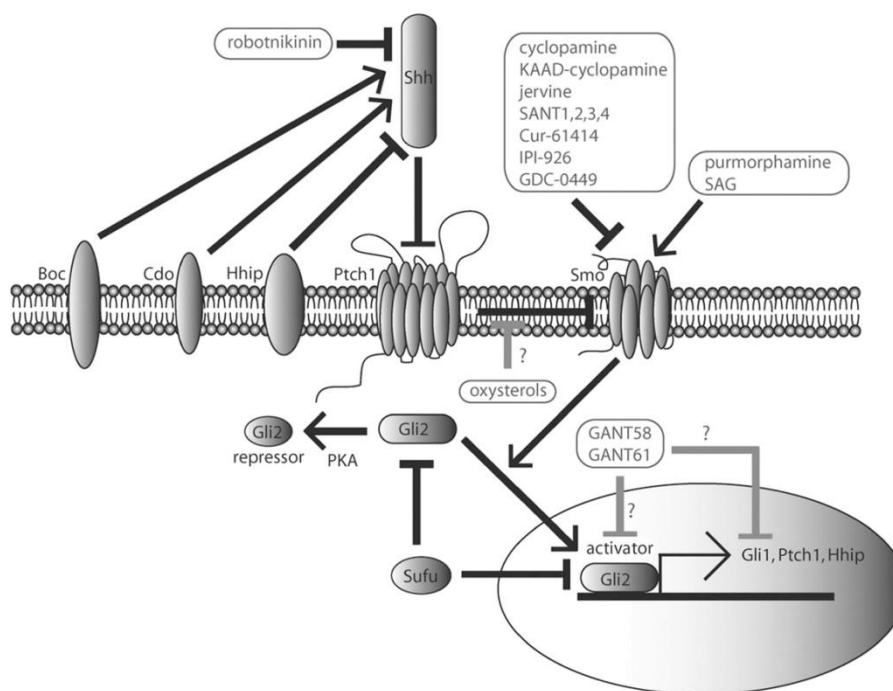
### **B. Régulateurs pharmacologiques**

Depuis l'année 2000, suite à la mise en évidence du rôle de la voie Hh dans diverses pathologie, en particulier le cancer, la recherche d'agonistes et d'antagonistes de cette voie s'est développée (Stanton and Peng, 2010) (**Fig. 13**). Aujourd'hui plus d'une dizaine de molécules ont été identifiées et certaines sont actuellement en essai clinique comme le GDC-0449.

#### *a. Agonistes*

Des activateurs naturels potentiels de la voie de signalisation Hh, tels que le cholestérol et certains oxystérols ont été caractérisés (Cooper et al., 2003).

Deux agonistes de synthèse, le SAG et la purmorphamine, se fixent directement sur le récepteur Smo, entraînant son activation via un changement de conformation protéique. Leur effet agoniste a principalement été caractérisé dans des cellules en culture telles que les fibroblastes et les cellules mésenchymateuses (Stanton and Peng, 2010).



**Figure 13 : Régulation de la signalisation Hh par les agents pharmacologiques (d'après (Stanton and Peng, 2010))**

### ***b. Antagonistes***

La cyclopamine et la jervine sont des molécules naturelles issues de *Veratrum californicum*. Les deux composants sont tératogènes, induisant l'holoprosencéphalie ou la cyclopie chez les progénitures des animaux qui ingèrent le *Veratrum californicum*. La cyclopamine est un alcaloïde ciblant le récepteur Smo. Sa fixation sur Smo induit un changement de conformation de la protéique qui devient inactive (Chen et al., 2002a). Cela conduit à l'inhibition de la voie de signalisation Hh et ainsi empêche la transcription des gènes Gli1, Gli2 et Ptch-1. Son IC<sub>50</sub> pour Smo est de 300 nmol/L. La KAAD-cyclopamine, un dérivé chimiquement modifié de la cyclopamine naturelle, possède une efficacité inhibitrice de Smo plus élevée avec un IC<sub>50</sub> de 20 nmol/L associée à une toxicité non spécifique moins importante.

La robotnikinine est un inhibiteur synthétique qui cible les protéines Hh. C'est un macrocycle à 12 chaînons qui se lie au N-Shh avec un K<sub>d</sub> de 3,1 µmol/L. Elle inhibe de manière dose-dépendante la transcription de la voie Gli induite par Shh dans différents types cellulaires, tels que la lignée mésenchymateuse C3H10T1/2 et les kératinocytes (Stanton et al., 2009).



Les "Smo Antagonists" 1, 2, 3 et 4 (SANT1, 2, 3 et 4) ont été criblés en tant qu'inhibiteurs de l'activation de Smo et conséquemment de la transduction de la voie Hh avec des IC<sub>50</sub> de 20 nmol/L, 30 nmol/L, 100 nmol/L et 200 nmol/L. (Chen et al., 2002b).

Par ailleurs d'autres inhibiteurs de Smo, dont les IC<sub>50</sub> pour l'inhibition de la voie Gli sont de l'ordre du nmol/L, font l'objectif d'essais cliniques (Low and de Sauvage, 2010): LDE 225 (Novartis Pharmaceuticals), le BMS-833923 ou XL-139 (Bristol-Myers Squibb), le PF-0449913 (Pfizer) et l'IPI-926 (Infinity). Le GDC-0449 (HhAntag691 ou Vismodegib, Genetech/Roche/Curis) a initialement été identifié par un criblage de molécules ayant une haute affinité au récepteur Smo. Il se lie directement au domaine extracellulaire de Smo et est un inhibiteur très sélectif de la voie de signalisation de Hh avec un IC<sub>50</sub> de 20 nmol/L pour la transcription Gli dépendante (Rudin, 2012). Cet inhibiteur fait l'objet d'un essai clinique phase I/II pour le traitement du carcinome baso-cellulaire et du médulloblastome. Récemment, de nouvelles molécules antagonistes de Smo ont été développées LDE-223 (Horn et al., 2012), AcTU 61, AcU 72 et AcG 86 (Solinas et al., 2012). Leur IC<sub>50</sub> sont comparables à celui de GDC-0449. Leur efficacité thérapeutique reste à mesurer.

Les "Gli Antagonists" 58 et 61 (GANT58 et GANT61) sont issus de différentes classes chimiques. Les deux fonctionnent en aval de Smo et Sufu et inhibent la transcription des gènes dépendants de Gli avec IC<sub>50</sub> de 5 µmol/L (Lauth et al., 2007).

## **5. Protéines Hh et fonctions cellulaires**

Les protéines Hh sont impliquées dans de multiples processus développementaux et post-nataux par leur action sur de nombreux types cellulaires en agissant sur les grandes fonctions cellulaires : prolifération, survie, migration et différenciation.

### **A. Prolifération**

Shh contrôle la prolifération de différents types cellulaires, tels que les cellules mésenchymateuses, les cellules épithéliales, les CML via la transcription Gli-dépendante. Elle agit sur l'expression de gènes cibles comme la cycline D1/rétinoblastome/E2F (Li et al., 2010a) ou la cycline D2/N/C-Myc (Mill et al., 2005) qui régulent la synthèse d'ADN, donc la prolifération cellulaire.

### **B. Survie**

Le rôle de la voie Shh dans la survie cellulaire a été principalement démontré par des études effectuées sur les cellules cancéreuses. Dans ces cellules il a été montré que

l'activation de la voie Gli favorise la survie des cellules en agissant sur l'expression de gènes anti-apoptotiques cibles de Gli comme Bcl-2 et caspase-3 pour le cancer pancréatique (Xu et al., 2009), la leucémie myéloïde chronique (Su et al., 2012) et pour des tumeurs du cerveau (Samarzija and Beard, 2012).

### **C. Migration**

Une activité chimiotactique de Shh a été mise en évidence sur quelques types cellulaires dont les cellules neuronales (Hammond et al., 2009), les monocytes/macrophages (Dunaeva et al., 2010; Schumacher et al., 2012), les cellules progénitrices endothéliales (EPC) (Palladino et al., 2011; Yamazaki et al., 2008), les oligodendrocytes (Merchan et al., 2007) et les cellules cancéreuses (Lu et al., 2012; Tang et al., 2012; Uchida et al., 2011; Wang et al., 2010b). Deux types de mécanismes ont été décrits :

- un mécanisme dépendant du facteur de transcription Gli1 qui active l'expression des facteurs pro-angiogénique, tels que le Cyr61 dans les cellules cancéreuses du sein (Harris et al., 2012), TGF- $\beta$  dans le carcinome gastrique (Yoo et al., 2008) et l'"Early Growth Response Protein 2" (EGR2) dans une lignée endothéliale;
- un mécanisme indépendant de la voie canonique Gli1 qui fait intervenir des acteurs de la signalisation : Rho dans les CE (Renault et al., 2010), Rac1 (Polizio et al., 2011) dans les fibroblastes 3T3, ERK1/2 dans le carcinome hépatocellulaire (Lu et al., 2012) et les métabolites arachidonates dans les cellules mésenchymateuses 10T1/2 (Bijlsma et al., 2007).

### **D. Maintien de l'état progéniteur cellulaire**

Chez l'adulte, Shh maintient des cellules progénitrices dans un état non-différencié, qui participe au renouvellement tissulaire. C'est le cas des populations progénitrices neurales (Ruat et al., 2011) et des cellules progénitrices des CML Sca1<sup>+</sup> (Passman et al., 2008).

### **E. Spécification/identité cellulaire/différenciation**

Shh via la voie Gli régule la spécification cellulaire. L'exemple le plus connu a été décrit chez les embryons au cours du développement du tube neural, dans lesquels différents facteurs de transcription sont activés en fonction de la concentration de Shh et génèrent les différents neurones. Son rôle dans la différenciation cellulaire a aussi été établi dans d'autres tissus : différenciation myoblastique dans le muscle (Gustafsson et al., 2002) ou des cellules hématopoïétiques dans la moëlle (Gao and Aifantis, 2009).

### III. PROTEINES HH ET DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE

Chez les embryons, les protéines Hh agissent sur le mésoderme dans l'interaction épithélium-mésenchyme qui est indispensable à la formation des membres, des poumons, de l'intestin, des follicules pileux et de l'os. Dans cette partie, sont successivement décrits les rôles de Shh, Ihh et Dhh dans le développement embryonnaire.

#### 1. Shh et développement embryonnaire

L'expression de Shh est largement distribuée durant le développement embryonnaire (Chiang et al., 1996; Pepicelli et al., 1998 ; St-Jacques et al., 1998). La délétion de Shh est létale à cause des multiples défauts qui apparaissent dès le début de la gestation (Chiang et al., 1996). De façon générale, la déficience totale en Shh entraîne des défauts précoces dans l'établissement des structures de la ligne médiane, telles que la notochorde et la plaque du plancher.

Globalement, Shh agit par son gradient de concentration, qui dirige la polarité tissulaire (détermination gauche/droite et identité des doigts), la spécification et le mouvement des cellules.

#### A. **Shh et polarité tissulaire**

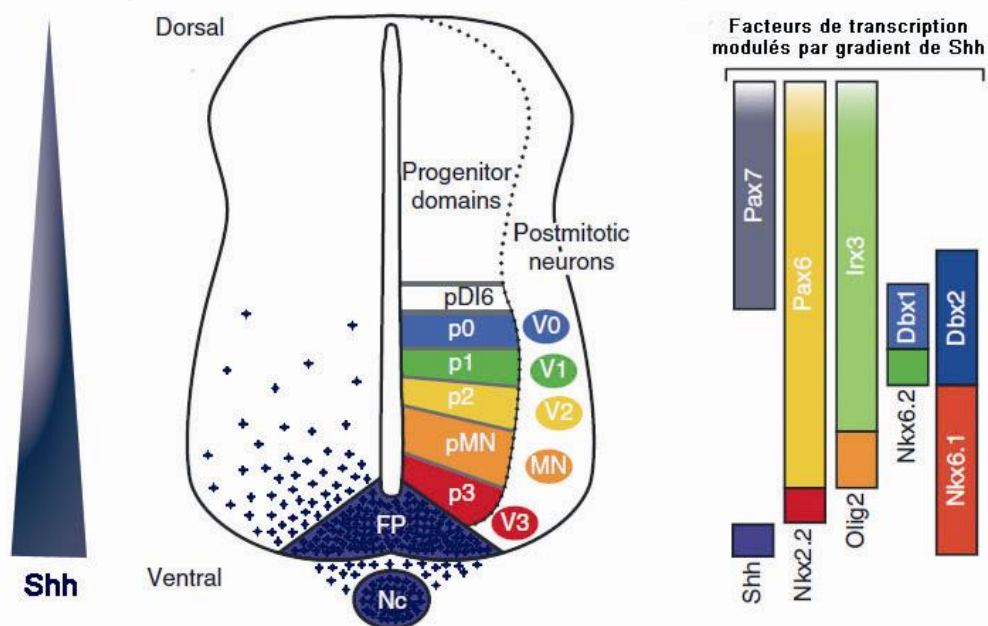
Shh est le meilleur exemple de morphogène défini par Lewis Wolpert en 1969 (Wolpert, 1969). Le gène Shh est exprimé dans la zone d'activité polarisante du bourgeon des membres qui est responsable de la mise en place du membre inférieur (Nagase et al., 2007). La protéine Shh diffuse du segment postérieur vers le segment antérieur dans les embryons, engendrant une polarité postéro-antérieure. La position des doigts est déterminée par le gradient de concentration de Shh. Shh est aussi un des premiers gènes décrits pour contribuer à la détermination gauche-droite. Dans les embryons de poulet, l'expression de Shh dans le nœud de Hensen régule positivement la transcription du gène Nodal, permettant l'identification du côté gauche. Les embryons murins Shh<sup>-/-</sup> possèdent de multiples défauts d'asymétrie gauche-droite dans le cœur, le poumon et la rotation axiale (Tsukui et al., 1999).

Chez l'Homme, l'holoprocéphalie non-syndromique est une pathologie qui se produit lorsque, par exemple au cours du développement embryonnaire, le cerveau ne se divise pas en deux hémisphères ou les yeux ne se forment pas correctement. Shh est le premier gène décrit pour induire le développement de l'holoprocéphalie. Les mutations de Shh (plus de 100 mutations connues) réduisent ou abolissent l'activité du morphogène. Sept

mutations de Ptch-1 et de Gli2 sont également impliquées dans cette pathologie (Mercier et al., 2010).

## B. Shh et spécification cellulaire dans le tube neural

La moelle épinière des vertébrés possède une topologie très organisée des différents types de neurones générés dans le tube neural. L'organisation spatiale des six domaines progéniteurs (FP, p3, pMN, p2, p1 et p0), s'établit le long de l'axe dorsoventral. Elle est engendrée par un gradient de la protéine Shh sécrétée dans la notochorde et la plaque du plancher (Nagase et al., 2007). L'expression des facteurs de transcription Nkx2.2, Olig2, Nkx6.1, Dbx2, Irx3, Pax6 et Pax7 dans les progéniteurs est régulée par les différences de concentrations en Shh (**Fig. 14**). Chaque domaine progéniteur exprime une combinaison unique de facteurs de transcription et est capable de générer un sous-type déterminé d'interneurones (V0-V3) ou de neurones moteurs (MN) (Ribes and Briscoe, 2009).

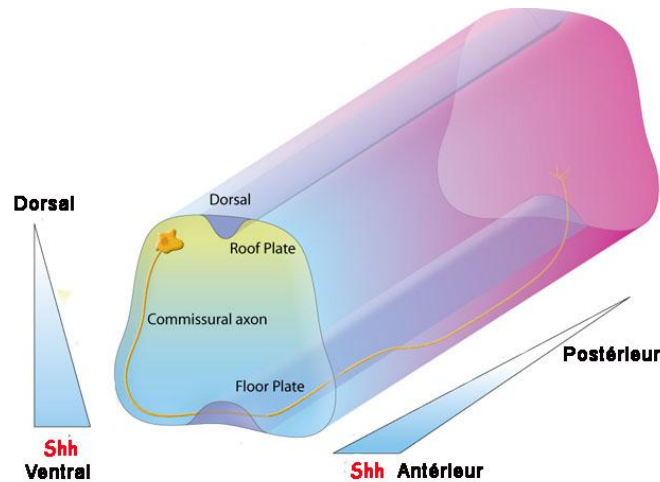


**Figure 14 : Rôle du gradient de Shh sur la spécification des neurones via l'induction des différents facteurs de transcription dans le tube neural** (Nc : notochorde ; FP : plaque du plancher, d'après (Ribes and Briscoe, 2009))

## C. Shh et guidance de l'axone commissural

Chez la souris, il a été démontré que les gradients de Shh dorso-ventral et antéro-postérieur pouvaient être considérés comme des signaux de guidance pour l'axone. Ces mécanismes sont en particulier bien décrits dans la revue de Sanchez-Camacho 2009 (Sanchez-Camacho and Bovolenta, 2009).

Les différents éléments de la voie Hh, Ptch-1, Smo, Boc, Hip et Gas1 sont tous impliqués dans la guidance de l'axone. Chez la souris, la guidance de l'axone commissural dans la moelle épinière vers la ligne médiane ventrale nécessite la production de Shh dans la plaque du plancher. L'inactivation de Smo et de Boc perturbe le déplacement de cet axone, indiquant que ces deux molécules sont nécessaires à l'attraction de l'axone vers la ligne médiane. Une fois que l'axone commissural a traversé la plaque du plancher, il longe l'axe longitudinal selon le gradient antéro-postérieur de Shh vers le cerveau (**Fig. 15**).



**Figure 15 : Représentation schématique des gradients de Shh impliqués dans la guidance d'axone (d'après (Sanchez-Camacho and Bovolenta, 2009))**

## **2. Ihh et développement embryonnaire**

Bien que l'expression d'Ihh soit plus restreinte que celle de Shh, plusieurs études récentes ont démontré des régions communes d'expressions de Shh et d'Ihh, tels que le nœud de Hensen et les somites. Les souris déficientes en Ihh ne survivent que jusqu'à la phase tardive de gestation, et présentent des défauts squelettiques et intestinaux (St-Jacques et al., 1999).

### **A. Ihh et développement des os**

Ihh est impliqué dans la formation des os; en effet, les éléments squelettiques ne s'ossifient pas chez les souris *Ihh*<sup>-/-</sup> (Chung et al., 2001). Durant le développement embryonnaire, Ihh est détecté dans les chondrocytes primaires favorisant ensuite leur propre différenciation en chondrocytes (pré-)hypertrophiques. L'expression d'Ihh est maintenue dans ces types cellulaires et régule effectivement la maturation d'ostéoblastes via les facteurs de transcriptions Runx2 et Osx.

## **B. Ihh et développement gastro-intestinal**

Le tractus gastro-intestinal se développe à partir de l'intestin embryonnaire, qui se compose d'un épithélium entouré de cellules d'origine du mésoderme. Ihh est exprimé dans l'endoderme intestinal tandis que les gènes ciblés par la voie Hh sont exprimés dans le mésenchyme. L'inactivation d'Ihh entraîne dans ce tissu, une réduction du muscle lisse, une absence de pancréas et une rotation intestinale incorrecte (Ramalho-Santos et al., 2000).

### **3. Dhh et développement embryonnaire**

Dhh est exprimé dans le nerf périphérique, le testicule et dans l'endothélium des gros vaisseaux durant le développement. La souris  $Dhh^{-/-}$  est viable, mais démontre un phénotype sexuel mâle récessif spécifique soit féminisé, soit masculinisé et possède des anomalies dans le système nerveux périphérique.

#### **A. Dhh et régulation de la lignée germinale mâle**

Les souris mâles mutées pour Dhh sont infertiles, la plupart du temps pseudohermaphrodites avec une ouverture vaginale aveugle (pour le phénotype féminisé) et une réduction de la masse testiculaire visible dès le stade E18,5 qui s'accroît jusqu'à l'âge adulte. Les testicules ne descendent pas et se trouvent alors logés dans des masses graisseuses à proximité des reins (Bitgood et al., 1996).

Le syndrome de Swyer (ou dysgenèse gonadique 46 XY) et la dysgenèse gonadique 46 XY partielle sont des pathologies induites respectivement par la présence de 2 et 1 copie(s) mutée(s) du gène codant pour Dhh dans chaque cellule. Ces mutations perturbent les processus de différenciation sexuelle mâle. Les patients atteints par ces mutations présentent des troubles du développement sexuel avec, dans le syndrome de Swyer, des personnes ayant une apparence de femme malgré un contenu chromosomique mâle et dans la dysgenèse partielle, des personnes avec un appareil génital pas clairement défini et des perturbations de l'appareil reproducteur.

#### **B. Dhh et système nerveux périphérique**

Dans le système nerveux périphérique, l'expression de Dhh a été mise en évidence par les cellules de Schwann. Dans les souris  $Dhh^{-/-}$ , le nerf sciatique ne possède pas d'épineurium et le périéurium est anormalement fin (Mirsky et al., 1999). Bien que les souris  $Dhh^{-/-}$  ne

présentent pas de difficulté pour se déplacer, la vitesse de conduction nerveuse est diminuée dans les fibres motrices, ce qui indique une neuropathie périphérique (Mirsky et al., 2002).

Chez l'homme, une mutation de Dhh sur l'exon 1 entraîne un défaut de conduction nerveuse et donc une neuropathie périphérique (Umehara et al., 2000).

#### IV. PROTEINES HH ET DEVELOPPEMENT VASCULAIRE

Le système vasculaire est le premier organe mis en place durant le développement. Il est indispensable à l'apport des nutriments et de l'oxygène nécessaires à la croissance des tissus. Les protéines Hh qui sont exprimées de façon très précoce dans l'organisme participent aussi au développement du système vasculaire via différents mécanismes : recrutement des cellules précurseurs, spécification artère-veine et maintien de l'intégrité de l'endothélium.

##### 1. Protéines Hh et mise en place du système vasculaire

Le rôle des protéines Hh dans le développement vasculaire provient d'observations faites chez le poisson zèbre muté sur des éléments de la voie Hh et qui présente un défaut de la vascularisation et de la circulation sanguine (Chen et al., 1996).

##### A. Ihh et formation du réseau vasculaire primitif du sac vitellin

Ihh joue un rôle important dans la formation du réseau vasculaire, le vitellin primitif (Byrd et al., 2002). Ihh est en effet exprimé dans l'endoderme viscéral qui est une source de signaux inducteurs de la morphogénèse vasculaire du sac vitellin (Dyer et al., 2001). Dans le sac vitellin des souris  $Ihh^{-/-}$  même si des îlots sanguins et le plexus capillaire primitif peuvent se former, les vaisseaux sont plus petits et moins bien organisés que dans les souris sauvages (St-Jacques et al., 1999). Ils restent cependant suffisants pour soutenir le développement jusqu'à E10,5 de la gestation. Par contre les embryons  $Smo^{-/-}$  présentent des anomalies plus sévères que celles des embryons  $Ihh^{-/-}$  et meurent plus précocement. La survie prolongée des embryons  $Ihh^{-/-}$  est probablement liée à une action compensatrice de Dhh qui est exprimé dans le mésoderme du sac vitellin (Farrington et al., 1997).

L'effet d'Ihh exprimé dans l'endoderme sur la formation du sac vitellin s'explique par l'activation du facteur de transcription "Forkhead transcription factor 1" (Foxf1) dans le mésoderme (Astorga and Carlsson, 2007). Ce dernier favorise l'expression de Bmp4 qui est cruciale pour la formation de tube vasculaire (**Fig. 16**).

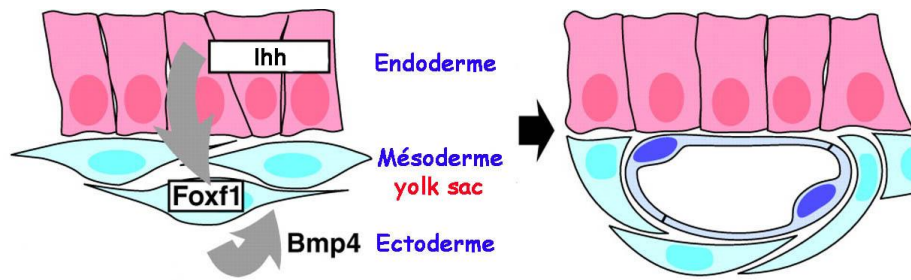


Figure 16: Schéma des relations entre les protéines **Hh**, **Foxf1** et **Bmp4** dans la formation du réseau vasculaire du sac vitellin (d'après (Astorga and Carlsson, 2007))

## B. Shh et formation de l'aorte dorsale

Un travail effectué sur les embryons de cailles met directement en évidence que le signal Shh provenant de l'endoderme est nécessaire et suffisant à la formation de l'aorte dorsale. Le traitement des embryons par la cycloamine entraîne la génération de tubes endothéliaux petits et interrompus, et l'accumulation d'angioblastes non assemblés se localisant dans les sites potentiels pour la formation de vaisseaux sanguins (Vokes et al., 2004). L'injection de 5E1, un anticorps bloquant dirigé contre Shh, provoque des anomalies vasculaires caractérisées par des hémorragies et des protrusions de la veine cardinale antérieure, une fusion retardée de l'aorte dorsale, des branchements réduits de l'artère carotide interne et un remodelage tardif des arcs aortiques branchiaux (Kolesova et al., 2008).

## C. Shh et formation des vaisseaux tissulaires

Malgré une expression plus importante de Shh que d'Ihh, les embryons des souris *Shh<sup>-/-</sup>* meurent plus tardivement que ceux des souris *Ihh<sup>-/-</sup>* probablement parce qu'Ihh intervient dans l'étape précoce du développement du sac vitellin tandis que Shh joue plutôt un rôle dans la formation des vaisseaux tissulaires.

Shh joue en particulier un rôle dans la formation du réseau vasculaire des poumons. Les poumons des embryons mutants pour Shh sont très peu vascularisés (Pepicelli et al., 1998) à cause d'un défaut de production des facteurs proangiogéniques induit par Shh. En particulier l'expression du VEGF dans l'épithélium pulmonaire (White et al., 2007) et d'Ang1 et de son récepteur Tie2 (van Tuyl et al., 2007) est réduite dans les poumons déficients en Shh.

Dans le cœur, l'expression abondante de Shh régulée par "Fibroblast Growth Factor" 9 (FGF9) au niveau épicaldial est essentielle au développement coronaire via l'induction de VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C et d'Ang2 (Lavine et al., 2006).



La surexpression locale de Shh au niveau de tube neural dorsal conduit à une hypervascularisation et une alimentation sanguine augmentée dans le neuroectoderme (Rowitch et al., 1999). Il a été également démontré que Shh est requis pour la croissance vasculaire dans le plexus choroïdien rhombencéphale (Nielsen and Dymecki, 2010).

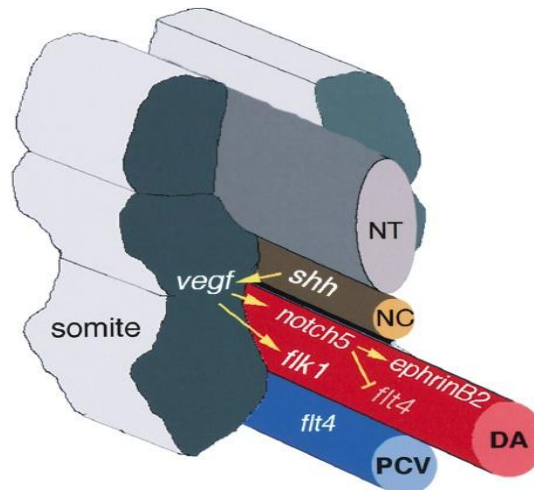
## 2. Protéines Hh et différenciation artère-veine

La signalisation des Hh joue un rôle dans la différenciation artère-veine. En particulier Shh via Smo est indispensable dans la régulation de la formation des vaisseaux artériels, particulièrement l'aorte dorsale.

### A. Shh et spécification de l'aorte dorsale

La formation de l'aorte dorsale se fait par recrutement de cellules "hemangioblast-like" depuis l'endoderme. La déficience en Shh chez le poisson zèbre conduit à des anomalies dans la formation de l'aorte dorsale bien que le développement initial des cellules "hemangioblast-like" soit normal. Ces anomalies résultent d'un défaut de différenciation des hémangioblastes en CE artérielles (Brown et al., 2000).

L'invalidation de Shh conduit à la formation d'un seul gros vaisseau qui n'exprime que des marqueurs veineux (*flt4*), mais pas artériels (*EphrinB2*), impliquant Shh dans la spécification artère-veine.



**Figure 17: Rôle de Shh dans la différenciation artère-veineuse chez le poisson zèbre :** NT : Tube Neural; NC : notochorde ; DA : Aorte Dorsale; PCV : Veine cardinale Postérieure (d'après (Lawson et al., 2002))

Shh est présent dans les structures médianes, particulièrement dans la notochorde, et intervient indirectement sur la signalisation locale de Notch5 dans l'artère dorsale via son effet inducteur du VEGF dans les somites. Le marqueur artériel EphrinB2 est ensuite régulé

positivement par le VEGF tandis que le marqueur veineux *flt4* est inhibé (Lawson et al., 2002) (Fig. 17).

## B. Shh et différenciation artère-veine dans le cœur

La voie de signalisation Hh est aussi impliquée dans la formation du réseau vasculaire cardiaque chez la souris. Elle est activée dans les cardiomyoblastes et contrôle le développement de la veine sub-épicardique exprimant l'EphrinB4. Ainsi, son activation dans les cellules périvasculaires dirige le développement des artères intramyocardiques exprimant l'EphrinB2 (Lavine et al., 2008b) (Fig. 18).

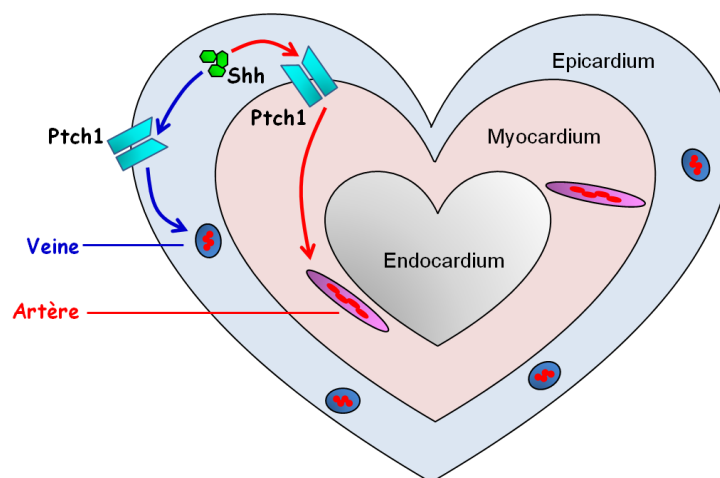


Figure 18 : Shh est impliqué dans le contrôle du développement artério-veineux dans le cœur des souris (d'après (Lavine et al., 2008b))

## C. Shh et différenciation artère-veine

La confirmation du rôle de la signalisation de Shh dans la différenciation artério-veineuse est apportée par l'étude sur la modulation de Smo. Les embryons *Smo*<sup>-/-</sup> possèdent en effet une expansion de la veine cardinale et une absence de l'aorte dorsale. Par contre, un agoniste de Smo entraîne une expansion des cellules artérielles concomitante à une réduction des cellules veineuses (Williams et al., 2010).

Ceci suggère que la réception d'un signal Shh par Smo est requise pour le devenir artériel des cellules vasculaires primitives qui contribue à la formation de l'aorte dorsale. En revanche, les cellules vasculaires soumises à une activité Shh réduite se différencient en cellules veineuses.

### **3. Protéines Hh et perméabilité de l'endothélium**

L'effet de la voie de signalisation Hh sur l'intégrité des vaisseaux a été d'abord démontré chez des embryons déficients en composants de la voie Hh, puis dans les cellules en culture.

En absence de Gli2, les vaisseaux cérébraux des embryons murins sont perméables (Berrios-Otero et al., 2009). Par ailleurs, la protéine Shh sécrétée par les astrocytes est le régulateur principal de l'intégrité de la barrière hémato-encéphalique (Alvarez et al., 2011). Chez les embryons, la déplétion de Smo dans les CE est associée à une augmentation importante de la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique, avec une expression réduite des partenaires des jonctions cellulaires (occludine, claudine-3, claudine-5 et ZO1) et l'extravasation de protéines sériques, d'immunoglobulines et d'apolipoprotéine B. Ces résultats ont été confirmés *in vitro* dans les CE dérivées de barrière hémato-encéphalique (Alvarez et al., 2011).

Au contraire, dans l'angiogenèse tumorale du mélanome, le fait que l'injection de cyclopamine diminue la perméabilité des vaisseaux tumoraux, met en évidence que la voie Hh est un régulateur positif de la perméabilité vasculaire (Li and Li, 2008).

## **V. EFFET DES PROTEINES HH ET LA VASCULARISATION CHEZ L'ADULTE**

Chez l'adulte dans les conditions physiologiques, le réseau vasculaire n'évolue pas et l'activité des protéines Hh est réduite. Cependant, il existe des cellules répondeuses aux protéines Hh. En effet l'analyse immunohistochimique d'aortes de souris Ptc1-LacZ (souris rapporteur de la réponse aux protéines Hh) met en évidence une réponse aux protéines Hh dans des CE, des cellules de la média (probablement des CML) et dans des fibroblastes périvasculaires (Pola et al., 2001). Le rôle de ces cellules n'est pas encore compris mais elles pourraient participer au renouvellement tissulaire.

### **1. Protéines Hh et pathologies postnatales**

L'expression des protéines Hh est augmentée dans des conditions pathologiques, telles que les cancers et les maladies ischémiques, avec une association importante avec des vaisseaux.

### **A. Protéines Hh et angiogenèse tumorale**

Outre l'effet inducteur de la voie Hh sur la croissance des tumeurs, des études récentes mettent en évidence que la signalisation Hh joue un rôle indirect sur l'angiogenèse tumorale (Geng et al., 2007 ; Li and Li, 2008). Shh favorise la production de facteurs proangiogéniques comme l'Ang1, l'"Insulin Growth Factor 1" (IGF-1), le VEGF-A, l'"Hepatocyte Growth Factor" (HGF) et le PDGF C (Chen et al., 2011) en particulier par des cellules pro-angiogéniques dérivées de la moelle (Nakamura et al., 2010), des cellules progénitrices endothéliales et par les fibroblastes.

De plus, Hip, le récepteur antagoniste des protéines Hh, est fortement exprimé dans les CE, et est régulé négativement dans les CE durant la tubulogenèse *in vitro*. Son expression est absente dans des tumeurs hypervascularisées (Olsen et al., 2004).

### **B. Protéines Hh et maladies ischémiques**

En conditions hypoxiques, Shh est surexprimé dans différents tissus, par exemple, la rate, le foie, le cerveau et le poumon (Bijlsma et al., 2009). Cette surexpression est sous la dépendance du facteur de transcription HIF-1 $\alpha$  (Hwang et al., 2008).

Chez les souris qui subissent une ischémie de la patte et donc une nécrose des fibres musculaires et des vaisseaux dans le muscle tibial antérieur, la protéine Shh produite par des cellules mésenchymateuses interstitielles participe à la réparation post-ischémique (Pola et al., 2003). Elle est aussi activée, après une lésion musculaire induite soit par une injection de cardiotoxine dans le muscle squelettique, soit par un écrasement mécanique local. L'inhibition de la voie de signalisation Hh (cyclophamide, anticorps bloquant) conduit à une diminution de la densité vasculaire, de la perfusion sanguine ainsi qu'à une réparation musculaire retardée (Straface et al., 2009) impliquant potentiellement la voie Hh dans ces différents processus.

### **C. Protéines Hh et angiogenèse rétinienne pathologique**

Le phénomène d'angiogenèse pathologique de la rétine se produit durant la vie postnatale suite à une lésion ou à un processus inflammatoire. L'inhibition pharmacologique de la voie Shh par la cyclophamide réduit significativement l'angiogenèse rétinienne post-natale en condition physiologique et inhibe la vascularisation induite par hypoxie. Elle engendre également une diminution de VEGF et de Ptch-1 (Surace et al., 2006). Ces résultats suggèrent donc que la signalisation Shh est activée au cours de la néovascularisation rétinienne et choroïdienne.

## **2. Effet thérapeutique proangiogénique des protéines Shh**

Le fait que Shh soit surexprimé et que sa signalisation soit activée dans différents modèles pathologiques d'angiogénèse suggère sa capacité thérapeutique potentielle. De plus il a été montré que Shh fonctionne comme un puissant stimulateur de la néovascularisation en modulant l'expression de deux groupes de facteurs angiogéniques, le VEGF et l'Ang1 (Pola et al., 2001). Son rôle thérapeutique a été exploré dans différents organes comme le cœur et le muscle squelettique.

### **A. Thérapie de l'infarctus du myocarde**

Après infarctus du myocarde, les solutions thérapeutiques pour aider le cœur à se réparer sont réduites en raison de la très faible capacité du cœur à se régénérer. Cependant des stratégies par thérapies géniques ou cellulaires ont été proposées afin de promouvoir le développement de vaisseaux sanguins collatéraux supplémentaires et ainsi limiter la mortalité des cardiomyocytes en atténuant l'ischémie cardiaque.

L'injection d'un plasmide codant pour Shh dans le modèle d'infarctus du myocarde diminue la taille de la nécrose et augmente la néovascularisation et la performance cardiaque en induisant notamment le recrutement d'EPC et en diminuant l'apoptose des cardiomyocytes (Kusano et al., 2005). Une stratégie de thérapie cellulaire par injection de cellules souches mésenchymateuses (MSC) surexprimant Shh améliore aussi leur survie et capacités angiogéniques dans les cœurs ischémiques du rat via la production d'"Inducible Nitric Oxide Synthase" (iNOS) et de nétrine-1 (Ahmed et al.).

### **B. Thérapie du muscle ischémique**

L'ischémie du membre inférieur est caractérisée par l'occlusion des artères qui alimentent en particulier le muscle. Cette occlusion est souvent la conséquence de l'athérosclérose, de la thrombose et de processus inflammatoires. L'ischémie périphérique du membre inférieur peut entraîner la claudication, l'ulcération de la peau et des douleurs intermittentes ou même permanentes. La prévalence de la maladie artérielle périphérique chez les personnes âgées qui ont plus de 55 ans est de 10-25%.

Dans le modèle d'ischémie de la patte chez la souris jeune, le muscle se régénère complètement en moins d'un mois. L'administration de protéines recombinantes Shh augmente la densité vasculaire, la couverture musculaire des vaisseaux, la perfusion sanguine et la vitesse de réparation du muscle ischémique (Pola et al., 2001). A l'opposé, l'addition de

cyclophosphamide diminue la perfusion sanguine, ralentit la réparation du muscle mais ne supprime pas l'augmentation de la densité vasculaire normale en réponse à l'ischémie. Shh apparaît donc comme une molécule capable d'induire la formation de vaisseaux mais aussi d'améliorer leur fonction (Benamer et al., 2010). Il a été suggéré que cet effet était lié à la stimulation du recrutement d'EPC qui produisent VEGF et Ang1 ainsi que SDF1- $\alpha$  (Palladino et al., 2011).

### **C. Thérapie de la neuropathie périphérique**

La neuropathie affecte des millions de personnes dans le monde entier, mais les mécanismes et les facteurs responsables de cette affection restent encore mal connus. Même si la perte de fonction des cellules nerveuses est évidente, la possibilité que la diminution des vasa nervorum puisse être aussi un facteur du développement de la neuropathie diabétique est suggérée par plusieurs études récentes. Une thérapie par un traitement systémique par Shh restaure le système vasculaire neural, et s'accompagne d'une augmentation de facteurs vasculaires et neurotroques (VEGF, Ang1 et " Brain-Derived Neurotrophic Factor " [BDNF]) ainsi que d'une récupération de la fonction nerveuse (Kusano et al., 2004). De plus cet effet de Shh sur la régénération nerveuse est favorisé par les estrogènes en régulant négativement l'expression de Hip, un récepteur antagoniste de la voie Shh (Sekiguchi et al., 2012).

### **D. Thérapie des ulcères**

Les ulcères de la peau sont fréquents chez les diabétiques et représentent un facteur aggravant augmentant le risque d'amputation. Chez le diabétique, les maladies macrovasculaires et microvasculaires, la neuropathie périphérique et une angiogenèse réduite ont été impliquées dans la survenue de ces ulcères.

La thérapie génique Shh au niveau de la peau chez les souris diabétiques (db/db) entraîne l'expression de gènes locaux (VEGF, Ang-1, Ang-2 et SDF-1 $\alpha$ ), une meilleure vascularisation des plaies via une augmentation du recrutement d'EPC et donc une accélération de la réparation des plaies (Asai et al., 2006).

### **E. Thérapie protectrice de l'endothélium**

Dans diverses conditions pathologiques, la perte de l'intégrité de l'endothélium constitue une phase majeure dans l'initiation des processus conduisant à la diminution du calibre artériel, voire à son occlusion (maladie athéroscléreuse, resténose après angioplastie). Il a été rapporté que dans ces conditions pathologiques, Shh est transporté par des

microparticules issues de cellules T activées ou apoptotiques (Martinez et al., 2006). L'injection de microparticules portant Shh dans les souris favorise la libération de NO, et par conséquent diminue la production d'espèces réactives de l'oxygène. La fonction de l'endothélium est améliorée et la dysfonction endothéliale après ischémie/reperfusion est réversée (Agouni et al., 2007).

### **3. Shh et fonction des CE vasculaires et des EPC en culture**

Dans un modèle d'infarctus du myocarde l'activation des gènes régulés par le facteur de transcription Gli1 est limitée aux cellules périvasculaires, aux fibroblastes interstitiels et aux cardiomyocytes (Kusano et al., 2005). Ceci suggère que soit les CE ne répondent pas à la stimulation de Shh, soit elles répondent à Shh via une voie non-canonique, c'est-à-dire, indépendante de Gli.

Shh induit la morphogenèse capillaire chez les CE de cerveau dans un modèle de tubulogenèse sur Matrigel. Cet effet est dépendant de l'activation de la voie PI3K, mais pas de la voie de transcription Gli1, même si la voie Gli est active dans ces cellules (Kanda et al., 2003). Le traitement de CE de type HUVEC par Shh induit la migration de ces cellules et la tubulogenèse en augmentant les expressions de l'OPN et de la MMP-9 via la voie non-canonique ROCK, tandis que la voie canonique Gli-dépendante n'est pas impliquée (Chinchilla et al., 2010; Renault et al., 2010).

Les cellules progénitrices endothéliales (EPC) issues de la moelle osseuse peuvent coloniser les sites de néovascularisation et peuvent ainsi se différencier en CE *in situ* durant la formation vasculaire post-natale et la régénération des vaisseaux. Shh est un stimulateur direct de la prolifération, de l'adhésion, de la migration et de la tubulogenèse des EPC via un mécanisme Gli1-dépendant (Asai et al., 2006).

## **VI. PROTEINES HH ET MATURATION-STABILISATION DES VAISSEAUX**

Bien que la maturation des vaisseaux soit une étape cruciale dans sa stabilisation et sa fonctionnalité, la majorité des études concernant le rôle de Shh dans la vascularisation chez les embryons et chez les adultes s'est focalisée sur les CE. La maturation du vaisseau comporte un ensemble complexe de phénomènes impliquant la prolifération, la migration et le recrutement de cellules murales. Le rôle de Shh sur ces cellules murales et son mécanisme d'action sont encore mal définis.

## **1. Expression des éléments de la voie Hh dans les cellules murales**

Le recrutement et la prolifération des cellules murales (CML et péricytes) sur les néovaisseaux permettent leur maturation, leur stabilisation et leur contractilité. Ces cellules murales sont une cible potentielle de la voie Hh. Elles possèdent en effet des récepteurs aux protéines Hh et la machinerie nécessaire à sa signalisation intracellulaire.

### **A. Dans les CML en culture**

Dans les CML d'artères pulmonaires humaines, de veines humaines et d'aortes de rat en culture, les récepteurs (Ptch-1 et Smo) et les facteurs de transcriptions (Gli1, Gli2 et Gli3) ont été détectés (Li et al., 2010a; Morrow et al., 2009). Dans les CML artérielles pulmonaires soumises à une hypoxie, Shh induit la transcription Gli1 (Wang et al., 2010a), tandis que Shh induit la transcription de Gli2 dans les CML de veines stimulées par le PDGF BB (Li et al., 2010a).

### **B. *in situ* et *in vivo***

L'utilisation de souris Ptch1-lacZ dans lesquelles on peut identifier les cellules dont la voie Hh est activée, a permis de démontrer qu'au cours de l'embryogenèse les CML (mais pas les CE) localisées dans le mésoderme sont la cible directe de Hh (Byrd et al., 2002). De plus, elle a aussi permis de montrer que les CML et les fibroblastes périvasculaires de l'aorte de souris adultes répondent à un signal Hh (Pola et al., 2001).

Chez la souris adulte, le récepteur Ptch-1 et le facteur de transcription Gli2 sont peu exprimés dans les CML de la carotide mais leur expression est fortement augmentée dans des conditions pathologiques après sa ligature (Morrow et al., 2009). Une expression de Shh, Ptch-1 et Gli2 est détectée dans les cellules  $\alpha$ -SMA<sup>+</sup> de l'intima de la veine jugulaire greffée dans l'aorte abdominale intra-rénale chez le rat (Li et al., 2010b).

Récemment, une étude a décrit pour la première fois la présence de la signalisation Hh dans les péricytes caractérisés par l'expression du marqueur NG2<sup>+</sup>. Dans le plexus choroïde, le Ptch-1, le Gli1 et le Gli2 sont détectés dans les péricytes autour des vaisseaux. En revanche, les CE ne sont pas répondeuses au Shh chez les mêmes souris (Nielsen and Dymecki, 2010).



## **2. Protéines Hh et maturation des vaisseaux *in vivo***

La bibliographie concernant un rôle potentiel des protéines Hh dans la maturation des vaisseaux et leur stabilisation est très limitée et ne se focalise que sur les vaisseaux recouverts de CML.

### **A. Etudes *in vitro***

Dans un modèle de formation de néovaisseaux de l'os (co-culture de CE et d'ostéoblastes), l'expression des marqueurs de CML (laminine,  $\alpha$ -SMA et desmine) et le dépôt de collagène IV caractéristique des vaisseaux matures sont augmentés en réponse à Shh ajouté dans le milieu de coculture (Dohle et al., 2011), signifiant que Shh favoriserait la différenciation des ostéoblastes en CML et par conséquent régulerait positivement la musculation des vaisseaux. Un autre argument suggère une action de Shh sur les CML matures. En effet Shh induit la survie et la prolifération des CML en condition hypoxique (Wang et al., 2010a) via Notch (Morrow et al., 2009) et Gli2/cycline D1/rétinoblastome (Li et al., 2010a).

### **B. Chez les embryons**

Dans les embryons des poissons zèbres, la mutation de la protéine daz-interacting protein 1 (dzip1) qui est impliquée dans l'induction de la voie Hh, entraîne une diminution d'Ang1 dans le mésenchyme périvasculaire. Cette diminution d'Ang1 conduit à un défaut du recrutement des cellules murales qui a pour conséquence une déstabilisation du vaisseau. De fait cette mutation est responsable de la diminution de la taille de l'aorte dorsale crânienne et d'hémorragies (Lamont et al., 2010).

Dans les embryons murins, l'inactivation d'Ihh dans les chondrocytes provoque une diminution du nombre de vaisseaux pourvus en cellules murales (Colnot et al., 2005).

### **C. Protéines Hh et musculation des vaisseaux chez les adultes**

#### ***a. Shh et maintien des progéniteurs des CML***

Les progéniteurs des CML identifiés en particulier dans l'adventice aortique, se caractérisent par l'expression du marqueur de cellules progénitrices Sca1<sup>+</sup>, par l'absence d'expression de marqueurs de CML matures  $\alpha$ -SMA, SM22, calponine, SM-MHC, et par présence des facteurs de transcription impliqués dans la différenciation en CML ("Serum

response factor" (SRF) et myocardine). Les cellules isolées et maintenues dans un milieu de différenciation perdent le marqueur Sca1<sup>+</sup> et se mettent à exprimer les marqueurs des CML matures. En conditions physiologiques, il a été montré que Shh est impliqué dans le maintien de l'état indifférencié des progéniteurs des CML caractérisé par leur expression de Sca1<sup>+</sup> dans l'adventice artérielle (Passman et al., 2008).

### ***b. Protéines Hh et recrutement des CML***

Un petits nombre d'études suggèrent un rôle de la voie Hh dans la maturation des vaisseaux. Ces études sont basées sur des observations de la taille des vaisseaux et de leur couverture par des cellules murales, en particulier les CML.

Dans un modèle d'angiogenèse de la cornée, Shh induit des vaisseaux plus larges en comparaison à un facteur angiogénique classique tel que le VEGF (Pola et al., 2001), suggérant un rôle du Shh dans l'organisation de la structure des vaisseaux. Le rôle de la voie Hh dans la muscularisation des vaisseaux (augmentation du nombre de vaisseaux recouverts de CML) a aussi été abordé par l'étude des effets de la surexpression ou de l'inhibition des éléments de la voie Hh chez la souris : *i*) la déplétion de Smo dans les CML vasculaires du cœur entraîne une diminution des vaisseaux muscularisés et par conséquent la mort du myocarde (Lavine et al., 2008a) ; *ii*) l'injection dans le cœur d'un plasmide codant pour Shh (Kusano et al., 2005) ou de cellules mésenchymateuses exprimant Shh (Ahmed et al.) promeut un accroissement du rapport vaisseaux recouverts de CML/vaisseaux sans CML; *iii*) le blocage de la voie Hh inhibe la muscularisation des vaisseaux tumoraux comme l'indique la diminution de l'expression des marqueurs  $\alpha$ -SMA et NG2 (Nakamura et al., 2010).

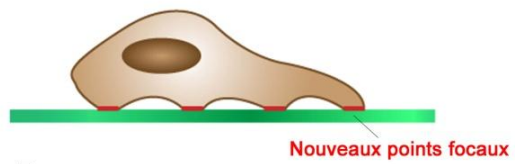
Les mécanismes de maturation des vaisseaux régulés par les protéines Hh endogènes sont inconnus. Il a été montré que les protéines Hh pouvaient induire l'activation du PDGFR $\beta$ , une signalisation majeure de la muscularisation et de la maturation des vaisseaux (Frontini et al., 2011). Par ailleurs, l'apport des protéines Hh exogène suggère que elles pourraient moduler la production de facteurs comme l'Ang1 ou le VEGF (Pola et al., 2001).



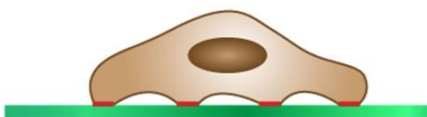
**A. Extension**



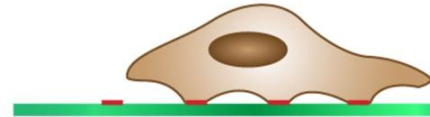
**B. Nouvelle adhésion**



**C. Translocation**



**D. Décollement**



Sens du déplacement

**Figure 19 : Différentes étapes de la migration cellulaire**

# CHAPITRE IV : MIGRATION DES CML VASCULAIRES

---

## I. MIGRATION CELLULAIRE

### 1. Étapes de la migration cellulaire

La migration cellulaire est un processus parfaitement régulé qui résulte d'une succession d'étapes bien distinctes. Les mécanismes impliqués ont été largement décrits en particulier dans la revue de Ridley (Ridley et al., 2003). Tout d'abord, la cellule acquiert un phénotype polarisé qui détermine l'avant et l'arrière de la cellule (**Fig. 19A**). En périphérie de la cellule, les filaments d'actine vont se polymériser pour aboutir à la formation de lamellipodes, puis les molécules intracellulaires nécessaires à la migration vont se distribuer de façon asymétrique. De nouveaux points focaux vont se former sur le front de migration (**Fig. 19B**): les intégrines reconnaissent leurs ligands dans la MEC, s'oligomérisent puis recrutent les protéines de la plaque d'adhérence, les kinases et les protéines liant l'actine. Finalement, l'actine s'y lie, ce qui forme un point d'ancrage du cytosquelette. Les MMP sont recrutées à l'avant de la cellule et vont dégrader la matrice environnante pour libérer l'espace pour la migration (**Fig. 19C**). En même temps, les points focaux situés à l'arrière de la cellule vont être détruits par clivage enzymatique utilisant des enzymes comme la calpaïne ou par diminution de l'affinité des intégrines pour la MEC (**Fig. 19D**). A l'avant de la cellule, les nouveaux points d'adhérence à la MEC vont permettre la polymérisation des filaments d'actine et de myosine qui vont générer des forces de traction permettant à la cellule d'avancer.

### 2. Types de migration cellulaire

On distingue 2 types de migration :

- le chimiotactisme, déplacement des cellules en réponse à un gradient de concentration d'une substance soluble. Dans certains cas, la cellule se déplace vers la région où la concentration des substrats est la plus élevée; c'est le chimiotactisme positif (attraction). Dans d'autres cas, la cellule migre vers la région où la concentration en substance est faible que l'on appelle chimiotactisme négatif (répulsion). Un gradient intracellulaire de phosphatidylinositol 1,4,5-triphosphate (PIP3) est établi et va permettre la polymérisation dirigée des filaments d'actine, qui mène à la formation de pseudopodes et au déplacement cellulaire (von Philipsborn and Bastmeyer, 2007);

<b>Cytokines et facteurs de croissance</b>	<b>Facteurs liés à la MEC</b>
Angiotensine II (Allen and Bayraktutan, 2008)	Ostéopontine (Li et al., 2007)
FGF-2 (Camozzi et al., 2005)	Fibronectine (Nelson et al., 1996)
HB-EGF (Elenius et al., 1997)	Laminine (Nelson et al., 1996)
IGF-1 (Duan, 2003)	Vitronectine (Brown et al., 1994)
IL-1 $\beta$ (Issa et al., 2006)	Thrombospondine (Yabkowitz et al., 1993)
IL-6 (Lee et al., 2005)	
PDGF BB (Ucuzian et al., 2010)	
TGF $\beta$ -1 (Koyama et al., 1990)	
TNF $\alpha$ (Wang et al., 2001a)	
Thrombine (Noda-Heiny and Sobel, 1995)	
VEGF, PlGF (Wang et al., 2001b)	
Platelet-activating-Factor (Stengel et al., 2006)	
Cyr61 (Grzeszkiewicz et al., 2002)	<b>Autres</b>
Endothéline-1 (Meoli and White, 2011)	Thrombospondine (Moura et al., 2007)
Nétrine-1 (Fan et al., 2008)	ATP, UTP (Jalvy et al., 2007a)
Neuropiline-1 (Pellet-Many et al., 2011)	Norepinephrine (Kalyankrishna and Malik, 2003)
NGF (Kraemer et al., 1999)	Glucose (He et al., 2012)
BDNF (Dagnell et al., 2007)	Histamine (Miyazawa et al., 1998)
NT-3 (Dagnell et al., 2007)	Sérotonine (Day et al., 2006)
Prorénine (Greco et al., 2012)	S1P (Harvey et al., 2010)
Chemokine-like factor 1 (Xuan et al., 2009)	Nicotine (Stein et al., 2010)
CCL 1, 11, 19 (Kaur et al., 2006)	Testostérone (Chignalia et al., 2012)
MCP-1 (Fougerat et al., 2012)	
SDF-1 $\alpha$ (Shibata et al., 2012)	

**Tableau 4 : Principaux agents chimiotactiques pour les CML vasculaires**

- la chimiokinèse, un processus de migration cellulaire au hasard exercé en réponse à une stimulation de la cellule. Contrairement au chimiotactisme, les mouvements associés ne sont pas orientés (Zigmond et al., 2001).

## II. INDUCTEURS DE LA MIGRATION DES CML VASCULAIRES

Il existe de nombreuses molécules promigratoires et antimigratoires pour les CML vasculaires : les nucléotides (Jalvy et al., 2007a), les facteurs de croissance (Sato et al., 1991), les cytokines (Rabkin, 2009) et les composants de la MEC (Johnson et al., 2011a). Des facteurs physiques, notamment le flux sanguin, la contrainte de cisaillement et la rigidité de la MEC (Li et al., 2003 ; Peyton and Putnam, 2005; Ward et al., 2001 ), influencent aussi la migration des CML vasculaires (**Tab. 4**).

### 1. Facteurs chimiotactiques pour les CML

Le PDGF BB est un stimulus promigratoire de référence pour les CML, tandis que l'isoforme PDGF AA est antimigratoire (Koyama et al., 1992). La signalisation promigratoire induite par le PDGF BB a été détaillée dans le chapitre II. Le PDGF BB promeut aussi l'activation d'autres facteurs et cytokines qui vont venir compléter l'action du PDGF BB. Ainsi, le PDGF BB induit directement la synthèse d'"Epidermal Growth Factor -2" (EGF-2), de FGF-2 (Pintucci et al., 2005), d'ostéopontine (Jalvy et al., 2007b) et de MCP-1 (Fougerat et al., 2012) qui confortent la migration des CML.

Dans l'organisme, la migration cellulaire n'est vraisemblablement pas dirigée par un seul stimulus et l'expression spatio-temporelle des différents facteurs fait intervenir des effets cumulatifs ou synergiques pour la migration des CML.

Certains facteurs ont un rôle synergique dans la migration des CML avec le PDGF BB, comme les protéines de la MEC (fibronectine, laminine, collagène I ou IV) (Nelson et al., 1997), l'insuline (Golovchenko et al., 2003), le facteur de coagulation VII (FVII) (Siegbahn et al., 2008) et l'endothéline-1 (Kohno et al., 1998). Le mécanisme de la synergie n'est pas très bien connu, mais pourrait être associé à une activation par les différents facteurs de voies de signalisation indépendantes ou au renforcement de voies de signalisation communes comme cela a été montré par la transactivation du PDGFR $\beta$  lorsque le FVII et PDGF BB sont associés pour induire la migration (Siegbahn et al., 2008).

## 2. Facteurs chimiokinétiques pour les CML

Bien que la chimiokinèse soit un évènement très important pour la motilité des cellules inflammatoires, cet aspect spécifique a été peu étudié dans les CML. Même si nombre de facteurs chimiotactiques possèdent aussi une activité chimiokinétique, cette activité n'a été caractérisée que pour quelques molécules, notamment des agents inflammatoires (**Tab. 5**) :

Facteur	Type cellulaire	Référence
Leukotriene B4	CM bronchique	(Watanabe et al., 2009)
IL-13	CM bronchique	(Parameswaran et al., 2007)
human serum amyloid A protein (SAA)	CML aortique	(Kumon et al., 2002)
PDGF BB	CML vasculaire	(Zhang et al., 2002)
Soluble heparin-binding peptide	CML vasculaire	(Chon and Chaikof, 2001)
MCP-1	CML vasculaire	(Streblov et al., 1999)
RANTES	CML vasculaire	(Streblov et al., 1999)
sulfated polymer of $\beta$ -cyclodextrin	CML vasculaire	(Bachinsky et al., 1995)
platelet activating factor	CML vasculaire	(Bussolino et al., 1995)

**Tableau 5 : Quelques agents participant à la chimiokinèse des CML**

## III. ACTEURS DIRECTS DE LA MIGRATION DES CML

La migration de la CML fait intervenir l'interaction de la cellule avec sa matrice environnante et la réorganisation de son cytosquelette par l'activation des récepteurs de type intégrines, des kinases, des protéines de la plaque d'adhérence, des protéines liées au cytosquelette et des MMP.

### 1. Les intégrines

Les intégrines sont une superfamille de protéines membranaires composée de deux chaînes peptidiques, une chaîne  $\alpha$  et une chaîne  $\beta$  réunies par des liaisons non covalentes. Les protéines de la MEC vont se lier aux intégrines via des motifs spécifiques dont le motif "arginine-glycine-acide aspartique" ou RGD (Slepian et al., 1998), permettant l'activation des voies de signalisation participant à la migration cellulaire.

### 2. Les protéines de la plaque d'adhérence

Les intégrines recrutent diverses molécules pour faire le lien avec le cytosquelette d'actine. Ce sont les protéines de la plaque d'adhérence telles que la vinculine, la taline, la paxilline et l' $\alpha$ -actinine. L'affinité, le recrutement, la localisation des intégrines et des



protéines de la plaque d'adhérence peuvent être modifiés par phosphorylation (Gerthoffer, 2007). Pour cela, diverses kinases sont retrouvées au niveau des points focaux d'adhésion.

### **3. Les kinases associées et les petites protéines G**

Les principales kinases de régulation sont : FAK, Src, ILK (Integrin-linked kinase), PI3K.

La "Focal Adhesion Kinase" (FAK) a été identifiée comme un substrat de tyrosine kinases dans des cellules transformées avec l'oncogène v-src. Son caractère essentiel a été démontré chez les souris FAK<sup>-/-</sup> qui ne sont pas viables et meurent durant les phases embryonnaires. La FAK permet d'intégrer les signaux du PDGF BB ou de l'EGF et des intégrines pour promouvoir la migration. Lors d'activation des intégrines, la FAK s'autophosphoryle sur la tyrosine 397 permettant la phosphorylation de la tyrosine 577 par Src (Tilghman et al., 2005). Il s'ensuit une cascade d'activation des MAPK et/ou de la PI3K (Mitra et al., 2005) que seront décrites en détail dans la partie suivante.

L' "Integrin-Linked Kinase" (ILK) a tout d'abord été découverte comme étant liée au domaine intracellulaire de l'intégrine  $\beta 1$ . L'activation d'ILK influence plusieurs composants de la signalisation dont le principal est la FAK (Ho and Bendeck, 2009).

Les petites protéines G, Rho, Rac, cdc42 et RhoG sont des régulateurs centraux de la protrusion cellulaire. Par exemple, Rac et cdc42 agissent au niveau des protéines de la famille "Wiskott-Aldrich Syndrome Protein" (WASP) qui régulent la polymérisation d'actine dans le lamellipode (Ridley et al., 2003).

### **4. Le cytosquelette**

Les points focaux assurent la liaison au cytosquelette d'actine. On y retrouve donc, les filaments d'actine et des protéines qui en régulent la structure et l'organisation. Ces protéines incluent des protéines de coiffe, de polymérisation et de branchement de l'actine. Par exemple, plusieurs protéines telles que la profiline, la cortactine et l' $\alpha$ -actinine, liant l'actine régulent la polymérisation d'actine en régulant le pool de monomères disponibles. L'actine corticale est composée d'un réseau dynamique qui permet la formation de structures telles que les filipodes et lamellipodes (Gerthoffer, 2007).

## 5. Les MMP

L'engagement des intégrines et des autres récepteurs conduit au recrutement à la surface cellulaire de protéases responsables de la dégradation de la MEC : les MMP. La famille des MMP comporte plus de 25 membres qui sont des protéases dépendantes du zinc. La dégradation de la MEC permet ainsi à la cellule de pouvoir progresser mais aussi permet la libération de facteurs séquestrés dans la matrice. L'importance des MMP dans ces phénomènes de migration a été démontrée par l'utilisation d'inhibiteurs synthétiques des MMP qui inhibent la migration des CML *in vitro* et réduisent en particulier l'épaississement intimal chez l'animal, phénomène qui implique une intense migration des CML (Xu et al., 2012).

## IV. VOIES DE TRANSDUCTION IMPLIQUEES DANS LA MIGRATION DES CML

La migration des CML est régulée par de multiples voies de signalisation dirigées notamment par les récepteurs RTK et RCPG (d'après revue (Gerthoffer, 2007)). Les acteurs clés sont des petites protéines G, des kinases dépendantes du  $Ca^{++}$ , ROCK, PI3K et MAPK (Fig. 20), conduisant la polymérisation des actines et amenant les CML dans un état migratoire.

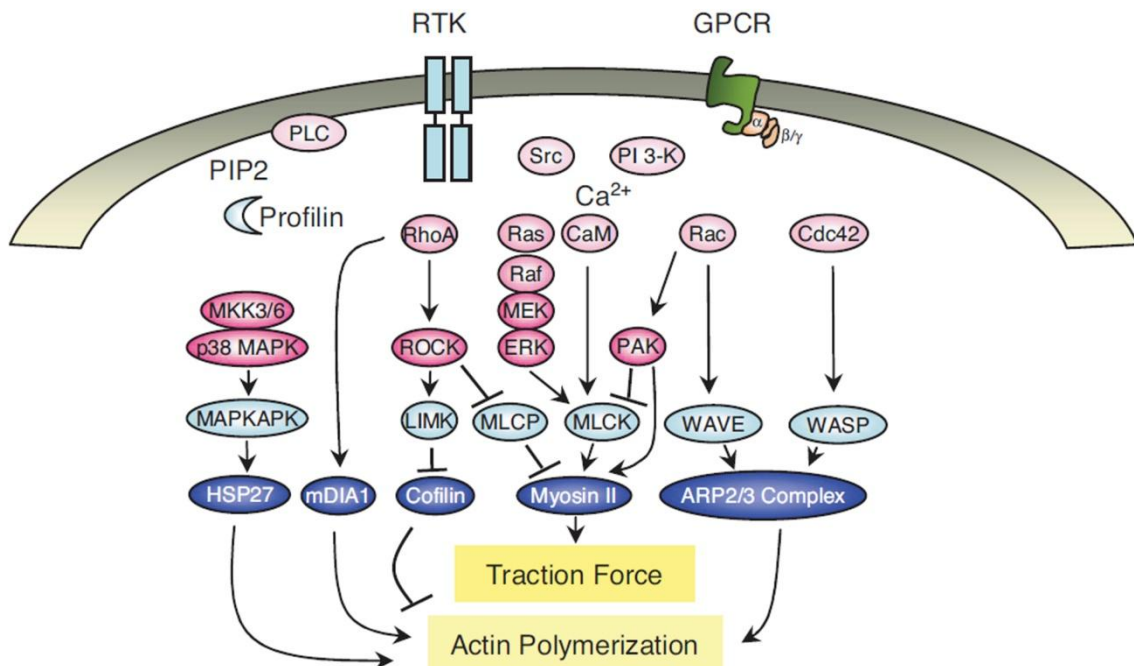


Figure 20 : Signalisations contrôlant la migration des CML après activation des RTK et des RCPG (d'après revue (Gerthoffer, 2007))

### **1. Petites protéines G et ROCK**

Les RTK et les RCPG activent les petites protéines G via la régulation de GTPases, allumant des kinases en aval qui phosphorylent les protéines régulatrices de l'actine et des microtubules. Par exemple, la petite protéine G RhoA, active ROCK1 et ROCK2 dans les CML, conduisant à une diminution de l'activité de la phosphatase de la chaîne légère de myosine (MLCP), sensibilisant ainsi le système contractile au calcium et contribuant significativement à la migration des CML. De plus, l'activation des ROCK phosphoryle la LIM kinase (régulateur positif de la polymérisation du cytosquelette d'actine) (Gorovoy et al., 2005) et au contraire bloque l'activité de la cofiline qui déstabilise la polymérisation d'actine (Pfaendtner et al., 2010).

### **2. Famille Src**

La Src est une tyrosine kinase qui est activée par les RTK et les RCPG dans les CML. L'activité de Src n'est pas nécessaire pour l'adhésion cellulaire, mais est indispensable à la migration et au chimiotaxisme des CML (Yamboliev et al., 2001). Elle est activée de manière très précoce après une stimulation de la cellule, et joue un rôle directeur dans la régulation des MAPK ERK et de la FAK.

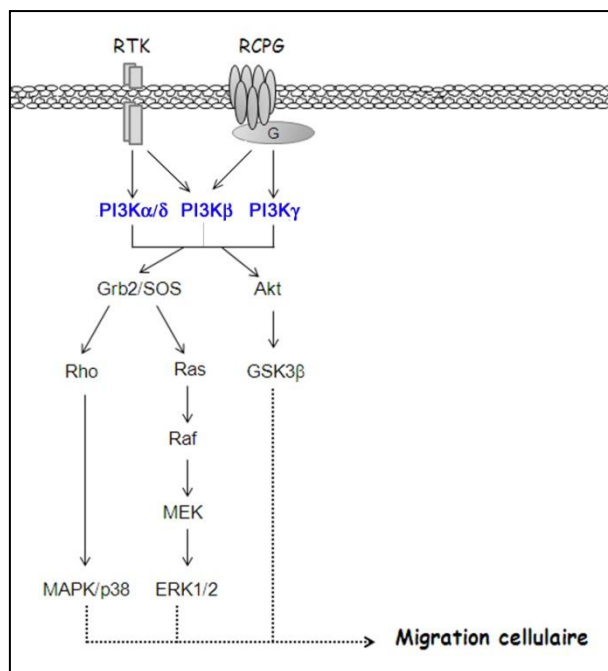
### **3. PI3K**

Les PI3K sont des acteurs proximaux des voies de signalisation, qui contrôlent de nombreuses fonctions cellulaires telles que la prolifération, la survie et la motilité.

Il existe trois classes de PI3K : les classes I, II et III. Leurs classifications sont basées sur leurs structures protéiques. La classe IA comprend la PI3K $\alpha$ , la PI3K $\beta$  et la PI3K $\delta$ . Elles sont composées d'une sous-unité régulatrice et d'une sous-unité catalytique, respectivement p110 $\alpha$ , p110 $\beta$  et p110 $\delta$  qui est, elle, associée indirectement avec la partie cytoplasmique du RTK et; la classe IB (PI3K $\gamma$ ) est composée d'une sous-unité catalytique p110 $\gamma$  et d'une sous-unité régulatrice p101/p84. Elle est activée par les RCPG. En dépit de cette classification, la PI3K $\beta$  peut elle aussi être activée par les RCPG (Murga et al., 2000). Dans les CML, ces deux classes phosphorylent le phosphatidylinositol activant plusieurs cascades de signalisation impliquées dans la migration des CML, comme les voies AKT/GSK3 $\beta$  et les voies MAPK ERK1/2 et p38 (**Fig. 21**).

La classe II (C2 $\alpha$ , C2 $\beta$  et C2 $\gamma$ ), au contraire de la classe I, ne comprend pas de sous-unités régulatrices. La PI3K-C2 $\alpha$  des CE joue un rôle crucial dans l'angiogenèse post-

ischémique (Yoshioka et al., 2012). Elle est aussi présente dans les CML vasculaires et participe à la contractilité de ces cellules via un mécanisme  $Ca^{2+}$ -dépendant (Wang et al., 2006). La PI3K de la classe III est formée d'une sous-unité catalytique (Vps34) et d'une sous-unité régulatrice. Il a été montré qu'elle est impliquée dans les processus immunitaires (Jaber et al., 2012; Willinger and Flavell, 2012), cependant son rôle dans les CML n'a pas été étudié.



**Figure 21 : Signalisations de la voie PI3K induite par les RTK et les RCPG**

De nombreuses d'études démontrent l'implication des PI3K $\alpha/\beta/\delta$  dans la migration des CML par des facteurs activant les RTK, tels que le PDGF BB, l'EGF et le FGF2. Le rôle de la PI3K $\gamma$  dans la migration des CML est plus mal connu. Cependant, deux études mettent en évidence l'intervention de la PI3K $\gamma$  dans l'induction de la migration des CML par le S1P (Roztocil et al., 2009) et le MCP-1 (Fougerat et al., 2012). Les inducteurs de la migration des autres types cellulaires impliquant la PI3K $\gamma$  sont listés dans le **Tableau 6**.

<b>Facteur</b>	<b>Type cellulaire</b>	<b>Référence</b>
Platelet-activating factor (PAF)	Eosinophile	(Hasan et al., 2010)
SDF1- $\alpha$	Neutrophile	(Chen et al., 2008)
MCP-1	Macrophage	(Jones et al., 2003)
Colony stimulating factor (CSF-1)	Macrophage	(Jones et al., 2003)
N-formyl-met-leu-phe	Neutrophile	(Hannigan et al., 2002)
Agoniste purinergique	Cardiomyocyte	(Bony et al., 2001)

**Tableau 6 : Facteurs impliqués dans la migration cellulaire via la PI3K $\gamma$**

#### 4. MAPK

Le rôle des MAPK ERK1/2, de la MAPK p38 et de la MAPK JNK dans la migration des CML a été démontré majoritairement à l'aide de leurs inhibiteurs sélectifs.

Bien que la plupart des facteurs listés dans le tableau 4 activent ERK1/2 et que ces kinases soient essentielles à la migration des CML, le mécanisme expliquant comment les ERK1/2 promeuvent la migration des CML n'est pas bien défini. Les acteurs régulés potentiellement par ERK1/2 sont la I-caldesmonne (Yamboliev and Gerthoffer, 2001) liée à l'actine, la MLCK (Goldman et al., 2007), la FAK et la calpaïne. A long terme, les ERK1/2 contrôlent la transcription des facteurs promigratoires, des protéines de la MEC et des MMP (Sharony et al., 2006).

La signalisation MAPK p38/MK2/HSP27 (Hedges et al., 1999) est aussi nécessaire à la migration des cellules vasculaires, y compris des CE et des CML. Elle est stimulée par de multiples stimulus, tels que le PDGF BB, le S1P, l'angiotensine II et la thrombine. Hormis l'effet sur la transcription des facteurs inflammatoires (IL-1 $\beta$  et IL-6) (Hedges et al., 2000) et du collagène impliqués dans la migration des CML, le mécanisme en aval est peu connu.

#### V. MIGRATION CELLULAIRE IN VITRO ET RECRUTEMENT CELLULAIRE IN VIVO

Aujourd'hui il existe un consensus pour dire que la migration des cellules murales est un évènement essentiel pour leur recrutement sur les néovaisseaux en formation. Cependant, aujourd'hui, la plupart des études sur la migration de ces cellules sont basées sur des expériences *in vitro* et l'observation de la migration des cellules *in vivo* lors du recrutement sur les vaisseaux reste encore à démontrer.

L'implication des facteurs promigratoires, des récepteurs, des kinases, des MMP et du cytosquelette est particulièrement étudiée par des modèles 2D *in vitro*. Récemment, il a été mis en évidence que le mécanisme de la migration est différent dans un modèles 3D (Fraley et al., 2010) que celui en 2D. En conséquence, l'étude des mécanismes de la migration *in vivo*, notamment la migration des cellules murales lors de la maturation des vaisseaux, reste encore à parfaire.



## **OBJECTIFS DE L'ETUDE**





L'obstruction des vaisseaux responsable de l'ischémie tissulaire dans différents territoires périphériques, cardiaques et cérébraux, en fait la deuxième cause de morbidité/mortalité en France. Notre activité de recherche dans l'unité INSERM 1034 (adaptation cardiovasculaire à l'ischémie) à PESSAC est ciblée sur une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires mis en jeu pour protéger le muscle de l'ischémie.

L'un des mécanismes d'adaptation à l'ischémie est la formation de néovaisseaux qui vont permettre d'irriguer à nouveau les territoires ischémiques. Cette néoangiogenèse comporte une étape cruciale qui va permettre la fonctionnalité et la stabilisation des vaisseaux sanguins : **la maturation des vaisseaux.**

Cette maturation des vaisseaux inclut un processus majeur : **le recrutement des cellules murales (péricytes et cellules musculaires lisses) sur les néovaisseaux.** Ce processus fait intervenir la migration, la prolifération, l'adhésion et la différenciation de ces cellules. Mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la maturation des vaisseaux, et en particulier le recrutement des cellules murales, est donc un pré-requis pour espérer améliorer le traitement des pathologies ischémiques.

Ma recherche s'inscrit dans le cadre de l'étude des mécanismes du recrutement des cellules murales sur les néovaisseaux sanguins, étape essentielle pour la stabilisation et la maturation des vaisseaux générés au cours de l'angiogenèse post-ischémique.

Plusieurs données récentes mettent en évidence le rôle des protéines Hh et de leur voie de signalisation dans le développement vasculaire et la néovascularisation postnatale (Lawson et al., 2002 ; Pola et al., 2003; Vokes et al., 2004 ). De plus, il a été observé qu'après infarctus du myocarde le traitement par Shh permettait d'augmenter la proportion de vaisseaux muscularisés par rapport aux vaisseaux totaux (Kusano et al., 2005), suggérant que cette protéine est potentiellement impliquée dans le processus de recrutement des cellules murales et par conséquent dans la maturation, la stabilité et la fonctionnalité de ces néovaisseaux. Cependant, le rôle de Shh dans le processus de recrutement des cellules murales n'a pas été spécifiquement démontré et les mécanismes d'action de Shh n'ont pas été étudiés, laissant en suspens plusieurs questions. Shh est-il modulé lors de la néovascularisation post-ischémique et quelle est son origine tissulaire? Quelle est l'origine de Shh : CE ou autre origine? Agit-il directement ou indirectement sur la migration et le recrutement des cellules murales ? Agit-il

seul, en synergie ou en complémentarité avec d'autres facteurs? Les autres protéines Hh jouent-ils le même rôle?

Afin de répondre à ces interrogations, nous avons envisagé deux approches :

- une approche *in vitro*, essentiellement sur des CML en culture, afin d'aborder le problème du rôle des protéines Hh dans la migration des CML ;
- une approche *in vivo*, faisant appel à l'angiogenèse expérimentale de la cornée de souris, afin de vérifier si les mécanismes mis en évidence *in vitro* et impliquant les protéines Hh, pouvaient être effectifs lors de la néovascularisation *in vivo*.

Dans notre travail, l'approche *in vitro* a pour objectifs :

- de mettre en évidence l'implication de la voie Hh dans la migration des CML induite par les milieux conditionnés par les CE ou un facteur sécrété par les CE et chimiotactique pour les CML, le PDGF BB ;
- de définir quelle protéine Hh est impliquée dans cette action ;
- d'identifier la cellule productrice des protéines Hh, CE ou CML ;
- de déterminer les voies de transduction de la signalisation Hh impliquées dans la migration des CML et leur complémentarité avec celles du PDGF BB.

L'approche *in vivo* a pour objectifs :

- de mettre en évidence le rôle de la voie Hh dans le recrutement des cellules murales au cours de l'angiogenèse induite par le VEGF ;
- d'identifier la protéine Hh impliquée dans cette action ;
- de déterminer comment et par quelles cellules Shh est produit ;
- de déterminer le lien entre les protéines Hh et PDGF BB dans le recrutement des cellules murales ;
- de démontrer le rôle de la voie Hh dans la stabilisation des néovaisseaux.

## **MATERIELS ET METHODES**



# CHAPITRE I : *IN VITRO*

---

## I. CULTURE CELLULAIRE

Toutes les cellules sont cultivées à 37°C dans un incubateur avec 5% CO<sub>2</sub> / 95% air. Dans tous les milieux sont ajoutés de la pénicilline (50 U/mL), de la streptomycine (50 µg/mL) et de l'HEPES (25 mmol/L).

### 1. Culture des cellules vasculaires

#### A. Cellules endothéliales en monocouche

Les CE utilisées, les HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) sont fournies par la société PromoCell GmbH (Heidelberg, Allemagne) et sont cultivées sur plastique (Falcon) recouvert de gélatine, dans le milieu EBM2 supplémenté avec un cocktail de facteurs de croissance (**Tab. 7**) commercialisé par cette même société (appelé ECGM 2). A confluence, les HUVEC sont décollées par un mélange trypsine-EDTA (GIBCO) et la suspension cellulaire est centrifugée (7 mn à 1,200 g). Le culot cellulaire est repris dans le milieu ECGM et les cellules sont ensuite réensemencées à densité plus faible (1/4). Le milieu de culture est changé tous les 2 jours. Pour les expérimentations les cellules sont utilisées entre le 2<sup>ème</sup> et le 6<sup>ème</sup> passage.

Facteur	Concentration	Facteur	Concentration
Fetal Calf Serum	2%	Basic Fibroblast Factor	10 ng/mL
Epidermal Growth Factor	5,0 ng/mL	R3 IGF-1	20 ng/mL
Hydrocortison	0,2 mg/mL	Ascorbic Acid	1 mg/mL
Vascular Endothelial Growth Factor	0,5 ng/mL	Heparine	22,5 mg/mL

**Tableau 7 : Concentrations finales des facteurs ajoutés au milieu de culture ECGM**

#### B. CML d'aorte de rat

Les cultures de CML d'aorte de rat utilisées dans les différentes expérimentations sont des cellules commercialisées par la société Lonza (R-ASM-580, Suisse) et sont cultivées dans du milieu DMEM :F12 (1 :1) contenant 20% de SVF (sérum de veau fœtal). Ces cellules sont utilisées entre les 2<sup>ème</sup> et 12<sup>ème</sup> passages.

### 2. Culture des lignées cellulaires

Les fibroblastes embryonnaires de souris NIH/3T3 (CRL-1658, ATCC) sont cultivés dans un milieu DMEM (Gibco) à 4,5 g/L de glucose supplémenté de 10% de SVF.

Rétrovirus	Description
Adénovirus-Shh (Ad-Shh)	Forme longue de Shh
Adénovirus-Ctrl (Ad-Ctrl)	
Lentivirus-Shh (LV-Shh)	Forme courte sécrétée de Shh
Lentivirus-Ctrl (LV-GFP)	
Lentivirus-Gli3Nter (LV-Gli3Nter)	

**Tableau 8 : Liste des adénovirus et des lentivirus utilisés**

siShh	Séquence
siA	5'-GGGAAGAUCUCCAGAAACU-3'
siB	5'-GGUGUAAGGACAAGUUGAA-3'
siC	5'-GAACUCCGAGCGAUUUA-3'

**Tableau 9 : Séquence des siRNA dirigés contre la Shh de rat**

	Nom	Fournisseur	Action
Activateurs	Shh	R & D	Agoniste Ptc
	Ihh	R & D	Agoniste Ptc
	Dhh	R & D	Agoniste Ptc
	PDGF BB	R & D	Agoniste PDGFR
Inhibiteurs	5E1	Developmental Studies Hybridoma Bank (DSHB)	Anticorps bloquant Hh
	Cyclopamine	Sigma	Inhibiteur Smo
	SANT2	Alexis	Inhibiteur Smo
	GANT58	Tocris Biosciences	Inhibiteur Gli1
	GANT61	Alexis	Inhibiteur Gli1
	Wortmannin	Santa Cruz	Inhibiteur PI3K ubiquitaire
	AS-252424	Santa Cruz	Inhibiteur PI3K $\gamma$
U0126	Promega	Inhibiteur MEK 1/2	

**Tableau 10: Liste des inhibiteurs et agonistes pharmacologiques utilisés**

## II. TRAITEMENT DES CELLULES

### 1. Transduction par les lentivirus et adénovirus

Les CML sont transduites par des lentivirus construits à la Plateforme de Vectorologie de Bordeaux II (50 MOI/cellule) et des adénovirus (Genopôle, Evry, France) (**Tab. 8**), par incubation de 24 heures avec les particules virales dans du milieu de croissance riche en sérum. Les cellules transduites sont ensuite entretenues dans le milieu de culture de croissance et les efficacités de transduction sont vérifiées par Western Blot en utilisant des anticorps spécifiques.

### 2. Transfection par siRNA

Une stratégie d'inactivation génique par « ARN interférence » a été développée pour inhiber les produits des gènes ciblés. Cette inhibition repose sur le fait qu'un ARN double brin (siRNA), spécifique d'une séquence ARNm donnée, va être pris en charge par le complexe cellulaire RISC (RNA-induced silencing complex). Ce complexe ARN/RISC va s'associer à la cible ARNm et va catalyser la dégradation de l'ARNm complémentaire, entraînant une diminution de l'expression du gène ciblé. Trois duplex ARN ont été testés pour le Shh de rat. Ces siRNA ont été choisis et synthétisés par Eurogentec (Liège, Belgique) ; leur séquence est décrite dans le **Tableau 9**. Un siRNA contrôle (SR-CL000-005, Eurogentec) défini par le fournisseur et dirigé contre une séquence non-transcrite a été utilisé.

$2.10^5$  cellules sontensemencées à faible intensité dans une plaque de 6 puits et sont incubées pendant 4 heures avec une solution contenant 4 $\mu$ L d'INTERFERin, 30 nmol/L de siRNA et 200  $\mu$ L d'optiMEM (Gibco) dans un volume final de 2,2 mL de milieu de culture. Les cellules sont ensuite lavées et mises dans leur milieu de culture pendant 24 heures. Les taux d'extinction de l'expression du gène cible sont vérifiés par analyse par qPCR.

### 3. Substances pharmacologiques

Les substances qui ont été utilisées comme activateurs ou inhibiteurs de certaines voies de signalisation sont résumées dans le **Tableau 10**.

### III. TESTS DE MIGRATION DES CML

#### 1. Migration par chimiotactisme

La migration des CML est étudiée à l'aide du système Transwell (Falcon) constitué d'une membrane en polycarbonate perforée de pores de 8  $\mu\text{m}$  de diamètre. Les CML sont mises en quiescence dans du milieu sans sérum pendant 24 heures, détachées par la trypsine.  $6,5 \cdot 10^4$  CML contenues dans 250  $\mu\text{L}$  de milieu sans SVF sontensemencées dans le Transwell qui est suspendu dans un puits d'une plaque 24 puits contenant 750  $\mu\text{L}$  de milieu contrôle contenant ou non la substance à tester, ou de milieu conditionné par d'autres cellules. Les cellules sont ensuite incubées dans l'incubateur à 37°C.

La migration est arrêtée 6 h après l'ensemencement des CML. Les cellules n'ayant pas migré sont éliminées en grattant la partie supérieure du filtre avec un coton-tige. Les cellules ayant migré et adhéré sur la face inférieure de la membrane sont fixées au méthanol absolu, puis colorées à l'hémalum. Le comptage s'effectue sur 9 champs de microscope (grossissement x10). Trois Transwells sont utilisés pour chaque série et l'expérimentation est reproduite 3 fois.

#### 2. Migration non directionnelle évaluée par vidéo-microscopie

Pour suivre la migration non directionnelle des CML en vidéo microscopie, les cellules sontensemencées à faible densité (40 000 cellules/ $\text{cm}^2$ ) dans des puits de lames Labtek à 4 compartiments. 24 h après l'ensemencement, les cellules sont privées de sérum pendant 24 h et placées sous un microscope inversé Zeiss dans une chambre à 37°C, maintenue à 5% de  $\text{CO}_2$ . Une série d'images est alors acquise toutes les 30 min, pendant 12 h, à l'objectif 10x et en contraste de phase, afin d'étudier le déplacement des cellules. La distance parcourue et la tortuosité du parcours sont déterminées à l'aide du logiciel Axiovision (Zeiss).

### IV. QUANTIFICATION DES ARNm PAR RT-PCR QUANTITATIVE

#### 1. Extraction des ARN totaux

L'extraction des ARNm totaux est réalisée à partir de cellules en monocouche cultivées sur plastique ou de tissus prélevés chez la souris.



Les cellules sont lysés dans 1 mL de TRI Reagent (Molecular Research Center Inc.). Les tissus murins fraîchement prélevés sont broyés dans 1 mL de TRI Reagent à l'aide d'un broyeur à billes (Qiagen) pendant 3 min.

Dans les 2 cas, les ARN totaux sont ensuite extraits selon les instructions du fournisseur. Brièvement, l'addition de chloroforme (200 µL pour 1 mL de TRI Reagent) suivie d'une centrifugation (15 min, 12,000 g, 4°C) permet la séparation de la phase aqueuse contenant les ARN, de l'interface et de la phase organique contenant les ADN et les protéines. La phase aqueuse est transférée dans un autre tube et les ARN sont précipités par addition de 500 µL d'isopropanol (VWR, Prolabo) et de 2 µL de Glycogène (Fermentas) et collectés par centrifugation (15 min, 12 000 g, 4°C). Le culot final d'ARN, est lavé 2 fois dans l'éthanol 70%, puis est dissout dans 12 µL d'eau distillée et la concentration des ARN de la solution est déterminée par mesure de l'absorbance à 260 nm (1 unité de DO correspond à 40 µg/mL d'ARN). Afin de contrôler la qualité des ARN extraits, les rapports A260nm/A280nm et A260nm/A230nm sont examinés. Les ARN ainsi obtenus sont conservés à -80°C.

## **2. Transcription inverse**

La transcription inverse est réalisée à partir de 1 µg d'ARN totaux. Les ARN totaux sont incubés avec 20 pmol d'amorce oligo-dT, du tampon de réaction (5X), 20 nmol de dNTP et 40 unités d'inhibiteur des ribonucléases en présence de 200 unités de M-MLV (Murine-Moloney Leukemia Virus) transcriptase inverse (Invitrogen) dans un volume final de 20 µL. Après incubation d'une heure à 37°C, la réaction est stoppée à 70°C pendant 15 min. Les ADNc synthétisés sont soit stockés à -20°C, soit utilisés directement pour l'amplification par PCR.

## **3. Réactions de polymérisation en chaîne (PCR) classique et en temps réel**

La réaction de PCR classique est réalisée dans un volume de 25 µL contenant 1 µL de l'ADNc synthétisé, 2,5 µL de tampon de réaction 10X (Promega), 1,5 µL de MgCl<sub>2</sub> 25 mol/L, 4 µL de dNTP (1,25 mol/L chacun), 1,25 µL de chaque amorce 20 µmol/L (sens et antisens) et 1,25 U de Taq polymérase (Promega). L'amplification se déroule dans un thermocycleur Techne Progene selon un programme comportant une étape de dénaturation 3 min à 94°C, puis des cycles d'amplification (18 cycles pour Ptch1 et Smo et 26 cycles pour Gli1, Gli2 et Gli3) composés de 30 sec de dénaturation à 94°C, de 30 sec d'hybridation à 60°C et de 30 sec d'élongation à 72°C et enfin une étape d'élongation finale à 72°C pendant 7 min. Les produits

d'amplification sont séparés sur gel d'agarose 2% en tampon TAE 1X (Tris 40 mmol/L, acétate 40 mmol/L, EDTA 2 mmol/L, pH 8,5) puis visualisés sous UV après coloration par le bromure d'éthidium. Les couples d'amorces utilisés sont présentés dans le **Tableau 11**.

La PCR quantitative en temps réel est effectuée dans un volume de 15  $\mu$ L contenant l'ADNc (correspondant à 0,05  $\mu$ g d'ARN), 7,5  $\mu$ L d'IQTM SYBER Green Supermix (BIO-RAD), 1  $\mu$ L de chaque amorce à 2,25  $\mu$ mol/L. Chaque test est réalisé en triple. L'amplification de l'ADNc d'un gène de ménage ( $\beta$ -actine ou GAPDH) permet de vérifier l'homogénéité des échantillons. Les séquences des amorces utilisées en fonction de différents gènes étudiés sont présentées dans le **Tableau 11**.

Espèce	Facteur	Sens 5'-3'	antisens 5'-3'
<b>Homme</b>	PDGF BB	TTAAGAAGGCCACGGTGACG	TCCAAGGGTCTCCTTCAGTG
	Shh	CAGTTTATCCCAATGTGGC	GCCAAAGCGTTCAACTTGTC
	Ihh	ATTCCATCCATCTTAGGCC	TGTGTCTTGAGGAGTGTGGC
	Dhh	CTACGCGGTTCTGGAGAGTC	TTCGAGGTTTCTATGCCTGG
	$\beta$ -actine	GGAGGAGCTGGAAGCAGCC	GCTGTGCTACGTCGCCCTG
<b>Rat</b>	Shh	TGGTGGCCCTTGCTTCCTCG	CCCTTCATATCGGCCGCTGG
	Ihh	CGTGCCGAGAAGACCCTG	CTGGTTCATGACAGAGATGGC
	Dhh	AGGATGAGGAGAACAGCGGC	GGTCAGACGTGGTGATGTCC
	Ptch-1	AAGGCTACTGGCCGAAAGC	CTTCTCCTATCTTCTGGCGGG
	Smo	GCAGTTCCTCGGCTGCCTC	AGCCTCCATTAGGTTAGTGCG
	Gli1	CAGCTCAAAGCTCAGCTCCT	ATGCAAAGCCAGATCCAAAC
	Gli2	CACACCCGCAACACCAAGC	GAGAAGTATGGGGAGATGCC
	Gli3	ATCATGGACTCGACCATTTC	GACTGTGTGCCATTTCTATG
Nétrine-1	GACTGTGACTCCTACTGCAAG	CGAACGGATCCACAAACTCTG	
	OPN	CAGTCGATGTCCCTGACGG	GTTGCTGTCTGATCAGAGG
	Cyr61	GTGCGTCTTGTGGACAACC	GCATCTTCACGGTCTGGTC
	PDGFR $\beta$	TCTGTCCTTACTACTGCTGTG	CAGGCTCTGCTTGC GGCTC
	$\beta$ -actine	CTTCTTGACGCTCCTCCGTC	CCTTCTGACCCATAACCACC
<b>Souris</b>	Shh	GTCGAGCAGTGGACATCACC	GAAACAGCCGCCGATTGG
	Ihh	TGTCAAGTCTGAGCATTCGG	GTCTCGATGACCTGGAAAGC
	Dhh	CTTGACATCACCACGTCTG	ATGTAGTTCCTCAGCCCCT
	PDGF BB	TCTTCCTTCTCTGCTGCTACC	CCCCATCTTCATCTACGGAGTCTC
	$\beta$ -actine	GGAGGAAGAGGATGCGGCA	GAAGCTGTGCTATGTTGCTCTA

**Tableau 11: Liste d'amorces utilisées pour la PCR**

## V. DETECTION DES PROTEINES

### 1. Western blot

Les cellules en culture sont lavées en PBS puis lysées dans du tampon de Leamml 1X (Tris HCl 31,3 mmol/L pH 6,8, SDS 1%, glycérol 10%,  $\beta$ -mercaptoéthanol 0,72 mol/L, bleu

de bromophénol 0,1 mg/mL). Les milieux conditionnés sont dilués au 1/2 dans la solution de Laemmli 2X.

Après dénaturation des échantillons 5 min à 95°C, les protéines sont séparées par électrophorèse en gel dénaturant SDS-PAGE (acrylamide/bisacrylamide 37/1 10%, SDS 0,1%, Tris-HCl 0,375 mol/L, pH 8,8, persulfate d'ammonium 0,1%, TEMED 0,05%) pendant une heure à 30 mA/gel dans un appareil Bio-Rad Mini Protean, puis transférées sur membrane PVDF Immobilon P (Millipore) dans du tampon de transfert (Tris 25 mmol/L, glycine 200 mmol/L, éthanol 20% (v/v), pH 8) sous un courant de 300 mA pendant 1 heure. Après saturation dans du TBS-Tween (Tris 50 mmol/L, NaCl 250 mmol/L, Tween 20 0,1%) contenant 5% de lait écrémé en poudre, les membranes sont incubées à +4°C avec l'anticorps primaire (**Tab. 12**) dilué dans le TBS-Tween contenant 1% de lait ou dans TBS-Tween comprenant 5% de BSA (Albumine Sérique Bovine) pour l'anticorps dirigé contre la forme phosphorylée d'Akt, pendant une nuit. Les membranes sont ensuite lavées 3 fois 5 min dans du TBS-Tween puis incubées 1 heure à température ambiante avec l'anticorps secondaire anti-IgG de l'espèce appropriée couplé à un fluorochrome (**Tab. 12**).

La révélation des protéines ciblées est réalisée par détection de la fluorescence de l'anticorps secondaire à l'aide d'un imageur infrarouge de type ODYSSEY (Li-Cor).

Antigène	Fournisseur	Dilution
p-ERK	Cell signaling	1/500
ERK total	Cell signaling	1/500
p-Akt	Cell signaling	1/500
Akt total	Cell signaling	1/500
N-Hh (H160)	Santa Cruz	1/200
p-PDGFR $\beta$ Try597	Santa Cruz	1/200
p-PDGFR $\beta$ Try751	Santa Cruz	1/200
PDGFR $\beta$ total	Santa Cruz	1/200
p-intégrine $\beta$ 3 Tyr773	invitrogen	1/200
Intégrine $\beta$ 3 total	Santa Cruz	1/200
p-FAK 397	Cell signaling	1/500
p-FAK 925	Cell signaling	1/500
FAK total	Cell signaling	1/500
Gli3	R&D	1/100
$\alpha$ -tubuline	Sigma	1/1000
Cyr61	Santa cruz	1/200
IgG-chèvre- DyLight 800	Li-Cor	1/5000
IgG-lapin-Alexa 700	Invitrogen	1/5000
IgG-souris-DyLight 680	Li-Cor	1/5000

**Tableau 12 : Anticorps utilisés en Western Blot**

## **2. Identifications des protéines par "Antibody Array"**

Les milieux conditionnés par les CE (HUVEC) sont récupérés et additionnés d'inhibiteurs de protéases (aprotinine 1 mmol/L, leupeptine 10 µg/mL et AEBSF 1 mmol/L). La détermination des niveaux relatifs de protéines angiogéniques présentes est réalisée par Antibody Array (collection d'anticorps déposés en spot sur une membrane) en utilisant le kit "Human Angiogenesis Array Kit" (R&D systems). Ce panel d'anticorps est capable de détecter simultanément 55 protéines impliquées dans le processus angiogénique. Les différents milieux testés sont incubés avec un cocktail d'anticorps biotinylés dirigés contre les 55 facteurs du test. Les mélanges échantillon/anticorps sont incubés ensuite avec la membrane d'"antibody array". La détection est effectuée par un complexe streptavidine-HRP par chimioluminescence.

## **3. "Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay" (ELISA)**

Le milieu conditionné par les CML est récupéré et supplémenté en inhibiteurs de protéases (10 µg/mL d'aprotinine, 10 µg/mL de leupeptine et 10 µg/mL de pepstatine).

Les CML sont lavées et lysées au froid sur glace dans une solution contenant 1% de NP-40, 20 mmol/L de Tris-HCl (pH 8,0), 137 mmol/L de NaCl, 10% de glycérol, 2 mmol/L d'EDTA et des inhibiteurs de protéases. Les débris cellulaires sont ensuite éliminés par centrifugation à 3 000 g pendant 10 min. Les concentrations de la protéine Shh présente dans les cellules et dans le milieu de culture conditionné sont mesurées à l'aide du kit ELISA "Mouse Sonic Hedgehog N-Terminus Quantikine" (R&D Systems) selon les recommandations du fournisseur. Ce kit validé par le fournisseur est recommandé pour la reconnaissance aussi bien de la protéine Shh de souris que celle de rat.

## **4. Immunocytochimie**

Pour l'immunofluorescence, les cellules sont cultivées dans des puits de lames Labtek à 4 ou 8 compartiments (Labtek-II system, Nalge Nunc International Corp.). Les cellules sont ensuite fixées au PFA 2% pendant 10 min et perméabilisées au Triton X-100 0,2% pendant 2 min. Après 3 lavages au PBS, la saturation des sites non spécifiques est réalisée avec une solution de PBS contenant 5% de BSA pendant 30 min. Les cellules sont ensuite incubées toute la nuit à 4°C avec l'anticorps primaire, dilué dans une solution de PBS/BSA. Après 3 lavages au PBS, une incubation avec l'anticorps secondaire biotinylé est effectuée à température ambiante pendant 1 h. Après lavage, le traitement des préparations avec un

fluorochrome conjugué à la streptavidine permet de visualiser la localisation des protéines ciblées. Les anticorps utilisés sont répertoriés dans le **Tableau 13**.

Antigène	Fournisseur	Dilution
5E1	Developmental Studies Hybridoma Bank (DSHB)	1/50
BrdU	OxfordBiotechnology	1/100
CD31	BMA	1/100
NG2	Millipore	1/200
PDGF BB	Santa Cruz	1/50
Shh (C-terminal)	R & D	1/50
IgG-chèvre-Alexa488	Invitrogen	1/200
IgG-souris-Alexa488	Invitrogen	1/200
IgG-lapin-Alexa568	Invitrogen	1/200
IgG-lapin-Alexa488	Invitrogen	1/200
IgG-rat-Alexa568	Invitrogen	1/200

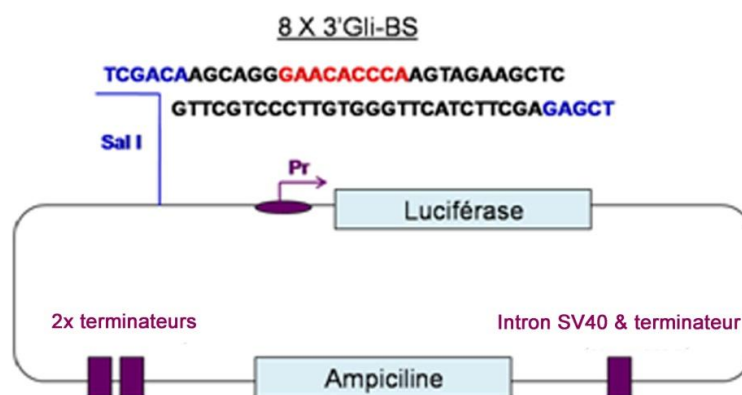
**Tableau 13 : Anticorps utilisés en immunohistochimie**

## 5. Mesure de l'activité d'un gène rapporteur

### A. Plasmides

#### a. *8X3'Gli-BS $\delta$ 51LucII*

Une séquence nucléotidique contenant 8 fois la séquence consensus du site de liaison de Gli a été clonée dans le plasmide p $\delta$ 51 LucII (RIKEN, Suita, Japon (Sasaki et al., 1997)) (**Fig. 22**). Ce plasmide permet d'évaluer la production et l'activité de Gli.



**Figure 22 : Organisation du plasmide 8X3'Gli-BS $\delta$ 51LucII**

### ***b. pHook LacZ***

Ce plasmide commercialisé par Invitrogen et codant pour le gène de la  $\beta$ -galactosidase, permet de normaliser les activités luciférase afin de s'affranchir des inégalités d'efficacité de transfection entre les différents échantillons.

## **B. Transfection des cellules et mesure de l'activité du gène rapporteur**

Les cellules sont cotransfectées par le plasmide rapporteur et le plasmide pHookLacZ portant le gène de la  $\beta$ -galactosidase. Pratiquement, les cellules sontensemencées dans des plaques 24 puits à raison de  $4 \cdot 10^4$  cellules par puits et maintenues pendant 24 heures à 37°C dans du DMEM:F12 à 20% de SVF. La transfection est réalisée en présence de JetPrime (Polyplus Transfection) selon les recommandations du fournisseur avec 0,375  $\mu$ g d'ADN plasmidique et 10,75  $\mu$ L de JetPrime par puits pendant 4 heures. Les cellules sont ensuite cultivées dans leur milieu de culture respectif pendant la nuit, puis sont mises en quiescence dans du milieu sans sérum pendant 24 h avant stimulation.

Au terme de la stimulation, les extraits cellulaires sont préparés par lyse des cellules dans 100  $\mu$ L de "Protein Lysis Buffer" (Promega).

L'activité luciférase est déterminée par chimioluminescence : l'émission de photons générée lors de l'oxydation de la luciférine en présence d'ATP et d'O<sub>2</sub> est mesurée dans un luminomètre (Tecan infinite F200 pro), immédiatement après avoir ajouté 50  $\mu$ L de réactif "Luciferase Assay Reagent" (Promega) à 5  $\mu$ L d'extrait cellulaire.

L'activité  $\beta$ -galactosidase est déterminée par une spectrophotométrie (Tecan infinite F200 pro): 50  $\mu$ L d'extrait cellulaire préalablement chauffés 10 minutes à 50°C sont incubés avec 50  $\mu$ L de substrat (ONPG 1,33 mg/mL, NaHPO<sub>4</sub> 0,2 mol/L, pH 7,3 MgCl<sub>2</sub> 2 mmol/L,  $\beta$ -mercaptoéthanol 100 mmol/L) à 37°C à l'obscurité toute la nuit. La réaction est arrêtée par addition de 150  $\mu$ L de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1 mol/L et la DO est lue à 420 nm.

L'activité luciférase relative correspond au ratio de l'activité luciférase sur la DO à 420 nm.

## CHAPITRE II : *IN VIVO*

### I. LES ANIMAUX

Deux lignées de souris ont été utilisées : les souris C3HeB/FeJ (Jackson Laboratories) et les souris PDGF B-Cre-ER<sup>T2/+</sup> ; Rosa26<sup>R/+</sup> produites dans le laboratoire par croisement des souris PDGF B-Cre-ER<sup>T2/+</sup> (Claxton et al., 2008) avec les souris Rosa26<sup>R/+</sup> (Soriano, 1999). Elles ont été élevées dans une animalerie conventionnelle avec un cycle jour nuit 12 h/12 h. Elles disposent de boisson et de nourriture à volonté. L'élevage et la manipulation des souris ont été effectués selon les règles définies par les services vétérinaires français.

Les souris PDGF B-Cre-ER<sup>T2/+</sup> ; Rosa26<sup>R/+</sup> sont issues du croisement des souris PDGF B-Cre-ER<sup>T2/+</sup> où la recombinaison Cre est sous la dépendance d'un promoteur spécifique (P<sub>PDGF B</sub>) avec les souris Rosa26<sup>R/+</sup> dans lesquelles l'ADNc de lacZ est inséré dans le locus Rosa26 et encadré d'une cassette STOP. Ainsi à l'issue de ce croisement et suite à l'injection de tamoxifène, la recombinaison Cre permet l'ablation de la cassette STOP au niveau des sites loxP. La souris PDGF B-Cre-ER<sup>T2/+</sup> ; Rosa26<sup>R/+</sup> initie la transcription de lacZ uniquement dans les cellules qui expriment le PDGF B (**Fig. 23**).

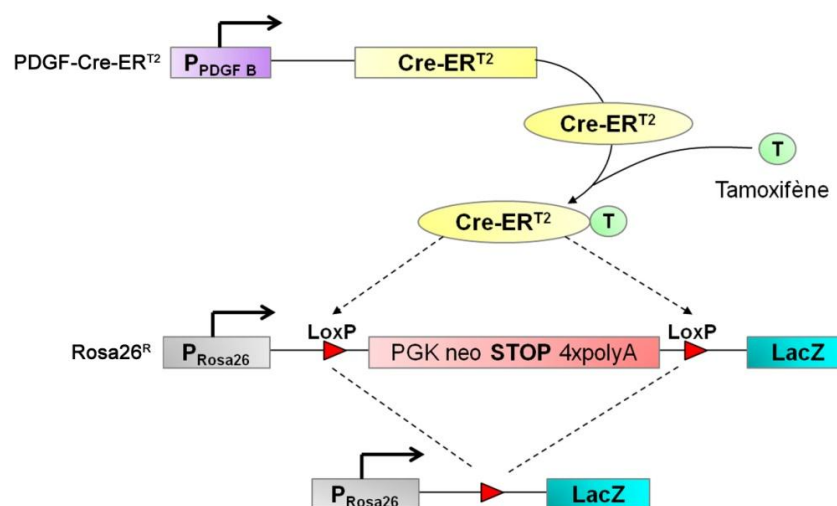


Figure 23 : Obtention des souris PDGF B-Cre-ER<sup>T2/+</sup> ; Rosa26<sup>R/+</sup>

### II. MODELE D'ANGIOGENESE DE LA CORNEE

Le modèle d'angiogenèse de la cornée chez la souris permet d'obtenir une angiogenèse quantitative et reproductible *in vivo*. L'avantage majeur de ce modèle est que les

néo-vaisseaux se développent sur une zone tissulaire avasculaire. Ceci simplifie l'analyse et la quantification de la densité des néovaisseaux générés.

Le principe est d'implanter sous l'épithélium et la membrane de Bowman de la cornée de l'œil de souris un implant contenant un facteur angiogénique qui va diffuser et induire, en quelques jours, la croissance de nouveaux vaisseaux à partir du réseau vasculaire périphériques préexistant de la cornée.

### **1. Préparation de l'implant contenant les agents angiogéniques**

Pour permettre une libération lente des facteurs angiogéniques dans la cornée, ces facteurs sont inclus dans une matrice de poly 2-hydroxyethylmethacrylate (Hydron) (Sigma).

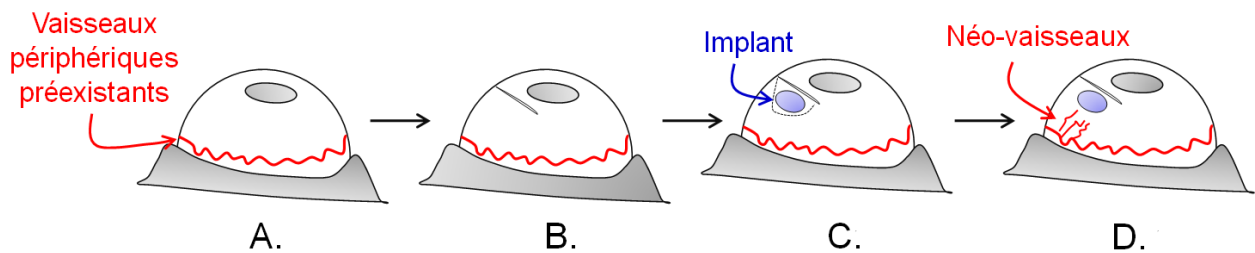
Dix  $\mu\text{L}$  de PBS-0,1% BSA contenant ou non les facteurs angiogéniques (0,5  $\mu\text{g}$  pour PDGF BB et 5  $\mu\text{g}$  pour VEGF), et selon les cas l'inhibiteur (10 mmoles), sont ajoutés à 2,5 mg d'un complexe de saccharose octasulfate et de polyhydroxyde d'aluminium (Sigma) pour stabiliser le facteur peptidique dans l'environnement biologique. Cinq  $\mu\text{L}$  d'Hydron à 12% dans l'éthanol 96% sont ajoutés. La suspension est homogénéisée puis rapidement étalée sur une toile de nylon (Fisher Scientific) préalablement stérilisée à l'autoclave et découpée en rectangles d'environ 10 x 5 cm (ou 3 x 4 cm). La toile nylon est séchée pendant 15 min puis 5  $\mu\text{L}$  de la solution d'Hydron supplémentaires sont répandus sur les deux côtés du rectangles de toile et à nouveau séchée pendant 15 min. Les fils de la toile nylon sont précautionneusement enlevés afin de libérer les implants d'environ 1 mm de côté.

### **2. Insertion de l'implant dans la cornée de la souris**

Les souris mâles âgées de 5 semaines sont anesthésiées par une injection intrapéritonéale d'un mélange d'IMALGENE (Ketamin, 100 mg/kg) et de ROMPUN (Xylazin, 10 mg/kg). Le globe de l'œil est exorbité avec une pince recourbée en prenant soin de ne pas endommager les vaisseaux entourant la base du globe. Durant la procédure, du PBS stérile est déposé directement sur chaque œil pour éviter le dessèchement excessif de la cornée. A l'aide d'un microscope à dissection, une incision dans le milieu de la cornée est effectuée avec une lame chirurgicale en prenant garde de ne pas couper la cornée en 2. A l'aide d'un couteau modifié de (F.S.T.), une micropoche est créée sous l'épithélium cornéen à partir du bord d'incision vers le quadrant inférieur de la cornée (**Fig. 24B**). Les implants contenant les substances à tester sont déposés sur la cornée puis insérés dans la micropoche (**Fig. 24C**). Après la chirurgie, une fois que les souris se sont réveillées et ont recouvré leur



mobilité, elles sont remises dans leurs cages. En général, 5 jours après l'opération, des vaisseaux sanguins se développent vers l'insert pro-angiogénique (**Fig. 24D**). Ce réseau vasculaire va ensuite se muscler progressivement (Zhang et al., 2009). Huit souris ont été utilisées afin d'obtenir au moins 10 cornées exploitables pour chaque condition expérimentales et contrôles.



**Figure 24 : Présentation schématique du modèle d'angiogenèse de la cornée**

### **3. Traitement de la cornée**

Cinq jours après l'opération, les souris sont énucléées et les yeux sont fixés dans du PFA à 2% pendant 10 min. Les cornées sont ensuite excisées et incubées dans du PBS contenant 1% de BSA et 0,5% de Triton X-100 pendant 1 h. La détection des antigènes est réalisée par une incubation pendant la nuit avec les anticorps primaires adéquats (**Tab. 13**) dilués dans PBS/BSA 1% + Triton X-100 0,5% suivie de 3 lavages de 5 min dans le PBS, puis d'une incubation avec l'anticorps secondaire fluorescent correspondant. L'observation est réalisée sur un microscope à épi-fluorescence (microscope Zeiss Observer.Z1 équipé d'un système Colibri et d'une caméra AxioCam MRM, logiciel AxioVision).

### **4. Révélation de l'activité $\beta$ -Gal**

Les cornées sont fixées dans du PBS contenant 2% de PFA pendant 10 minutes à 4°C, rincées 3 fois avec du PBS, puis incubées dans le substrat X-Gal (1 mg/ml, Euromedex) à 37°C toute la nuit. La réaction est arrêtée par rinçage en PBS lorsque la coloration bleue s'est développée.

### III. STATISTIQUES

Un test d'ANOVA est effectué pour mesurer la variance. Si la variance est égale entre chaque groupe, un test non-paramétrique de *Mann-Whitney* est réalisé (\* :  $p < 0,05$ , \*\* :  $p < 0,005$ , \*\*\* :  $p < 0,0005$  et NS :  $p > 0,05$ ).

# RESULTATS



➤ **Partie I : Protéines Hh et migration des CML**  
**vasculaires *in vitro***



# CHAPITRE I : MISE EN EVIDENCE DU ROLE DE LA VOIE HH DANS L'EFFET CHIMIOTACTIQUE EXERCE PAR LES CE SUR LES CML

---

La migration des cellules murales (péricytes, CML) est une étape indispensable pour leur recrutement sur des vaisseaux néoformés, permettant la maturation et la stabilisation des vaisseaux. Une des hypothèses évoquées couramment est que les cellules murales migrent selon un gradient de facteurs produits par les CE des néovaisseaux durant la croissance vasculaire. Un certain nombre de facteurs d'origine endothéliale ont été impliqués dans le recrutement des CML. C'est en particulier le cas du PDGF BB (Enge et al., 2002).

Il a aussi été suggéré que Shh pouvait favoriser la couverture des néovaisseaux par les cellules murales, en particulier au cours de la réparation du muscle cardiaque après infarctus du myocarde ou du muscle squelettique après ischémie chronique (Kusano et al., 2005 ; Pola et al., 2003). Mais l'implication et les mécanismes d'action des protéines Hh dans la migration des cellules murales n'ont jamais été explorés.

Le but de la première partie de notre étude était de mettre en évidence le rôle des protéines Hh et de leur signalisation dans la migration des CML, notamment induite par des facteurs endothéliaux, afin de déterminer si les protéines Hh pouvaient effectivement intervenir sur une étape importante du processus du recrutement des cellules murales sur les néovaisseaux endothéliaux.

Dans ce but, nous avons étudié l'implication des protéines Hh dans la migration des CML en culture induite par les milieux conditionnés (MC) par les CE stimulées par des agents proangiogéniques.

## I. MISE EN EVIDENCE DE LA SECRETION DE FACTEURS CHIMIOTACTIQUES PAR LES CE

Dans un premier temps, nous avons cherché à voir si les CE (HUVEC) soumises à un stimulus angiogénique (Ang1 ou VEGF) modulaient leur production de facteurs chimiotactiques pour les CML d'aorte de rat. Pour cela, nous avons déterminé le potentiel chimiotactique des milieux de culture conditionnés par les HUVEC cultivées dans différentes conditions.

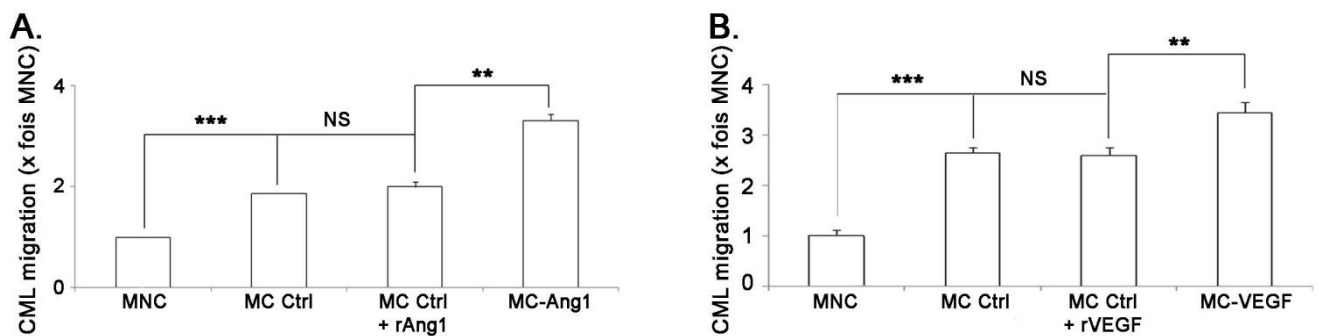
Les HUVEC utilisées uniquement à faible passage (moins de 6) sont mises en quiescence dans un milieu pauvre en sérum pendant 24 heures puis sont stimulées ou non par

des facteurs angiogéniques (Ang1 ou VEGF) pendant 24 heures. Les différents milieux conditionnés (MC) sont collectés : MC par des HUVEC maintenues en condition contrôle (MC Ctrl) et MC par des HUVEC stimulées par Ang1 ou VEGF (MC-Ang1 ou MC-VEGF).

La migration des CML est étudiée à l'aide du système Transwell. Les CML quiescentes sont ensemencées sur la face supérieure du filtre (pores de 8  $\mu\text{m}$ ). Les puits dans lesquels plonge l'insert contiennent les milieux à étudier : milieu non-conditionné (MNC), MC Ctrl avec Ang1 ou VEGF recombinants surajoutés et MC-Ang1 ou MC-VEGF.

Le MC Ctrl augmente significativement la migration des CML par rapport au MNC, indiquant qu'en condition contrôle, les HUVEC sécrètent des facteurs dans le milieu de culture qui sont chimiotactiques pour les CML. L'addition d'Ang1 ou de VEGF recombinants dans le MC Ctrl n'influence pas l'activité migratoire de ce MC Ctrl, signifiant que ces deux facteurs ne sont pas chimiotactiques pour les CML, même s'ils sont associés avec les autres facteurs sécrétés par les HUVEC.

Par contre, les MC des HUVEC stimulées par l'Ang1 ou le VEGF (MC-Ang1 ou MC-VEGF) pendant 24 heures induisent une migration plus importante (70% et 54%, respectivement) que le MC Ctrl additionné d'Ang1 ou de VEGF (**Fig. 25**).



**Figure 25 : Induction de la migration des CML par les milieux conditionnés par les HUVEC en culture**

Les HUVEC sont ensemencées à  $2,5 \cdot 10^5$  par puits dans une plaque de 6 puits pendant 24 heures. Elles sont mises en quiescence dans du milieu pauvre en sérum pendant 24 heures puis stimulées ou non par l'Ang1 (20 ng/mL) ou le VEGF (20 ng/mL). Les MC des HUVEC non-stimulées (MC Ctrl) et les MC des HUVEC stimulées par l'Ang1 (MC-Ang1) ou le VEGF (MC-VEGF) sont collectés et filtrés.  $6,5 \cdot 10^4$  CML quiescentes sont ensemencées dans la cupule supérieure d'un système Transwell. Le puits inférieur contient du MNC, du MC Ctrl, du MC Ctrl additionné de l'Ang1 (20 ng/mL) ou du VEGF (20 ng/mL), du MC-Ang1 ou du MC-VEGF. La migration est stoppée au bout de 6 heures et les cellules ayant migré sous le filtre sont fixées, colorées à l'hémalum et comptées. Trois cupules de migration sont utilisées pour chaque série et l'expérimentation est reproduite 3 fois. Les résultats sont normalisés par rapport à la moyenne du nombre de cellules ayant migré dans le MNC et exprimés comme moyenne  $\pm$  SD. (NS :  $p > 0,05$ , \*\*  $p < 0,005$  et \*\*\* :  $p < 0,0005$ )



Ces résultats démontrent que la stimulation des HUVEC par Ang1 ou VEGF entraîne une augmentation de la sécrétion des facteurs chimiotactiques pour la CML. Cette augmentation pourrait être due :

- soit à une sécrétion plus importante de facteurs déjà produits par les CE non stimulées,
- soit à une production/sécrétion de nouveaux facteurs sous l'influence de l'Ang1 ou du VEGF.

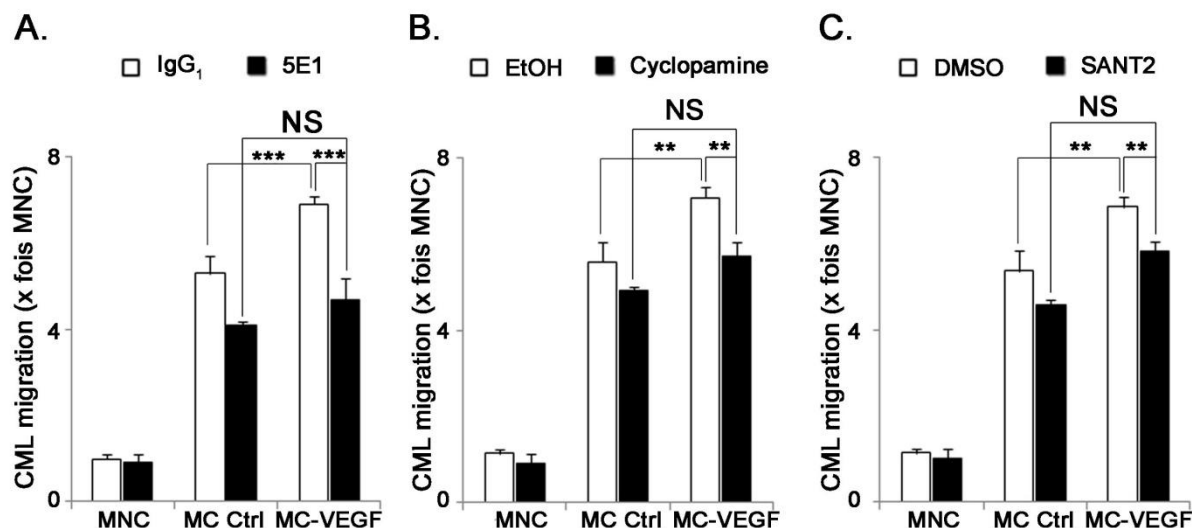
## II. ROLE DE LA VOIE HH DANS L'EFFET CHIMIOTACTIQUE DES MC PAR LES CE

De nombreux travaux ont mis en évidence la production par les CE de facteurs chimiotactiques pour les CML, comme le PDGF BB (Enge et al., 2002). Dans ce travail, nous nous sommes plus particulièrement intéressés à l'effet potentiel de la famille Hh pour laquelle une action sur la formation et la maturation des vaisseaux avait été suggérée. En effet, lors de la réparation du réseau vasculaire après infarctus du myocarde, il a été montré que l'administration de Shh favorisait la musculation des vaisseaux (Kusano et al., 2005), sans que les mécanismes cellulaires et moléculaires d'action n'aient été identifiés. Une étape essentielle à cette musculation est le recrutement des cellules murales (CML et péricytes) sur les vaisseaux néoformés, permettant ainsi la maturation et la stabilisation du réseau vasculaire. Le processus de migration de ces cellules murales est un élément indispensable à leur recrutement.

Dans un premier temps, nous avons posé l'hypothèse que la voie de signalisation Hh pouvait être impliquée dans la migration des cellules murales et plus précisément que des protéines Hh produites par les CE participaient à la migration des CML :

- soit par une action directe des protéines Hh endothéliales sur la CML,
- soit de façon autocrine en intervenant sur l'expression par la CE de facteurs chimiotactiques pour la CML.

Afin d'aborder ce problème, nous avons étudié l'effet chimiotactique de MC Ctrl ou MC-VEGF, dans lesquels a été ajouté un anticorps bloquant des protéines Hh (**Fig. 26A**) ou de 2 inhibiteurs du corécepteur Smo (cyclopamine et SANT2 pour **Fig. 26B** et **Fig. 26C**, respectivement).



**Figure 26 : Implication des protéines Hh dans la migration des CML induite par les milieux conditionnés des HUVEC en culture**

Les MC des HUVEC non-stimulées (MC Ctrl) et les MC des HUVEC stimulées par le VEGF (MC-VEGF) sont collectés comme précédemment décrit. L'influence de 5E1 (1,5 µg/mL), de cyclopamine (1 µM) ou de SANT2 (100 nmole/L) sur la migration des CML induite par le MNC, le MC Ctrl ou le MC-VEGF par des HUVEC est testée à l'aide du système de Transwell. Trois puits sont utilisés pour chaque série et l'expérimentation est reproduite 3 fois. Les résultats sont normalisés par rapport à la moyenne du nombre de cellules ayant migré dans le MNC. Les histogrammes représentent les moyennes ± SD. (NS :  $p > 0,05$ , \*\* :  $p < 0,005$  et \*\*\*  $p < 0,0005$ )

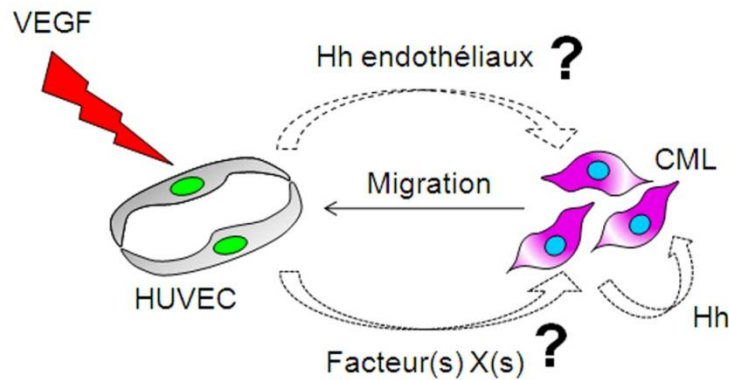
Comme précédemment décrit, le MC-VEGF induit une migration plus importante des CML que le MC Ctrl. L'addition de l'anticorps anti-Hh 5E1, de cyclopamine ou de SANT2 dans le MC par les HUVEC stimulées ou non par le VEGF réduit son potentiel chimiotactique pour les CML. Pour le MC Ctrl, cette diminution est modérée, respectivement de 14%, 9% ou 11%. Par contre, l'augmentation de la migration des CML induite par le MC-VEGF est complètement abolie, et la diminution de la migration induite par MC-VEGF est de l'ordre de 33%, 30% ou 27% par rapport à celle induite par MC Ctrl seul.

Ces résultats suggèrent que les protéines Hh et l'activation de leurs voies de signalisation via Smo dans les CML participent à la migration des CML induite par les facteurs issus de la CE et ce d'autant plus que les CE ont été stimulées par le VEGF.

### III. HYPOTHESE DE TRAVAIL : PROTEINES HH DANS LA MIGRATION DES CML INDUITE PAR LES CE

Nous avons démontré précédemment que les protéines Hh et leur voie de signalisation jouent un rôle dans la migration induite par les MC des HUVEC. Mais, l'origine des protéines

Hh (CE ou CML) et les mécanismes d'actions restent à définir. Deux hypothèses peuvent être proposées (**Fig. 27**):

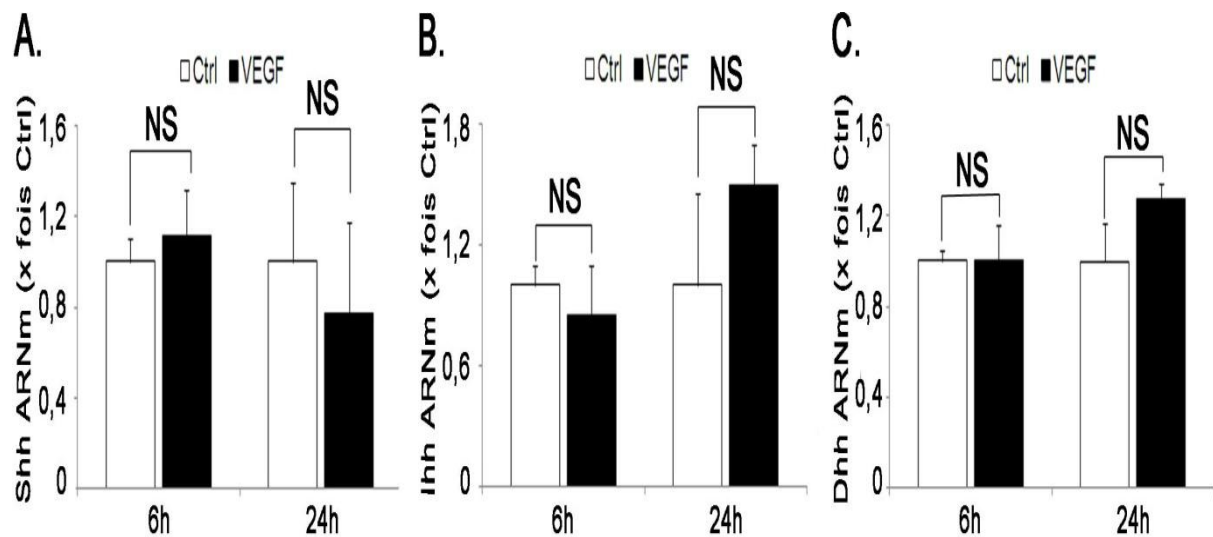


**Figure 27 : Mécanismes cellulaires et moléculaires hypothétiques de la voie Hh dans la migration des CML vers les HUVEC**

- les protéines Hh sont produites par les CE, notamment sous l'effet de VEGF, et permettent la migration des CML vers les HUVEC, soit par une action directe sur les CML, soit encore par une action autocrine sur la CE;
- les CE produisent des facteurs, notamment sous l'effet d'une stimulation VEGF, qui vont stimuler la production des protéines Hh par les CML, et la sécrétion autocrine des protéines Hh entraîne la migration des CML.

Pour répondre à ces hypothèses, nous avons abordé l'identification des mécanismes cellulaires et moléculaires d'action de la voie Hh dans la migration des CML en caractérisant :

- l'effet direct des protéines Hh recombinantes sur les CML ;
- l'effet des protéines Hh endothéliales dans la migration des CML ;
- le rôle des protéines Hh autocrines dans la migration des CML.



**Figure 28 : Expression des ARNm des différents Hh dans les HUVEC stimulées ou non par VEGF**

Des HUVEC quiescentes sont stimulées ou non par le VEGF (20 ng/mL) puis les ARNm sont extraits à partir des HUVEC lysées 6 ou 24 heures après la stimulation. Le niveau d'expression des ARNm de chaque Hh dans les HUVEC est déterminé par RT-qPCR en utilisant des amorces spécifiques. Trois puits sont utilisés pour chaque série et l'expérimentation est reproduite 3 fois. Les histogrammes représentent les moyennes  $\pm$  SD. (NS :  $p > 0,05$ )

## CHAPITRE II : ROLE DES PROTEINES HH ENDOTHELIALES DANS LA MIGRATION DES CML

---

Dans cette partie, nous avons examiné l'hypothèse que les protéines Hh produites par les CE, notamment en réponse au VEGF, sont des inducteurs de la migration des CML. A cet effet, nous avons cherché à savoir :

- si les ARNm des Hh sont exprimés par les HUVEC sous stimulation ou non du VEGF via une approche RT-qPCR ;
- si des protéines Hh sont sécrétées par les HUVEC par analyse de l'activation du rapporteur Gli-LacZ ;
- et si des protéines Hh sont présentes dans le MC de CE par analyse de la migration des CML.

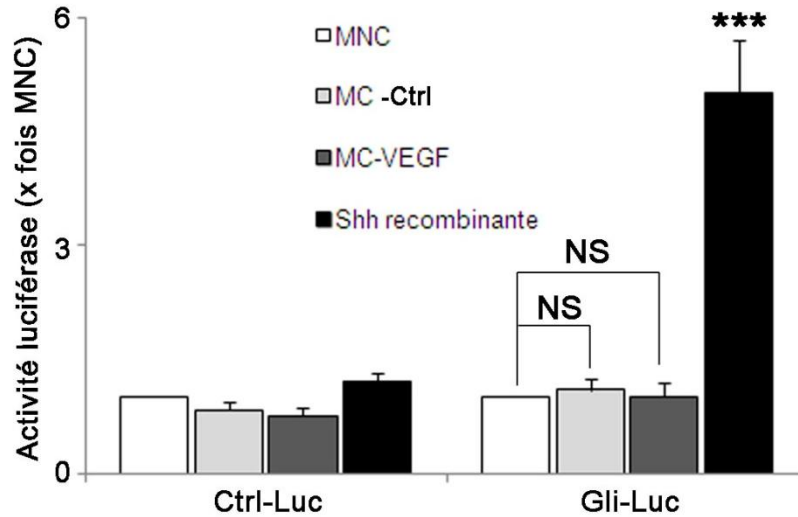
### I. EXPRESSION DES ARNm DES HH PAR LES CE

Alors que plusieurs études récentes mettent en évidence que la voie Hh promeut la morphogenèse capillaire (Renault et al., 2010), la production des protéines Hh *in vivo* ou *in vitro* par les CE n'a pas été rapportée. Nous avons donc cherché à savoir si les HUVEC exprimaient les Hh.

L'expression des différents Hh (Shh, Ihh et Dhh) dans les HUVEC en culture est évaluée par RT-qPCR. Pour ce faire, les amorces localisées dans les extrémités C-terminales de chaque gène sont utilisées puisque les séquences N-terminales des Shh, Ihh et Dhh ont un fort pourcentage d'identité et ne sont pas utilisables pour l'amplification spécifique des ARNm de chaque Hh.

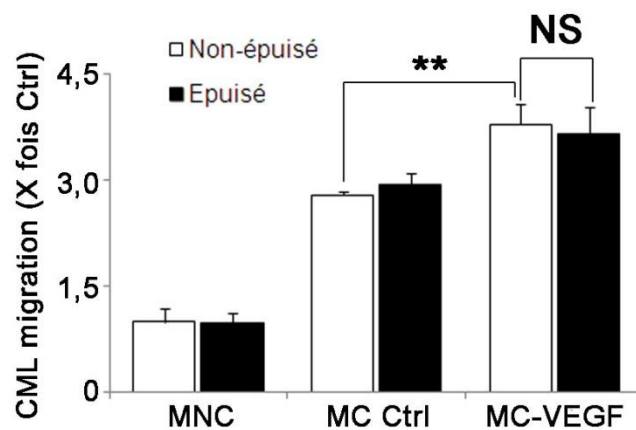
Il ressort de cette analyse que les expressions de Shh, d'Ihh et de Dhh dans les HUVEC en quiescence sont très faibles, voire non détectables, de l'ordre de 300 copies/cellule (données non présentées). La stimulation des HUVEC par le VEGF ne module pas le niveau des ARNm des différents Hh, que ce soit après 6 ou 24 heures de traitement (**Fig. 28**).

Ceci suggère fortement que les facteurs Hh endothéliaux ne seraient pas responsables de la migration des CML dépendante de la sécrétion des CE, même stimulées par le VEGF.



**Figure 29 : Effet des MC par les HUVEC sur l'activation du gène rapporteur Gli1-Luc**

Les MC des HUVEC non stimulées (MC Ctrl) et les MC des HUVEC stimulées par le VEGF (MC-VEGF) sont collectés comme précédemment décrit. Les cellules 3T3 ( $3.10^4$  par puits) sont ensemencées dans une plaque de 24 puits et co-transfectées par un plasmide codant pour le gène de  $\beta$ -galactosidase (pHook) et un plasmide codant pour la luciférase sous la dépendance de 8 sites de Gli1 consensus ou un plasmide contrôle. Après 24 heures de quiescence, les 3T3 transfectées sont mises en contact avec la protéine recombinante Shh, le MNC ou les différents MC des HUVEC (MC Ctrl ou MC-VEGF) pendant 24 heures. Après avoir lysé les 3T3, l'émission des photons générés est évaluée à l'aide d'un luminomètre. Trois puits sont utilisés pour chaque série et l'expérimentation est reproduite 3 fois. Les histogrammes représentent les moyennes  $\pm$  SD. (NS :  $p > 0,05$  et \*\*\* :  $p < 0,0005$ )



**Figure 30 : Effet de l'épuisement des protéines Hh dans les MC des HUVEC sur l'activité chimiotactique de ces milieux**

Les MC des HUVEC non stimulées (MC Ctrl) ou stimulées par le VEGF (MC-VEGF) sont collectés comme précédemment décrit. Les protéines Hh sont immunoprécipités par l'anticorps 5E1 dirigé contre les 3 protéines Hh. L'activité chimiotactique des MC immunoprécipités ou non est déterminée en Transwell comme précédemment décrit. Trois puits sont utilisés pour chaque série et l'expérimentation est reproduite 3 fois. Les histogrammes représentent les moyennes  $\pm$  SD. (\*\* :  $p < 0,005$  et NS :  $p > 0,05$ )

## II. ACTIVATION DE LA VOIE HH PAR LES MC PAR LES HUVEC

Les résultats précédents montrent que le niveau d'expression des 3 Hh dans les HUVEC est très faible et que le VEGF n'est pas un facteur modulateur pour la transcription des facteurs Hh dans ces cellules. Afin de confirmer que les protéines Hh ne sont pas sécrétées par les CE et d'exclure l'hypothèse que les protéines Hh endothéliales pourraient être des inducteurs directs de la migration des CML, nous avons cherché à savoir si les MC des HUVEC contenait des protéines Hh et de ce fait pouvaient induire l'activation d'un gène rapporteur de la voie Hh, à savoir le gène Gli1.

Le MNC, le MC-Ctrl et le MC-VEGF des HUVEC sont collectés et mis au contact de cellules 3T3 quiescentes, préalablement co-transfectées par un plasmide rapporteur dans lequel le gène luciférase est placé sous le contrôle de 8 sites Gli1 consensus (Gli1-Luc) ou d'un plasmide contrôle Ctrl-Luc, et avec un plasmide codant pour la  $\beta$ -galactosidase (pHook-LacZ). La luminescence émise est déterminée postérieurement pour évaluer le niveau d'activation par des conditions données.

Le traitement par Shh recombinant allume le promoteur de Gli1 et par conséquent active 5,2 fois la génération des photons, démontrant que ce système du gène rapporteur Gli1-luciférase est fonctionnel. Par contre, ni le MC Ctrl, ni le MC-VEGF n'allument l'activité de la luciférase dans les 3T3 transfectées par le gène rapporteur Gli1-luciférase (**Fig. 29**), suggérant que les protéines Hh ne sont pas sécrétées dans le milieu de culture des HUVEC sous stimulation de VEGF.

## III. EFFET DE L'ÉPUISEMENT EN PROTÉINES HH DANS DES MC DES HUVEC SUR LEUR ACTIVITÉ CHIMIOTACTIQUE POUR LES CML

Pour vérifier cette dernière hypothèse, les différents MC par les HUVEC stimulées ou non par VEGF sont collectés et incubés avec l'anticorps 5E1 dirigé contre les 3 formes de protéines Hh. L'anticorps libre ou lié à des ligands est ensuite éliminé par absorption sur des billes d'agarose enrobées de protéine A/G.

Le MC-VEGF par des HUVEC augmente de 35% la migration des CML par rapport au MC Ctrl. Après l'épuisement en protéines Hh, l'activité migratoire de ce milieu ne change pas (**Fig. 30**), démontrant que les protéines Hh endothéliales ne sont pas impliquées dans l'augmentation de la migration des CML induite par le MC-VEGF des HUVEC.

Ceci suggère fortement que les protéines Hh ne sont pas sécrétées par les CE même stimulées par le VEGF et ne jouent aucun rôle dans la migration des CML.

#### IV. CONCLUSION

A l'aide de 3 approches différentes, nous mettons en évidence que sous stimulation de VEGF **1.)** le niveau d'expression des 3 Hh par les HUVEC n'est pas modulé et reste très faible; **2.)** les protéines Hh ne sont pas sécrétées dans le milieu de culture ; **3.)** l'épuisement en protéines Hh ne modifie pas l'activité migratoire de MC-VEGF.

Nous constatons donc que les protéines Hh endothéliales ne sont pas impliquées dans la migration des CML induite par le MC-VEGF des HUVEC stimulées par le VEGF.



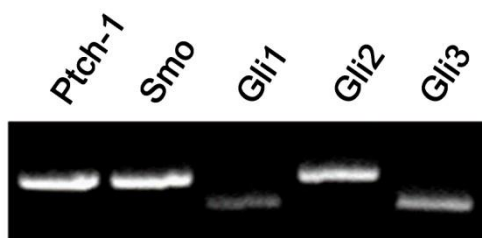
## CHAPITRE III : EFFET DIRECT DES PROTEINES HH SUR LES CML

---

### I. EXPRESSION DES ELEMENTS DE LA VOIE HH DANS LES CML

Plusieurs études ont mis en évidence que l'administration thérapeutique de Shh favorisait la croissance des néovaisseaux et leur muscularisation en particulier au cours de la réparation du muscle cardiaque après infarctus du myocarde, ou du muscle squelettique après ischémie chronique (Kusano et al., 2005 ; Pola et al., 2003). *In vitro*, il a aussi été mis en évidence que Shh induit la survie et la prolifération des CML en condition hypoxique (Wang et al., 2010a) via Notch (Morrow et al., 2009) et Gli2/cycline D1/rétinoblastome (Li et al., 2010a), respectivement. Cependant le rôle des protéines Hh sur l'activation de la voie de transduction dans les CML est encore mal caractérisé et son implication dans la migration des CML n'a jamais été explorée.

La présence de différents éléments de la voie Hh dans les CML a été recherchée en utilisant la RT-PCR classique. Les récepteurs Ptch-1 et Smo sont fortement exprimés, permettant la fixation des protéines Hh en surface des CML. Les facteurs de transcription Gli1, Gli2 et Gli3 sont présents dans les CML (**Fig. 31**). Ce résultat suggère que ces cellules sont potentiellement réactives aux protéines Hh.

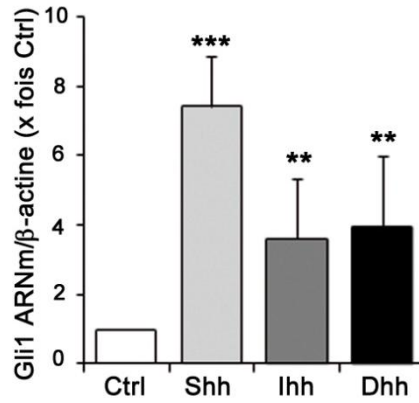


**Figure 31 : Présence des éléments de la voie Hh dans les CML**

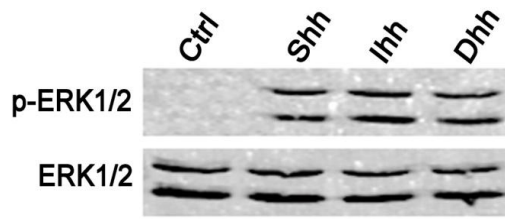
2,5.10<sup>5</sup> CML par puits sontensemencées dans une plaque de 6 puits, puis mises en quiescence par 24 heures d'incubation dans du DMEM dépourvu de sérum. Les ARN totaux sont ensuite extraits et les ARNm de chaque élément de la voie Hh sont détectés par RT-PCR classique en utilisant des amorces spécifiques des différents gènes.

### II. EFFET DES PROTEINES HH RECOMBINANTS SUR LES VOIES DE SIGNALISATION INTRACELLULAIRES

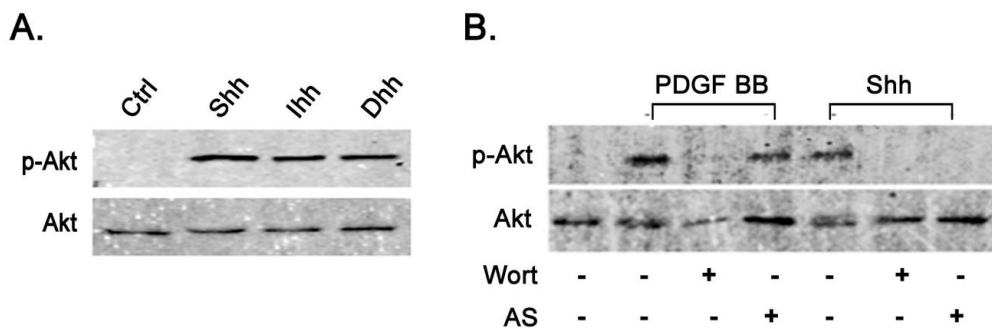
Dans cette partie de travail, l'activation de la voie canonique Gli1-dépendante ainsi que la voie non-canonique a été recherchée en présence des protéines Hh recombinants.



**Figure 32 : Effet des protéines Hh recombinantes sur la modulation de Gli1 dans les CML**  
 2,5.10<sup>5</sup> CML par puits sont ensemencées dans une plaque de 6 puits pendant 24 heures. Elles sont mises en quiescence par 24 heures d'incubation dans du DMEM sans sérum puis stimulées ou non par les protéines recombinantes Shh, Ihh ou Dhh (1 µg/mL) pendant 6 heures. Les ARNm sont extraits après lyse des CML et le niveau des ARNm de Gli1 est déterminé par RT-qPCR. Trois puits sont utilisés pour chaque série et l'expérimentation est reproduite 3 fois. Les histogrammes représentent les moyennes ± SD. (\*\* : p< 0,005 et \*\*\* : p< 0,0005)



**Figure 33 : Effet des protéines Hh recombinantes sur l'activation des voies ERK-1/2**  
 2,5.10<sup>5</sup> CML quiescentes sont stimulées ou non par les protéines recombinantes Shh, Ihh ou Dhh (1 µg/mL) pendant 15 minutes. Les protéines cellulaires sont extraites après lyse des cellules et séparées par électrophorèse PAGE-SDS. Les formes p-ERK (Tyr202/204) et ERK totale sont déterminées par Western blot en utilisant des anticorps spécifiques. L'image montrée est le résultat d'un Western blot représentatif de 3 expérimentations différentes.



**Figure 34 : Effet des Hh protéines recombinantes sur l'activation de la voie Akt**  
 2,5.10<sup>5</sup> CML quiescentes sont (A). stimulées ou non par le Shh, Ihh ou Dhh (1 µg/mL) pendant 15 minutes ; (B). prétraitées ou non avec un inhibiteur ubiquitaire de la PI3K (Wortmannin) (100 nmole/L) ou avec un inhibiteur sélectif de la PI3Kγ (AS-252424) (100 nmole/L) pendant 30 minutes, puis soumises à une stimulation par Shh (1 µg/mL) ou par PDGF BB (10 ng/mL) pendant 15 minutes. La p-Akt (Ser473) et l'Akt totale sont détectées par Western blot en utilisant des anticorps spécifiques. L'image montrée est le résultat d'un Western blot représentatif de 3 expérimentations différentes.

## **1. Effet sur la voie canonique Gli1-dépendante**

Lorsque les CML rendues quiescentes par privation de sérum, sont stimulées pendant 6 heures par les protéines N-Hh recombinantes Shh, Ihh ou Dhh à 1 µg/mL, nous observons une augmentation de 7,2, 3,8 ou 4,0 fois respectivement du niveau des ARNm de Gli1 (déterminé par RT-qPCR) par rapport à celui trouvé dans les cellules non stimulées (**Fig. 32**).

Ce résultat démontre que les CML répondent à une stimulation par les protéines Hh en activant la voie de signalisation classiquement décrite (canonique) Gli.

## **2. Effet des protéines Hh recombinantes sur les voies Hh non-canoniques**

Bien que la voie canonique soit la signalisation majeure et classiquement activée par les protéines Hh, il a été décrit récemment qu'il existait d'autres voies de signalisation qui impliquent notamment l'activation des protéines kinases PI3K (Polizio et al., 2011), MAPK (Riobo et al., 2006a) et G-protein-coupled receptor kinases (GRKs) (Maier et al., 2012).

### **A. Protéines Hh recombinantes et voie MAPK ERK1/2**

Dans les CML quiescentes, la forme phosphorylée d'ERK1/2 (Tyr202/204) n'est pas détectable. Une stimulation courte (15 minutes) par Shh, Ihh ou Dhh induit la phosphorylation d'ERK1/2, suggérant que les protéines Hh pourraient avoir des fonctions cellulaires sur les CML via cette activation (**Fig. 33**).

### **B. Protéines Hh recombinantes et voie PI3K**

Dans les CML quiescentes, la forme phosphorylée d'Akt sur Ser473 (p-Akt) est indétectable, suggérant que la voie PI3K n'est pas activée. La stimulation des CML par chacune des 3 protéines Hh induit une phosphorylation de l'Akt de même niveau, indiquant que Shh, Ihh et Dhh sont des inducteurs de la voie PI3K dans les CML (**Fig. 34A**).

Par la suite, Shh a été utilisé comme protéine Hh de référence afin de déterminer l'isoforme de la PI3K qui est activée par les protéines Hh dans les CML en utilisant des inhibiteurs ubiquitaire ou sélectif des PI3K. La phosphorylation d'Akt induite par Shh est inhibée par un inhibiteur général des PI3K (Wortmannin) ainsi que par un inhibiteur sélectif de la PI3K $\gamma$  (AS-252424) (**Fig. 34B**), suggérant que la PI3K $\gamma$  est l'isoforme principale activée par Shh et impliquée dans la phosphorylation d'Akt dépendante de Shh. Ceci est en adéquation avec la théorie avançant que l'activation des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) implique la voie PI3K $\gamma$  puisque le corécepteur Smo des ligands Hh est considéré

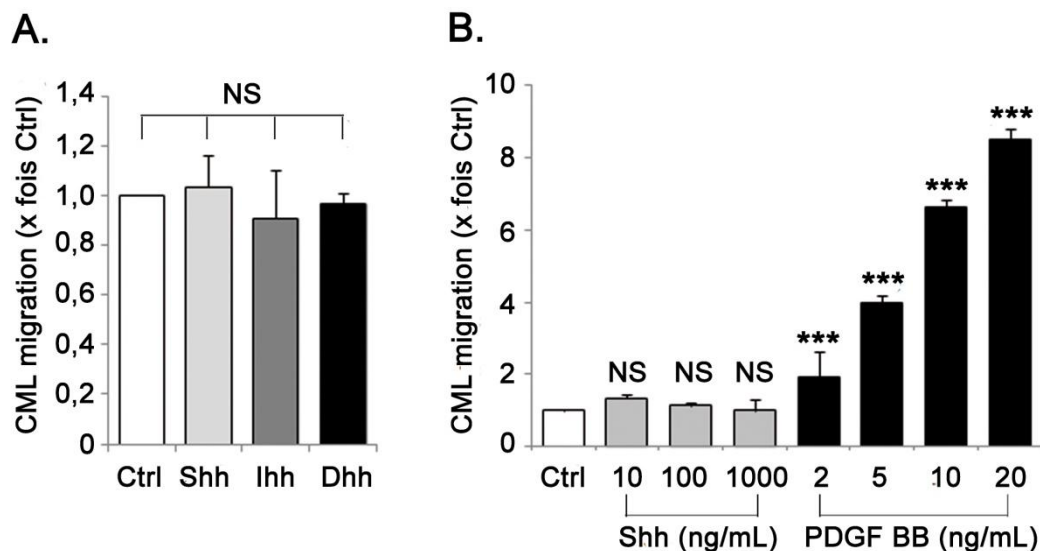
comme étant un RCPG (protéine G de type G $\alpha$ i). Comme attendu, la phosphorylation d'Akt induite par le PDGF BB, un ligand d'un récepteur à tyrosine kinase (RTK), est inhibée par la Wortmannin mais pas par AS-252424 (**Fig. 34B**).

### 3. Conclusion

Les résultats de cette partie montrent que les 3 protéines Hh induisent non seulement la voie de signalisation canonique dépendante du facteur de transcription Gli1, mais aussi une voie non-canonique avec notamment l'activation des MAPK (ERK1/2) et de la PI3K $\gamma$ .

## III. PROTEINES HH RECOMBINANTES ET CHIMIOTACTISME DES CML

Les résultats précédents montrent que les 3 protéines Hh induisent la voie de signalisation canonique dépendante du facteur de transcription Gli1 et une voie non-canonique avec notamment l'activation des MAPK (ERK1/2) et de la PI3K $\gamma$ . Notre objectif suivant a été d'étudier l'influence des protéines Hh sur la migration des CML, deux processus qui interviennent dans le recrutement des cellules murales sur les néovaisseaux.

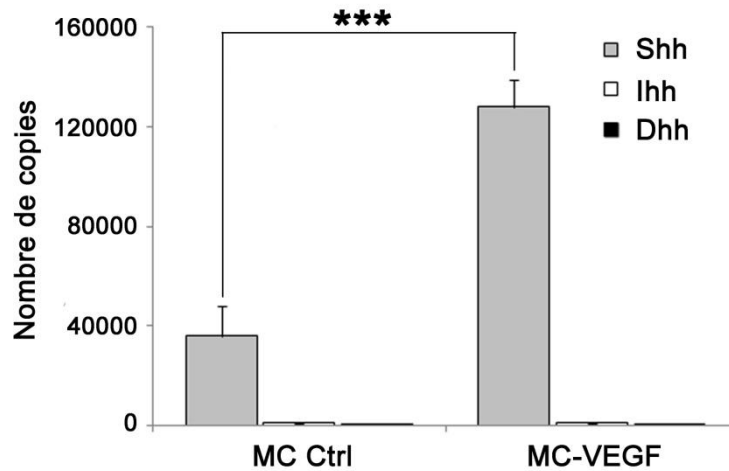


**Figure 35 : Effet chimiotactique des protéines Hh pour les CML**

L'effet de (A) Shh, Ihh ou Dhh (1  $\mu$ g/mL) ou (B) différentes concentrations de Shh (de 10 à 1000 ng/mL) ou de PDGF BB (de 2 à 20 ng/mL) sur la migration des CML pendant 6 heures est évalué à l'aide du système Transwell. Trois puits sont utilisés pour chaque série et l'expérimentation est reproduite 3 fois. Les histogrammes représentent les moyennes  $\pm$  SD. (\*\* :  $p < 0,005$  et \*\*\* :  $p < 0,0005$ ).

Le potentiel chimiotactique des 3 N-Hh recombinantes pour les CML a été examiné en utilisant le système Transwell. Lorsque dans le compartiment inférieur contient une solution à 1 µg/mL des protéines Hh, aucune protéine Hh n'a induit la migration des CML. Un effet concentration a été étudié pour N-Shh. Quelle que soit sa concentration (de 1 ng/mL à 1000 ng/mL), la protéine Shh n'induit aucune réponse migratoire des CML, alors que le PDGF BB, facteur chimiotactique des CML de référence, entraîne la migration des CML de manière dose-dépendante (de 2 ng/mL à 20 ng/mL), avec une activité maximale à 20 ng/mL (**Fig. 35**).

Dans cette partie, nous démontrons même si les protéines Hh recombinantes activent des voies de signalisation dans les CML, elles ne sont pas chimiotactiques pour ces cellules.



**Figure 36 : Effet des MC des HUVEC sur l'expression des ARNm de Hh et l'activation de Gli1 par les CML**

Les MC des HUVEC non-stimulées (MC Ctrl) et les MC des HUVEC stimulées par le VEGF (MC-VEGF) sont collectés comme précédemment décrit. Des CML ( $2,5 \cdot 10^5$  par puits d'une plaque 6 puits) sont stimulées par addition de MC-Ctrl ou de MC-VEGF pendant 6 heures. **(A)**. Le nombre de copies des ARNm des Hh par CML est quantifié par la qPCR ; **(B)**. Le niveau de l'ARNm de Shh est analysé par la qPCR et standardisé par rapport celui d'un gène de ménage ( $\beta$ -actine). Trois puits sont utilisés pour chaque série et l'expérimentation est reproduite 3 fois. Les histogrammes représentent les moyennes  $\pm$  SD. (\*\*\*) :  $p < 0,0005$ .

# CHAPITRE IV : PRODUCTION DES PROTEINES HH PAR LES CML ET LEURS ROLES DANS LA MIGRATION DES CML

---

## I. ACTIVATION DE L'EXPRESSION DES PROTEINES HH ET DE LEUR SIGNALISATION DANS LES CML PAR LES MC DES CE

Nous résultats précédents montrent que les protéines Hh sont produites à un niveau très bas par les CE et ne sont pas responsables du potentiel chimiotactique des MC par les CE pour les CML. Cependant l'addition d'un anticorps bloquant des Hh dans le MC des HUVEC sous stimulation de VEGF diminue l'activité chimiotactique de ce MC pour les CML. Nous avons donc envisagé l'hypothèse que des facteurs produits par la CE pourraient induire l'expression autocrine de un ou plusieurs protéines Hh par les CML qui participeraient à leur migration. Pour valider cette hypothèse, nous avons :

- étudié l'expression des 3 Hh dans les CML en culture stimulées ou non par les MC des CE,
- caractérisé le rôle des protéines Hh produits de façon autocrine sur les CML, notamment sur la migration des CML.

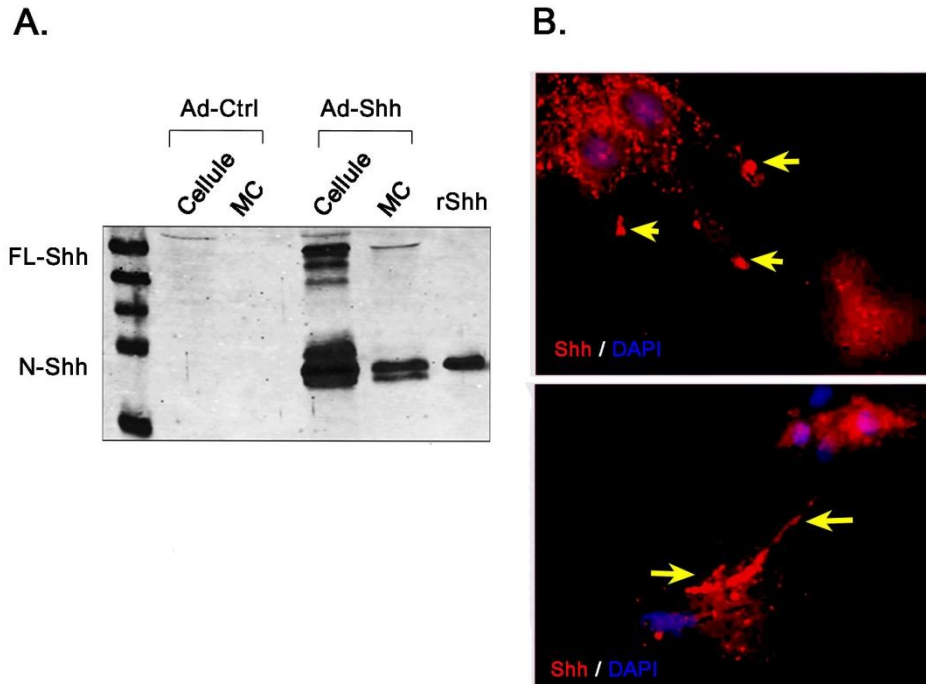
### 1. Expression des 3 Hh dans les CML en culture : modulation par les MC des CE

Les CML maintenues en conditions basales expriment l'ARNm de Shh à un niveau faible mais 100 fois ( $3,6 \cdot 10^4$  copies/cellule) supérieur à celui trouvé dans les CE. Ihh et Dhh ne sont exprimés que très faiblement ( $1,2 \cdot 10^3$  et  $1,1 \cdot 10^3$  copies/ cellule, respectivement) dans les CML.

L'incubation des CML dans un MC par les CE entraîne une augmentation de l'expression de Shh dans les CML. De plus, l'expression de Shh induite dans les CML par les MC de CE stimulées par le VEGF est 3,6 fois plus importante que celle induite par les MC des CE maintenues dans un milieu contrôle. Par contre, Ihh et Dhh ne sont pas modulés (**Fig. 36**).

Ce résultat suggère fortement que :

- les CML ne produisent que du Shh ;
- des facteurs sécrétés dans le MC par les HUVEC sous l'action de VEGF modulent positivement la transcription de Shh dans les CML.



**Figure 37 : Production de Shh dans les CML transduites par un adénovirus codant pour Shh**

$2,5 \cdot 10^5$  CML sont ensemencées dans les puits d'une plaque de 6 puits puis transduites (MOI=50) par l'adénovirus contrôle (Ad-Ctrl) ou par l'adénovirus portant une séquence codante pour la forme complète de Shh (Ad-Shh) pendant 24 heures dans du milieu DMEM riche en sérum. **(A)**. La production/sécrétion de Shh est analysée par Western Blot sur le lysat cellulaire (Cellule) ou le milieu de culture conditionné (MC) en utilisant un anticorps dirigé contre le l'extrémité N-terminale de Shh (H160). rShh : protéine N-Shh recombinante (5 ng/puits). **(B)**. Immunomarquage de Shh sur les CML transduites par l'Ad-Shh :  $8,0 \cdot 10^3$  CML sont ensemencées dans des puits de Labtek à 8 compartiments puis sont transduites par l'Ad-Shh pendant 24 heures (MOI=50). Les cellules sont fixées avec du PFA à 2% 48 heures après la mise au contact avec les adénovirus. Le Shh est recherché par immunohistologie en utilisant l'anticorps 5E1 et les noyaux sont marqués par le DAPI. Les photos montrent 2 images de CML exprimant du Shh. Les flèches jaunes montrent une localisation de Shh dans les extensions cellulaires.



## **2. Effet direct de la surexpression de Shh sur les fonctions cellulaires des CML**

Afin de juger de l'influence de l'expression de Shh par les CML sur leur fonction, il a été envisagé d'induire une surexpression de Shh dans les CML et de suivre leur prolifération et leur migration. Dans ce but, nous disposons un adénovirus codant pour la séquence de la forme complète de Shh (Ad-Shh) et l'effet de la transduction de ce virus dans les CML a été évalué sur des fonctions cellulaires.

### **A. Vérification de l'efficacité des adénovirus-Shh**

L'adénovirus contrôle (Ad-Ctrl) et l'Ad-Shh contiennent une séquence codante pour l'"Enhanced Green Fluorescent protein" (EGFP) qui permet de vérifier l'efficacité de la transduction. Quarante huit heures après la mise en contact avec ces adénovirus, respectivement 96,1% et 94,2% des cellules expriment l'EGFP confirmant la bonne efficacité de la transduction (données non présentées).

Un anticorps dirigé contre la partie N-terminale de Shh, reconnaissant par conséquent la forme longue et la forme sécrétée de Shh, a été utilisé pour suivre, par Western blot, la production et la sécrétion de Shh par les CML transduites ou non par l'Ad-Shh.

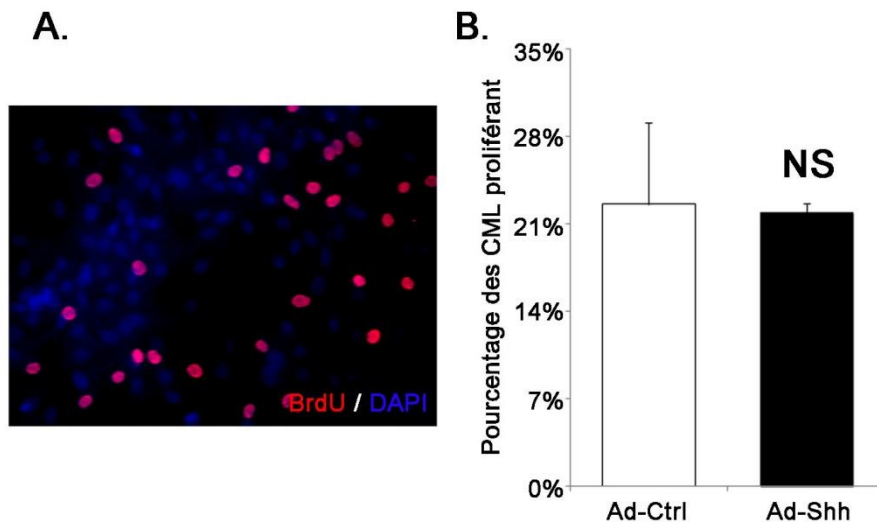
Le niveau de Shh dans les CML transduites par l'Ad-Ctrl et dans leur milieu de culture est trop faible pour permettre sa détection par cette technique. Par contre, dans les CML transduites par l'Ad-Shh, la forme longue à 45 kDa et la forme clivée (N-terminale du Shh) à 19 kDa sont détectées. Dans le MC par ces cellules, seule la forme courte N-Shh est présente (**Fig. 37A**).

L'immunomarquage de Shh réalisé sur les CML transduites par l'Ad-Shh montre que la protéine Shh est localisée au niveau du cytoplasme autour du noyau. De façon intéressante, on la trouve de manière concentrée dans les extensions cellulaires, qui sont particulièrement impliquées dans la migration cellulaire (**Fig. 37B**).

### **B. Effets de la transduction de Shh sur la fonction des CML**

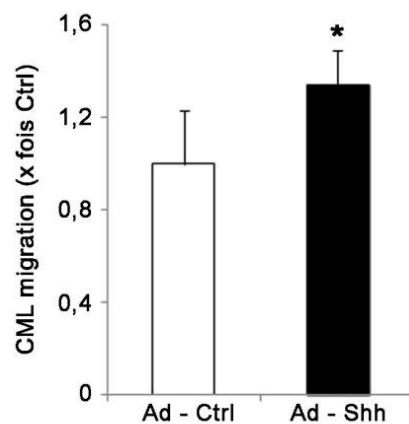
#### ***a. Effet sur la prolifération des CML***

L'incorporation de BrdU est utilisée pour suivre la prolifération cellulaire (**Fig. 38A**). La proportion de CML ayant incorporé la BrdU dans leur noyau est du même ordre dans les CML transduites par l'Ad-Shh que dans les CML transduites par l'Ad contrôle (**Fig. 38B**), suggérant que la surexpression de Shh dans les CML ne module pas la prolifération des CML.



**Figure 38 : Effet de la transduction de la forme complète de Shh sur la prolifération des CML**

7,0.10<sup>3</sup> CML sont ensemencées et transduites par l'Ad-Ctrl ou l'Ad-Shh dans des puits de lames Labtek à 8 compartiments. Elles sont ensuite mises en quiescence puis maintenues dans un milieu sans sérum en présence de BrdU avant d'être incubées par un milieu contenant du BrdU pendant 72 heures. Les CML sont fixées et une immunodétection du BrdU est réalisée (A). L'effet de l'expression de Shh sur la prolifération est rapporté en pourcentage du nombre de CML qui prolifèrent (CML BrdU<sup>+</sup>) par rapport au nombre total de CML (B). Trois puits sont utilisés pour chaque série et l'expérimentation est reproduite 3 fois. Les histogrammes représentent les moyennes  $\pm$  SD. (NS :  $p > 0,05$ )



**Figure 39 : Effet de la transduction de Shh sur la migration réparatrice des CML**

8,0.10<sup>4</sup> CML sont ensemencées par puits d'une plaque de 12 puits, puis transduites par l'adénovirus contrôle (Ad-Ctrl) ou par l'adénovirus Shh (Ad-Shh) pendant 24 heures dans du milieu DMEM riche en sérum (MOI=50). Après 24h, le milieu de transfection est éliminé et les cellules sont incubées pendant 24 heures dans du milieu de croissance, puis placées en quiescence. Une blessure (strie) de la monocouche des CML est réalisée et le comblement de l'espace lésé est suivi pendant 72 heures. L'expérimentation est répétée 3 fois avec 3 puits pour chaque condition. Cinq images sont prises pour chaque condition. Les aires colonisées sont mesurées et comparées avec celles de la condition de contrôle. (\* :  $p < 0,05$ )

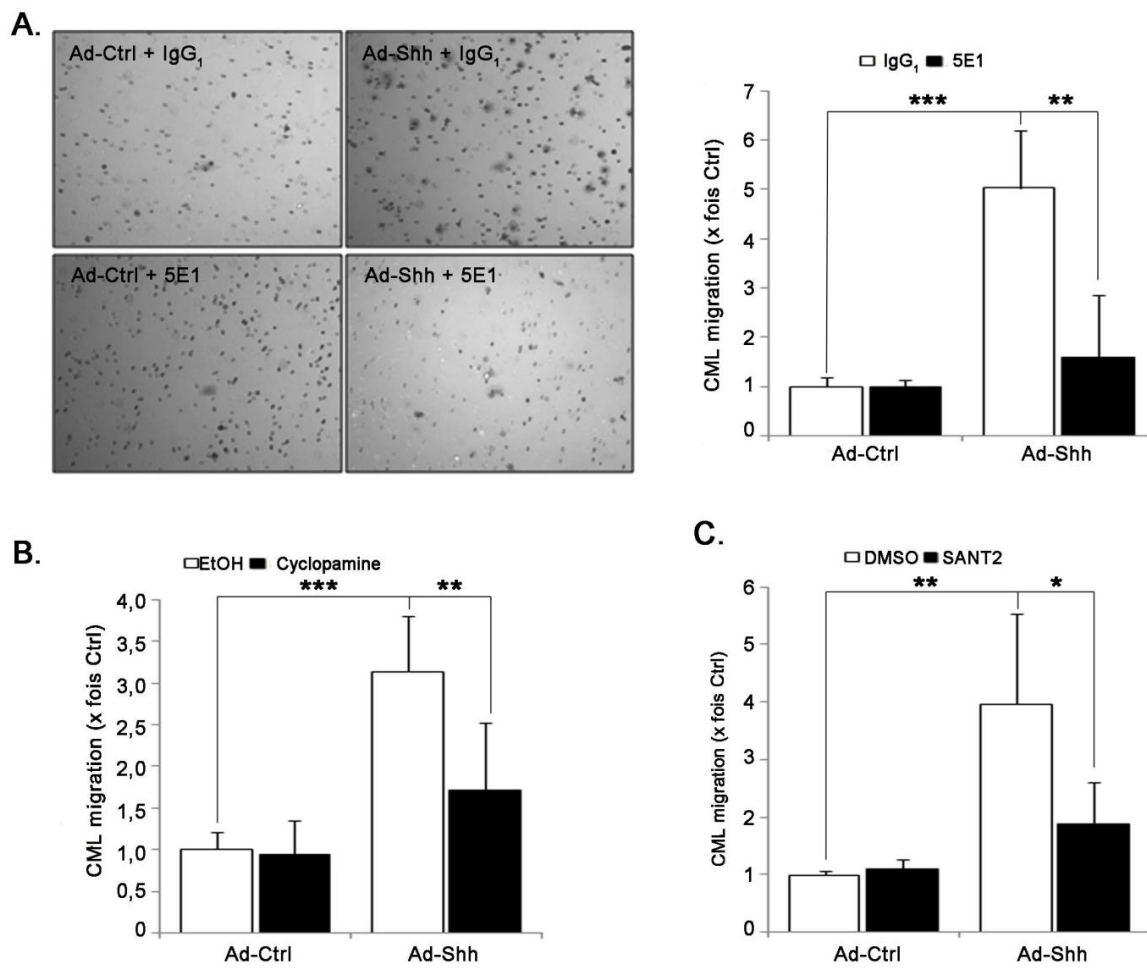
**b. Effet de la transduction de Shh sur la migration des CML**

*i. Migration réparatoire (strie)*

La migration des CML transduites par l'Ad-Shh dans ce modèle est de 32% plus importante que celle des CML transduites par l'Ad-Ctrl (**Fig. 39**).

*ii. Migration en Transwell*

La migration des CML transduites par l'Ad-Shh ou l'Ad-Ctrl a été étudiée comparativement à l'aide du système Transwell.



**Figure 40 : Effet de la transduction de Shh sur le mouvement spontané des CML en Transwell**

6,5.10<sup>4</sup> CML transduites par l'Ad-Ctrl ou par l'Ad-Shh sontensemencées dans la cupule de Transwells qui sont placés dans des puits de plaques de 24 puits contenant ou non (A) un anticorps bloquant dirigé contre les protéines Hh (1,5 µg/mL) ou un inhibiteur spécifique du récepteur Smo : cyclopamine (1 µmol/L) (B) ou SANT2 (100 nmol/L) (C). La migration est stoppée au bout de 6 heures et évaluée par comptage des cellules ayant migré sous la membrane. Trois puits sont utilisés pour chaque série et l'expérimentation est reproduite 3 fois. Les histogrammes représentent les moyennes ± SD. (\* : p<0,05, \*\* : p<0,005 et \*\*\* : p<0,0005)

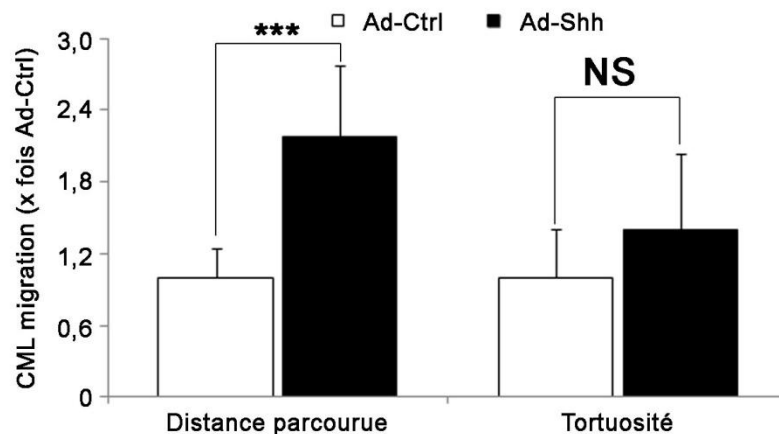
La surexpression de Shh induite par l'adénovirus augmente de 3,8 fois le nombre de CML qui ont traversé la membrane poreuse du Transwell (**Fig. 40A**). Le nombre de CML qui ont migré est réduit de 73% en présence de l'anticorps bloquant anti-Shh 5E1 (**Fig. 40A**), suggérant que la forme sécrétée de Shh est le responsable majeure de la migration aléatoire (chimiokinèse) des CML.

La présence d'antagonistes spécifiques du récepteur Smo, cyclopamine ou SANT2, dans le milieu d'incubation, réduit la migration des CML transduites par l'Ad-Shh de 48% (**Fig. 40B**) et 56% (**Fig. 40C**), respectivement, alors que ces inhibiteurs n'ont aucun effet sur la chimiokinèse des CML transduites par l'Ad-Ctrl.

Ces résultats suggèrent que, pour induire la migration des CML, le Shh transduit doit être sécrétée et doit activer la voie de transduction de Smo.

### iii. Mobilité mesurée par vidéo-microscopie

Pour tester l'effet de la surexpression du Shh par l'Ad-Shh sur le mouvement cellulaire, une analyse de la vélocité des CML par vidéomicroscopie est réalisée. Dans ce cas, la distance parcourue et la tortuosité de la trajectoire des cellules sont suivies pendant 15 heures.



**Figure 41 : Effet de la transduction de Shh sur le mouvement des CML mesuré en vidéomicroscopie**

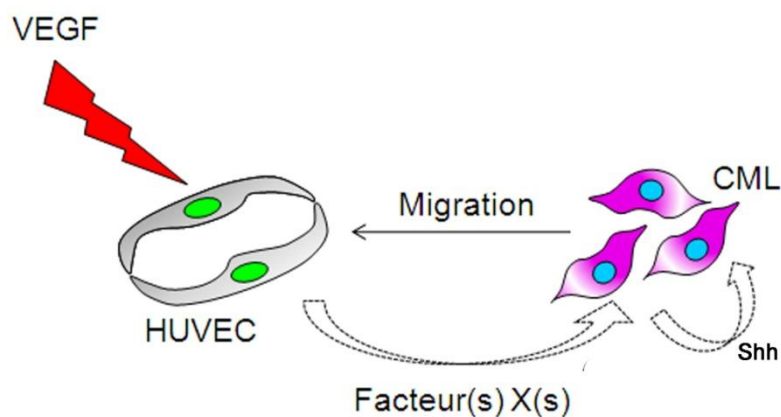
1,5.10<sup>4</sup> CML transduites par l'Ad-Ctrl ou par l'Ad-Shh sontensemencées dans des puits de lames Labtek à 4 compartiments. Elles sont mises en quiescence pendant 24 heures, puis placées sous un microscope inversé Zeiss dans une chambre à 37°C, maintenue à 5% de CO<sub>2</sub>. Une série d'images est alors acquise toutes les 30 minutes, pendant 15 heures, à l'objectif 10X, en contraste de phase et en fluorescence (EGFP) afin d'étudier la dynamique des cellules. Pour déterminer la trajectoire et la tortuosité de la migration, 60 cellules fluorescentes EGFP sont suivies à l'aide du logiciel Axiovision (Zeiss) et les rapports entre les CML transduites par l'Ad-Shh et par l'Ad-Ctrl sont calculés. L'expérimentation est répétée 3 fois avec 3 puits pour chaque condition. Les histogrammes représentent les moyennes ± SD.

La distance parcourue par les cellules transduites par l'Ad-Shh est 120% plus importante que celle des CML transduites par l'Ad-Ctrl, suggérant une augmentation de la vitesse de déplacement dans les CML exprimant Shh. Par contre, les tortuosités des trajectoires des CML transduites par Ad-Ctrl ou Ad-Shh sont identiques (**Fig. 41**), suggérant que l'orientation du mouvement cellulaire n'est pas influencée par Shh.

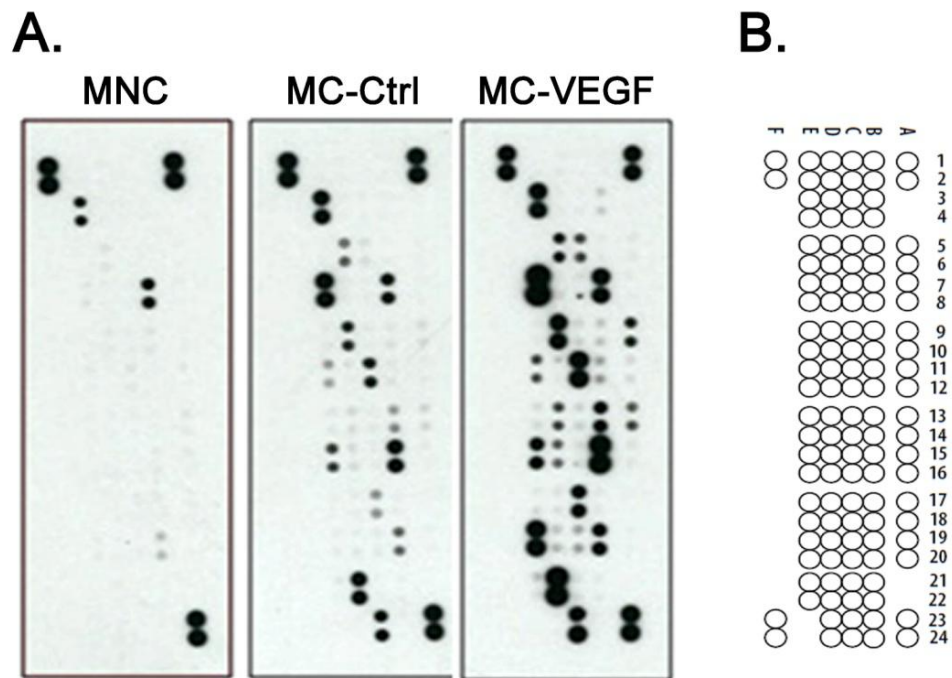
### **3. Conclusion/discussion**

Les résultats dans le **chapitre I** démontrent que les protéines Hh ne sont pas des facteurs produits par les CE. Dans cette partie nous avons mis en évidence une production autocrine de Shh par les CML lorsqu'elles sont soumises à un MC par les HUVEC, en particulier en présence de VEGF. Cependant, les 2 autres Hh, l'Ihh et le Dhh, ne sont pas exprimés par les CML. La transduction des CML par un adénovirus codant pour la forme longue de Shh n'induit pas une synthèse d'ADN plus importante. Cependant, le niveau de la chimiokinèse des CML transduites par l'Ad-Shh est plus élevé que celles transduites par l'Ad-Ctrl.

L'induction de l'expression de Shh par le MC des HUVEC soumises préalablement à l'action du VEGF suggère que les facteurs produits par les CE (HUVEC) jouent aussi un rôle indirect dans le dialogue CE-CML menant à la migration de ces dernières via une activation autocrine de l'expression de Shh dans les CML (**Fig. 42**).



**Figure 42 : Représentation schématique de l'hypothèse que Shh produite par les CML sous l'action des facteurs endothéliaux participe à la migration des CML**



**Figure 43 : Modulation par le VEGF des facteurs sécrétés par les HUVEC**

(A). Les milieux de culture non conditionnés (MNC), ou conditionnés par  $2,5 \cdot 10^5$  HUVEC quiescentes stimulées par le VEGF à 20 ng/mL (MC-VEGF) ou non stimulées (MC Ctrl) sont collectés et incubés avec la membrane d'antibody array sur laquelle ont préalablement été fixés les anticorps spécifiques de 55 facteurs différents. La détection est effectuée par un complexe streptavidine-HRP par chimioluminescence; (B). Numérotation des puits des 55 facteurs testés (voir les correspondances des numéros et des facteurs dans le **Tab. 14**). Cette expérience a été réalisée une seule fois.

## II. CARACTERISATION DES FACTEURS SECRETES PAR LES HUVEC DANS LES MILIEUX CONDITIONNES

Puisque le MC-VEGF des HUVEC est capable de moduler l'expression de Shh et de Gli1 par les CML, les facteurs sécrétés dans ce MC-VEGF sont probablement à l'origine de cet effet. Une approche par "Antibody Array" ciblé sur l'angiogenèse (R&D systems) a été utilisée, permettant de détecter de manière semi-quantitative 55 facteurs solubles impliqués dans le processus angiogénique.

Les différents MC par les CE ont été collectés et leur capacité migratoire sur les CML a été vérifiée par un test de migration en Transwell. Ces milieux ont été ensuite incubés avec les membranes de l'Antibody Array. Le résultat montre la sécrétion de différents facteurs par les HUVEC maintenues en conditions contrôles et l'augmentation de la sécrétion de certains de ces facteurs après stimulation des HUVEC par le VEGF (**Fig. 43**).

La plupart des facteurs détectés par ce kit sont retrouvés dans les milieux conditionnés par les CE. Vingt cinq facteurs sont légèrement augmentés par le VEGF (+ : < 3 fois) ; 7 sont modulés entre 3 et 5 fois (++) ; 4 sont fortement modulés (+++ : > 5 fois et < 10 fois) ; 2 facteurs sont très fortement modulés par le VEGF (++++ : > 10 fois) (**Tab. 14**).

Parmi les facteurs dont la sécrétion est augmentée par le VEGF, certains sont connus pour favoriser la migration des CML (Endostatine, FGF-2, IL8, PDGF BB et uPA), ou au contraire pour l'inhiber (TIMP-1). L'augmentation de la migration des CML ou de l'expression de Shh par le MC-VEGF est probablement la résultante entre les facteurs pro- et anti- migratoires.

## III. IDENTIFICATION DES FACTEURS STIMULANT L'EXPRESSION DE SHH

Notre hypothèse est que les facteurs endothéliaux sécrétés dans le MC-VEGF induisent la migration des CML via une expression des protéines Hh et l'activation de sa signalisation. Le but de cette partie est d'identifier et de cibler des candidats endothéliaux dans la liste obtenue à l'aide du kit Antibody Array selon les critères suivants :

- expression et sécrétion par les CE sont modulées par le VEGF ;
- inducteur de l'expression d'un ou plusieurs Hh dans les CML ;
- activateur de la voie Gli1 dans les CML ;
- et effet stimulateur de la migration partiellement dépendant des protéines Hh

Numéro	Facteur ou Ctrl	MNC	MC Ctrl	MC-VEGF	Augmentation d'expression MC-VEGF/MC Ctrl (x fois)	
A1,A2	Ctrl positif					
A5,A6	activine A	1,0	1,0	1,4	1,4	N/A
A7,A8	ADAMTS-1	1,0	1,1	1,3	1,3	N/A
A9,A10	Angiogenin	1,0	2,2	12,3	5,6	+++
A11,A12	Ang1	1,0	1,4	2,0	1,4	N/A
A13,A14	Ang2	1,0	1,7	7,3	4,2	++
A15,A16	Angiostatin	1,0	1,0	1,7	1,7	+
A17,A18	Amphiregulin	1,0	0,7	0,9	1,3	N/A
A19,A20	Artemin	1,0	1,0	1,5	1,5	+
A23,A24	Ctrl positif					
B1,B2	Coagulation Factor III	1,0	1,0	1,2	1,2	N/A
B3,B4	CXCL 16	1,0	1,0	2,3	2,3	+
B5,B6	DPPIV	1,0	1,0	1,5	1,5	+
B7,B8	EGF	1,0	1,0	1,7	1,7	+
B9,B10	EG-VEGF	1,0	1,0	1,9	1,9	+
B11,B12	Endoglin	1,0	1,7	5,9	3,5	++
B13,B14	Collagen XVIII	1,0	5,2	18,9	3,6	++
B15,B16	Endothelin-1	1,0	23,8	29,2	1,2	N/A
B17,B18	aFGF	1,0	0,8	1,4	1,8	+
B19,B20	bFGF	1,0	2,4	6,7	2,8	+
B21,B22	FGF-4	1,0	0,9	2,0	2,2	+
B23,B24	FGF-7	1,0	1,0	1,6	1,6	+
C1,C2	GDNF	1,0	1,0	1,2	1,2	N/A
C3,C4	GM-CSF	1,0	0,9	1,2	1,3	N/A
C5,C6	HB-EGF	1,0	1,7	8,9	5,2	+++
C7,C8	HGF	1,0	1,0	2,9	2,9	+
C9,C10	Leptin	1,0	1,2	4,8	4	++
C11,C12	IGFBP-1	1,0	1,2	2,6	2,2	+
C13,C14	IGFBP-2	1,0	9,4	20,1	2,1	+
C15,C16	IGFBP-3	1,0	1,4	2,7	1,9	+
C17,C18	IL-1 $\beta$	1,0	1,5	3,1	2,0	+
C19,C20	IL-8	1,0	5,1	20,1	3,9	+
C21,C22	LAP (TGF- $\beta$ 1)	1,0	1,2	24,9	20,8	++++
C23,C24	MCP-1	1,0	18,7	31,2	1,7	+
D1,D2	MIP-1 $\alpha$	1,0	0,9	1,1	1,2	N/A
D3,D4	MMP-8	1,0	1,0	1,4	1,4	N/A
D5,D6	MMP-9	1,0	4,6	7,9	1,7	+



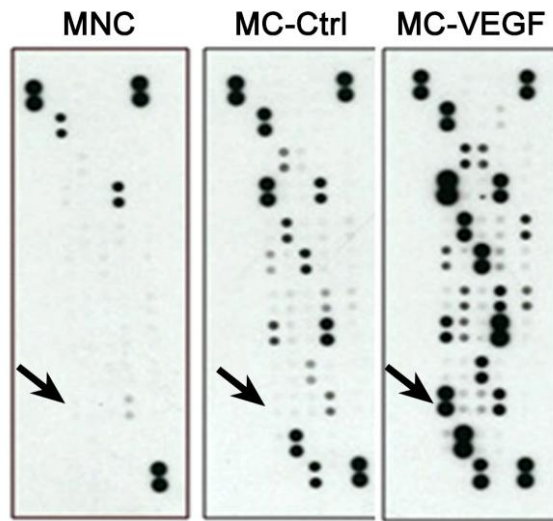
D7,D8	NRG1-b1	1,0	1,7	3,5	2.1	+
D9,D10	Pentraxin3 (PTX3)	1,0	8,0	18,7	2.4	+
D11,D12	PD-ECGF	1,0	1,6	3,2	2.0	+
D13,D14	PDGF-AA	1,0	1,8	8,3	4.6	++
D15,D16	PDGF-AB/PDGF-BB	1,0	1,8	12,7	7.1	+++
D17,D18	Persephin	1,0	1,0	1,8	1.8	+
D19,D20	Platelet Factor (PF4)	1,0	1,0	5,1	5.1	+++
D21,D22	PIGF	1,0	1,5	25,6	17,0	++++
D23,D24	Prolactin	1,0	0,8	1,2	1.5	+
E1,E2	Serphin B5	1,0	0,9	1,1	1.2	N/A
E3,E4	Serphin E1	1,0	1,9	2,2	1.2	N/A
E5,E6	Serphin F1	1,0	1,2	1,4	1.2	N/A
E7,E8	TIMP-1	1,0	22,8	24,7	1.1	N/A
E9,E10	TIMP-4	1,0	1,5	1,8	1.2	N/A
E11,E12	Thrombospondin-1	1,0	4,3	8,1	1.9	++
E13,E14	Thrombospondin-2	1,0	1,5	2,1	1.4	N/A
E15,E16	uPA	1,0	11,9	23,9	2.0	+
E17,E18	Vasohibin	1,0	1,0	1,8	1.8	+
E19,E20	VEGF	1,0	1,3	48,1	37	
E21,E22	VEGF-C	1,0	1,1	4,4	4.0	++
F1,F2	Ctrl positif					
F23,F24	Ctrl négatif					

**Tableau 14 : Quantification des facteurs sécrétés par les HUVEC**

La sécrétion des facteurs endothéliaux est quantifiée selon le niveau de gris des différents spots révélés la membrane de l'Antibody Array quantifié à l'aide du logiciel Image J. L'augmentation de la sécrétion de chaque facteur est exprimée en nombre de fois par rapport au MNC. Le nombre de + indique les différents niveaux d'activation de facteurs présents dans le MC-VEGF par rapport aux ceux dans le MC Ctrl. (Rouge : facteurs inducteurs de la migration des CML, bleu : facteurs inhibiteurs de la migration et noir : facteurs dont l'effet sur la migration des CML est inconnu ou controversé)

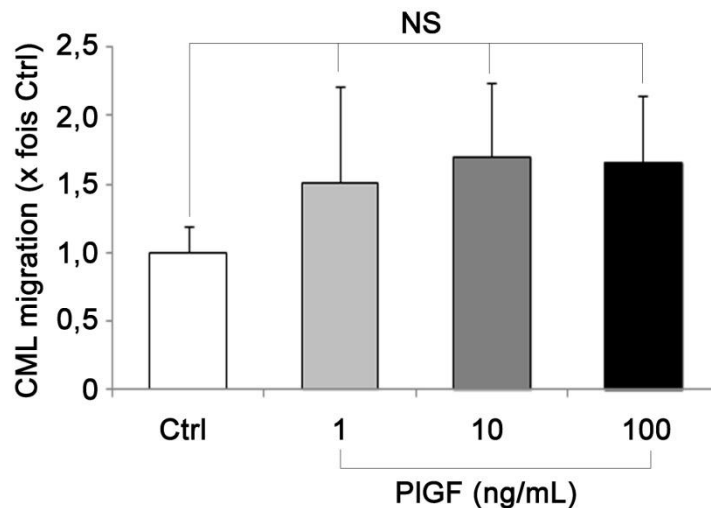
### **1. Le PIGF**

Le Placental Growth Factor (PIGF) appartient à la superfamille du VEGF. Il joue un rôle dans de multiples processus, tels que l'hématopoïèse, la lymphangiogenèse, la vasculogenèse et l'angiogenèse. Le test d'"Antibody Array" montre que le PIGF n'est pas sécrété par les HUVEC non stimulées mais que sa sécrétion est fortement augmentée après stimulation par le VEGF (25,6 fois) (**Tab. 14 et Fig. 44**).



**Figure 44 : Sécrétion par les HUVEC du PIGF**

Le PIGF (flèches noires) présent dans les MC des HUVEC est détecté par Antibody Array et fortement augmenté par le VEGF



**Figure 45 : Migration des CML induite par le PIGF**

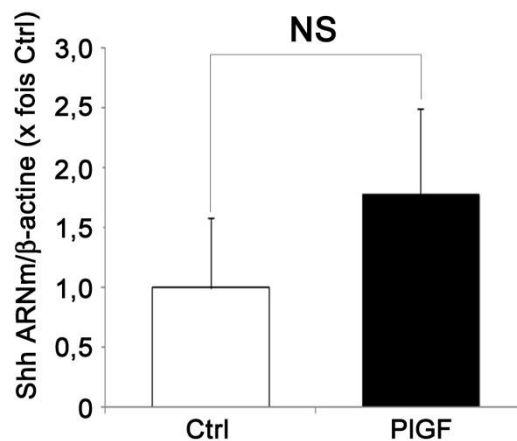
$6,5 \times 10^4$  CML quiescentes sont ensemencées dans la cupule supérieure de Transwells placés dans des puits de plaque 24 puits. L'effet des différentes concentrations de PIGF (1, 10 ou 100 ng/mL) sur la migration des CML pendant 6 heures est évalué à l'aide du système Transwell. Trois puits sont utilisés pour chaque série et l'expérimentation est reproduite 3 fois. Les histogrammes représentent les moyennes  $\pm$  SD. (NS :  $p > 0,05$ )

### A. Effet du PIGF sur la migration des CML

La migration des CML n'est pas induite par le PIGF recombinant quelles que soient les concentrations utilisées (de 1 ng/mL à 100 ng/mL), indiquant que ce facteur n'est pas chimiotactique pour les CML (**Fig. 45**). Ce résultat est en contradiction avec les données de la littérature qui le décrivent comme un inducteur de la migration des CML, même s'il est moins puissant que le PDGF BB à la même concentration (Ishida et al., 2001). Cette différence provient probablement d'une origine différente des CML utilisés dans nos expériences et celles décrites par Ishida et al. (Ishida et al., 2001).

### B. Effet du PIGF sur l'expression de Shh dans les CML

Malgré son absence d'effet sur la migration des CML nous avons vérifié si le PIGF était susceptible d'induire l'expression de Shh dans les CML. Nos résultats montrent que le PIGF (10 ng/mL) n'induit pas l'expression des ARNm de Shh (**Fig. 46**).

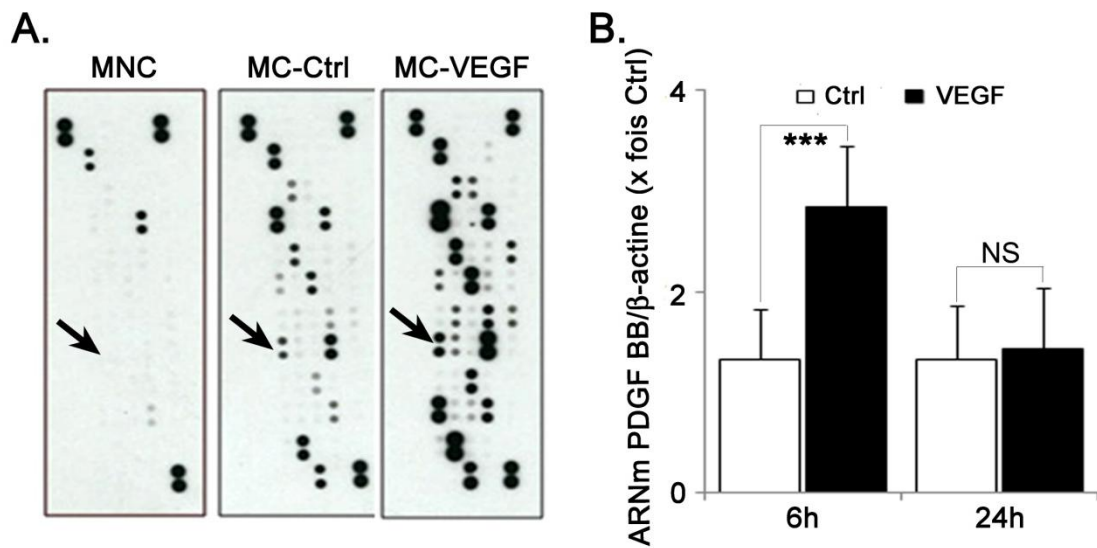


**Figure 46 : Effet du PIGF sur le niveau d'expression de Shh dans les CML**

Les ARNm sont extraits à partir de  $2,5 \cdot 10^5$  CML stimulées par PIGF (10 ng/mL) pendant 6 heures. Le niveau d'expression des ARNm de Shh est déterminé par RT-qPCR en utilisant des amorces spécifiques. Trois puits sont utilisés pour chaque série et l'expérimentation est reproduite 3 fois. Les histogrammes représentent les moyennes  $\pm$  SD. (NS :  $p > 0,05$ )

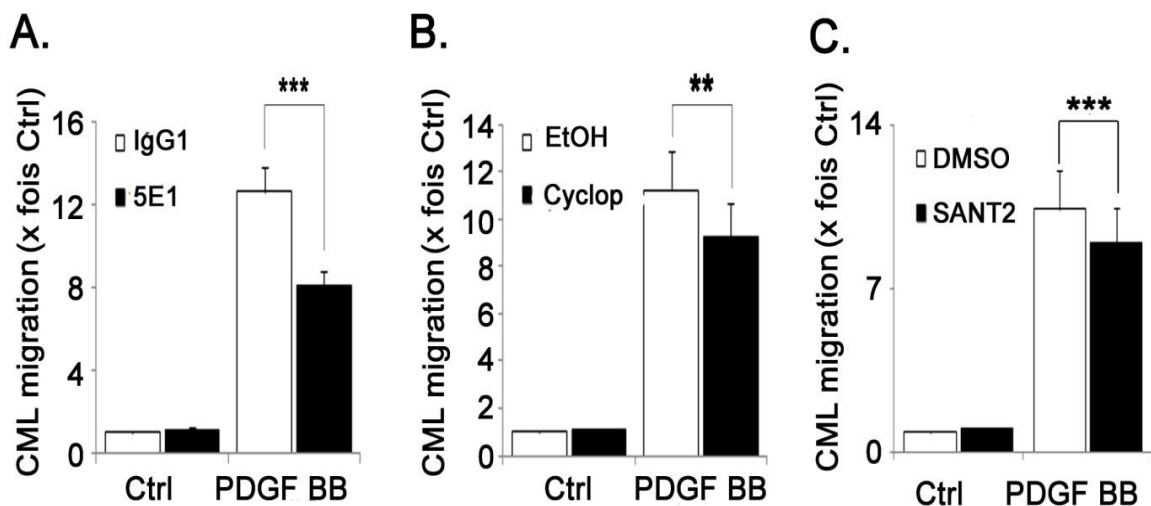
### C. Conclusion

Même si le PIGF est fortement sécrété par les CE stimulées par le VEGF, il n'est pas chimiotactique dans nos conditions expérimentales pour les CML et ne module pas non plus l'expression de Shh dans ces cellules. Il ne correspond donc pas au facteur endothélial recherché.



**Figure 47 : Sécrétion par les HUVEC du PDGF BB**

(A). Le PDGF BB (flèches noires) présent dans les MC des HUVEC est détecté par Antibody Array selon la recommandation du fournisseur. (B). Le niveau des ARNm du PDGF BB est évalué par qPCR dans des HUVEC stimulées ou non par le VEGF pendant 6 ou 24 heures. Trois puits sont utilisés pour chaque série et l'expérimentation est reproduite 3 fois. Les histogrammes représentent les moyennes  $\pm$  SD. (\*\*\*) :  $p < 0,0005$  et NS :  $p > NS$ )



**Figure 48 : Rôle des protéines Hh dans la migration des CML induite par le PDGF BB**

$6,5 \times 10^4$  CML quiescentes sont ensemencées dans la cupule supérieure de Transwells placés dans des puits de plaque 24 puits. Les puits contiennent ou non du PDGF BB (10 ng/mL) en présence ou non des inhibiteurs (A) 5E1 (1,5  $\mu$ g/mL), (B) cyclopamine (Cyclop : 1  $\mu$ mol/L) et (C) SANT2 (100 nmol/L). Un anticorps de même type a été utilisé dans la condition contrôle pour l'expérience avec le 5E1. La migration est évaluée au bout de 6 heures. Trois puits sont utilisés pour chaque série et l'expérimentation est reproduite 3 fois. Les histogrammes représentent les moyennes  $\pm$  SD. (\*\* :  $p < 0,005$  et \*\*\* :  $p < 0,0005$ )

## **2. Le PDGF BB**

Le PDGF BB est non seulement un facteur migratoire majeur des CML, mais c'est aussi un facteur qui joue un rôle prépondérant dans la maturation des vaisseaux sanguin au cours de l'embryogenèse et dans l'angiogenèse postnatale (Enge et al., 2002; Hellstrom et al., 1999).

### **A. Production du PDGF BB par les HUVEC**

Le PDGF BB est faiblement sécrété par les HUVEC non stimulées (1,8 fois). Par contre sa sécrétion est fortement augmentée par la stimulation des CE par le VEGF (12,7 fois) (**Tab. 14 et Fig. 47A**). L'ARNm du PDGF BB est aussi augmentée 6 heures après la mise en contact des CE avec le VEGF et l'expression revient au niveau basal 24 heures après la stimulation (**Fig. 47B**).

### **B. Implication de la voie Hh dans la migration des CML induite par le PDGF BB**

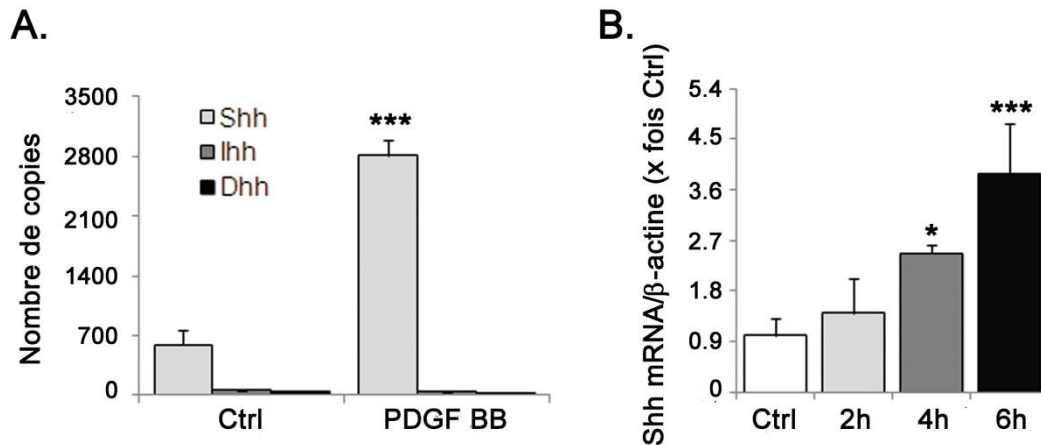
Comme attendu, le PDGF BB recombinant induit la migration des CML (**Fig. 48**). La migration des CML induite par le PDGF BB est diminuée de 41% par un anticorps bloquant dirigé contre les protéines Hh (**Fig. 48A**). De plus, deux inhibiteurs du récepteur Smo, cyclopamine et SANT, réduisent respectivement de 21% et de 19% la migration des CML induite par le PDGF BB (**Fig. 48B et C**).

Ces résultats indiquent que les protéines Hh sont impliquées dans l'induction de la migration des CML par le PDGF BB. L'utilisation des inhibiteurs pharmacologiques suggèrent que le récepteur Smo participerait à cet effet. Cependant, l'inhibition par des molécules plus spécifiques est nécessaire pour confirmer ce résultat. Ainsi, la migration des CML induite par le PDGF BB est dépendante de la sécrétion des protéines Hh et de l'activation de sa signalisation suggérant que le PDGF BB pourrait induire l'expression et/ou la sécrétion de protéines Hh.

### **C. Production des protéines Hh par les CML stimulées par le PDGF BB**

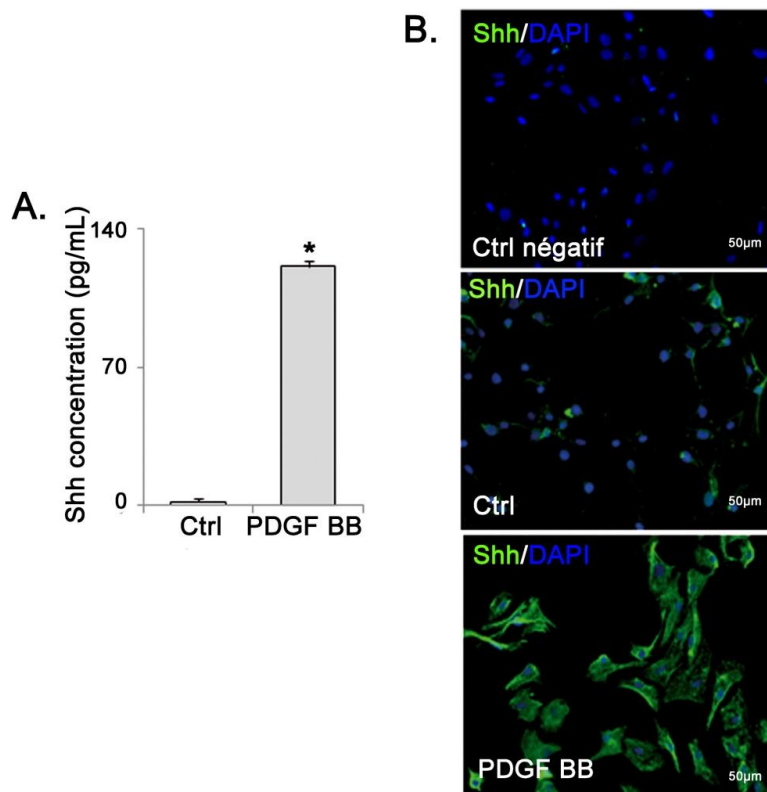
#### ***a. Modulation des ARNm des Hh par le PDGF BB***

Après stimulation des CML par le PDGF BB pendant 6 heures, l'ARNm de Shh est augmenté de 3,2 fois, tandis que l'expression d'Ihh ou de Dhh n'est pas modifiée (**Fig. 49A**). L'augmentation de la quantité des ARNm de Shh devient significativement différente du niveau basal dès la 4<sup>ème</sup> heure après la stimulation par le PDGF BB (**Fig. 49B**).



**Figure 49 : Niveau d'expression des Hh dans les CML par le PDGF BB**

$2,5 \cdot 10^5$  CML sont stimulées par PDGF BB (10 ng/mL) pendant 6 heures. Le nombre de copies de l'ARNm des différents Hh par cellule est quantifié par qPCR par comparaison avec des gammes d'étalonnage plasmidiques spécifiques (A). Expression de Shh dans les CML 2, 4 et 6 heures après la stimulation par le PDGF BB (B). Trois puits sont utilisés pour chaque série et l'expérimentation est reproduite 3 fois. Les histogrammes représentent les moyennes  $\pm$  SD. (\* :  $p < 0,05$  et \*\*\* :  $p < 0,0005$ )



**Figure 50 : Détection de la protéine Shh dans les CML stimulées par le PDGF BB**

(A).  $2,5 \cdot 10^5$  CML sont ensemencées et mises en quiescence pendant 24 heures. Elles sont ensuite stimulées ou non (Ctrl) par PDGF BB (10 ng/mL) pendant 24 heures et les MC de ces CML sont collectés et filtrés. La concentration de Shh est dosée à l'aide d'un test ELISA. Trois puits sont utilisés pour chaque condition. Les histogrammes représentent les moyennes  $\pm$  SD. (\* :  $p < 0,05$ ) (B). La protéine Shh (vert) est détectée par immunofluorescence dans des CML stimulées ou non par le PDGF BB, en utilisant un anticorps dirigé contre les protéines Hh (5E1) et un anticorps secondaire couplé au fluorochrome Alexa-488<sup>®</sup>. Le contrôle négatif (Ctrl négatif) est réalisé par incubation des CML avec le seul anticorps secondaire. Les noyaux sont marqués par le DAPI (bleu). L'image montrée est le résultat représentatif de 3 expérimentations différentes.

**b. Modulation de la production et de la sécrétion de la protéine Shh par le PDGF BB dans les CML**

La sécrétion de Shh est dosée dans le milieu de culture de CML stimulées ou non par le PDGF BB à l'aide d'un kit ELISA (R & D systems) intégrant un anticorps dirigé contre la partie N-terminale de la protéine Shh murine. Ce kit permet aussi la détection du Shh de rat et ne reconnaît que faiblement Ihh et Dhh .

Dans le MC par  $2,0 \cdot 10^5$  CML incubées pendant 24 heures dans 10 mL de milieu contenant 10 ng/mL de PDGF BB, la concentration de Shh est de 125 pg/mL, soit 50 fois plus que celle trouvée dans le milieu de culture des CML non stimulées par le PDGF BB (**Fig. 50A**). Dans les CML traitées par le PDGF BB, la protéine Shh est aussi détectée dans le cytoplasme et sur la membrane plasmique (**Fig. 50B**). Par contre, la protéine Shh n'est pas détectée dans les CML maintenues en conditions basales

**c. Activation de la voie Gli par Shh produit par les CML traitées par le PDGF BB**

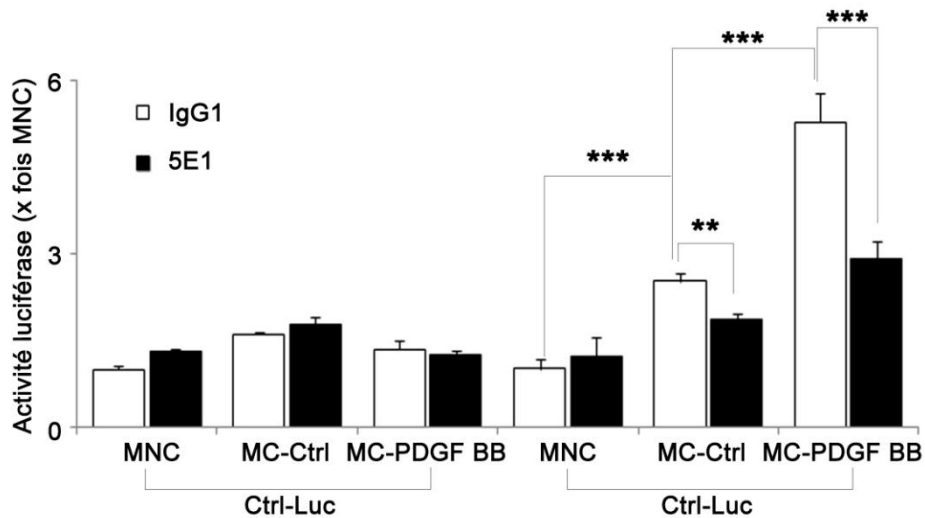
Afin de vérifier que le Shh sécrété par les CML stimulées par le PDGF BB est fonctionnel et donc capable d'induire une réponse cellulaire, nous avons cherché à savoir si le Shh contenu dans les MC des CML traitées par le PDGF BB pouvaient induire l'activation d'un gène rapporteur de la voie Hh, à savoir le gène Gli1.

Pour cela, des fibroblastes 3T3 rendus quiescents par privation de sérum ont été co-transfectées par un plasmide rapporteur dans lequel le gène de la luciférase est placé sous le contrôle de 8 sites Gli1 consensus (Gli1-Luc) ou par un plasmide contrôle (Ctrl-Luc), et un plasmide codant pour la  $\beta$ -galactosidase (pHook). Ces fibroblastes ont alors été incubés dans du MNC et des MC par les CML non stimulées (MC-Ctrl) ou traitées par le PDGF BB (MC-PDGF BB). La luminescence émise est déterminée pour évaluer le niveau d'activation de la transcription Gli-dépendante dans les diverses conditions expérimentales.

Le MC-Ctrl active légèrement la transcription de la luciférase (2,5 fois), démontrant qu'il existe une activation basale de Gli dans ce système. L'activation de la luciférase par le MC-PDGF BB est encore plus importante (5,3 fois) que celle induite par le MC-Ctrl, signifiant une production plus importante de Gli1 probablement due à la présence de Shh produit et sécrété par les CML sous l'effet du PDGF BB (**Fig. 51**).

Afin de vérifier que c'est bien le Shh produit par les CML et contenu dans le MC qui est responsable de l'activation de Gli1, l'expérience est effectuée en utilisant un anticorps

bloquant dirigé contre les protéines Hh (5E1). Dans ces conditions, l'activation du promoteur de Gli1 induite par le MC-PDGF BB est diminuée de 54% (**Fig. 51**). L'activation par le MC Ctrl est elle aussi réduite mais de façon plus modeste.



**Figure 51 : Effet des MC par les CML sur l'activation du gène rapporteur Gli1-Luc**  
 $2,5 \cdot 10^5$  CML par puits sontensemencées dans les puits d'une plaque de 6 puits et sont mises en quiescence dans du milieu sans sérum pendant 24 heures, puis stimulées ou non par le PDGF BB (10 ng/mL). Les MC sont collectés, puis filtrés.  $3 \cdot 10^4$  cellules 3T3 par puits sontensemencées dans une plaque de 24 puits et transfectées ou non par un plasmide codant pour la luciférase sous le contrôle de 8 sites de Gli1 consensus ou un plasmide contrôle. Après 24 heures de quiescence, les fibroblastes 3T3 transfectées sont mis en contact avec le MNC ou les différents MC des CML (MC-Ctrl ou MC-PDGF BB) pendant 24 heures. Après lyse des cellules, l'émission des photons générés est évaluée à l'aide d'un luminomètre. Trois puits sont utilisés pour chaque série et l'expérimentation est reproduite 3 fois. Les histogrammes représentent les moyennes  $\pm$  SD. (\*\* :  $p < 0,005$  et \*\*\* :  $p < 0,0005$ ).

#### *d. Conclusions*

Ces différentes expérimentations démontrent que la protéine Hh sécrétée dans le milieu de culture des CML sous stimulation de PDGF BB est Shh et que le Shh sécrété est fonctionnel puisqu'il est capable d'induire l'activation du promoteur de Gli1 et son expression.

### **D. Place de Shh dans la migration des CML induite par le PDGF BB**

Les résultats précédents démontrent que la protéine Shh produite dans le MC par les CML stimulées par le PDGF BB est fonctionnelle. Notre objectif suivant a été de confirmer le rôle de Shh dans la migration des CML induite par le PDGF BB via le blocage de l'expression de Shh par une stratégie siRNA.

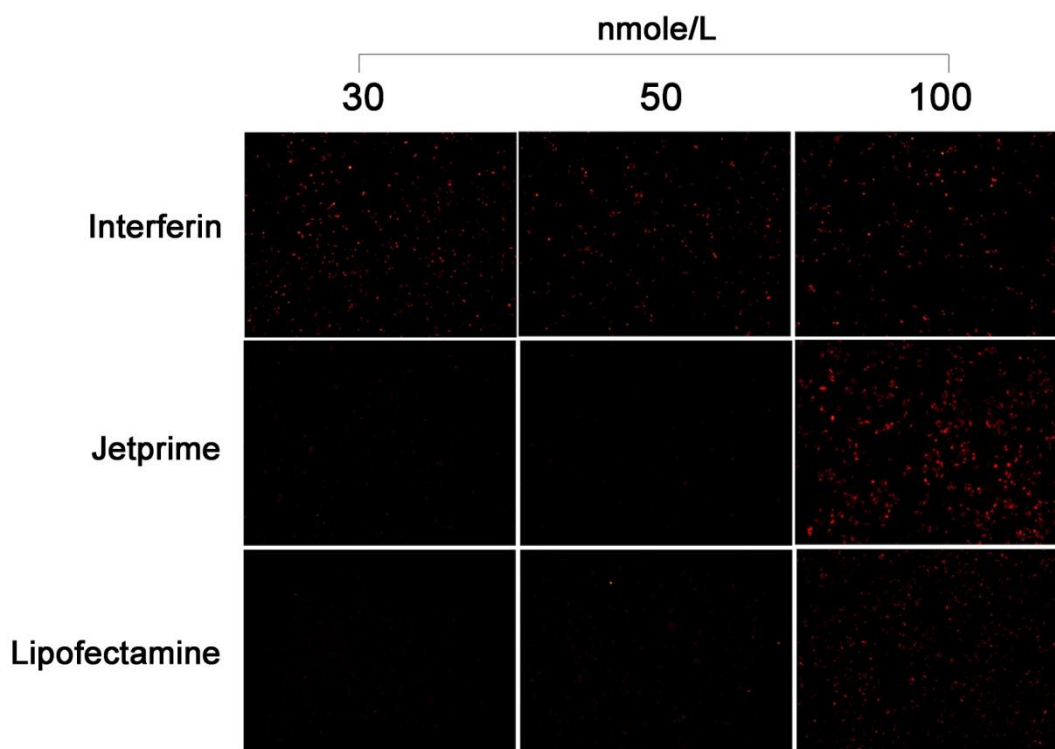
#### *a. Test de transfection des si RNA dans les CML*

Trois agents transfectants sont testés pour optimiser la transfection par les siRNA : l'interféline, le JetPrime et la lipofectamine. Les tests de transfection sont réalisés avec un



siRNA dirigé contre la Cyclophiline B (siGlo : Cyclophiline B siRNA) couplé au Cy3. La cyclophiline B est fortement exprimée dans les cellules de rat et l'inactivation n'a pas d'effet sur la viabilité cellulaire. Les cellules sontensemencées à faible densité et transfectées selon les recommandations des fournisseurs avec différentes concentrations de siRNA (30, 50 et 100 nmol/L dans le milieu de transfection) et durant 4 heures.

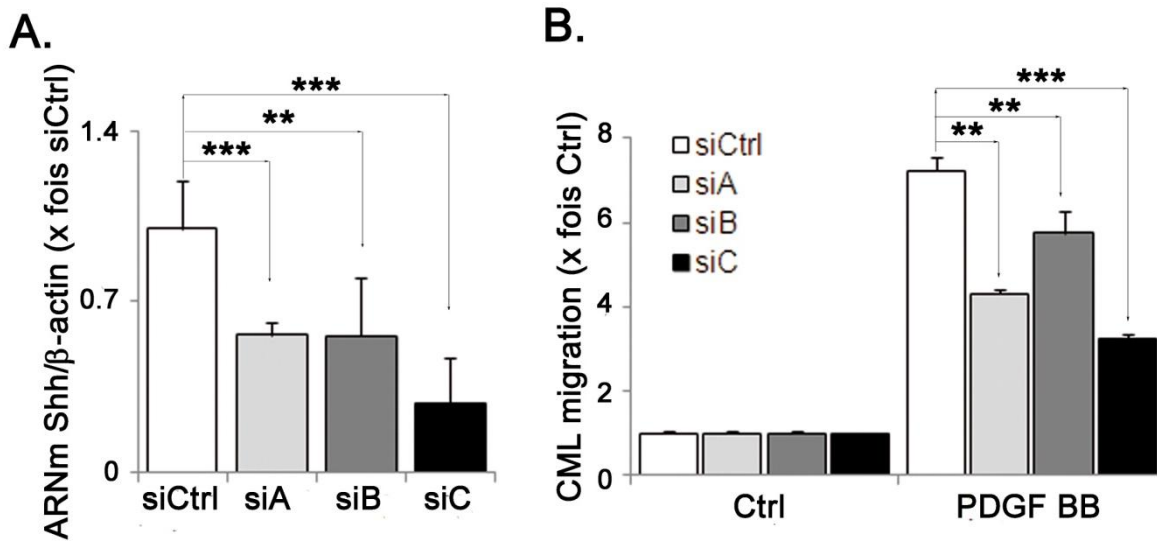
Dans toutes les conditions testées, les cellules survivent et la mort cellulaire n'est pas observée (données non-présentées). L'interférine s'est révélée la plus efficace puisque en terme de nombre de cellules ayant reçu le siRNA (environ 100% des cellules sont fluorescentes) quelle que soit la concentration de siRNA. Le JetPrime et la lipofectamine n'atteignent l'efficacité de 100% qu'en utilisant la concentration de 100 nmol/L de siRNA (**Fig. 52**). Pour les expérimentations qui suivent, l'interférine et la concentration de 30 nmol/L de siRNA ont été utilisées.



**Figure 52 : Recherche des conditions optimales pour la transfection des CML par des siRNA**  
 $4,0 \cdot 10^4$  CML sont ensemencées par puits d'une plaque de 24 puits et transfectées par un siGlo couplé au Cy3 (30 nmole/L, 50 nmole/L et 100 nmole/L) à l'aide d'Interferine®, de JetPrime ou de Lipofectamine pendant 4 heures selon la recommandation des fournisseurs. 48 heures après la transfection, l'efficacité de la transfection est déterminée par détection de la fluorescence.

**b. Effet de l'inhibition de l'expression de Shh sur la migration des CML induite par PDGF BB**

L'efficacité de 3 siRNA-Shh (siA, siB et siC) est testée sur l'inhibition de l'expression de Shh (déterminée par qPCR) dans des CML quiescentes en comparaison à un siRNA contrôle. Les 3 siRNA-Shh inhibent respectivement de 43%, 44% et 78% l'expression de Shh (Fig. 53A). La migration induite par le PDGF BB des CML transfectées par ces siRNA-Shh est diminuée respectivement de 41%, 23% et 55% (Fig. 53B).

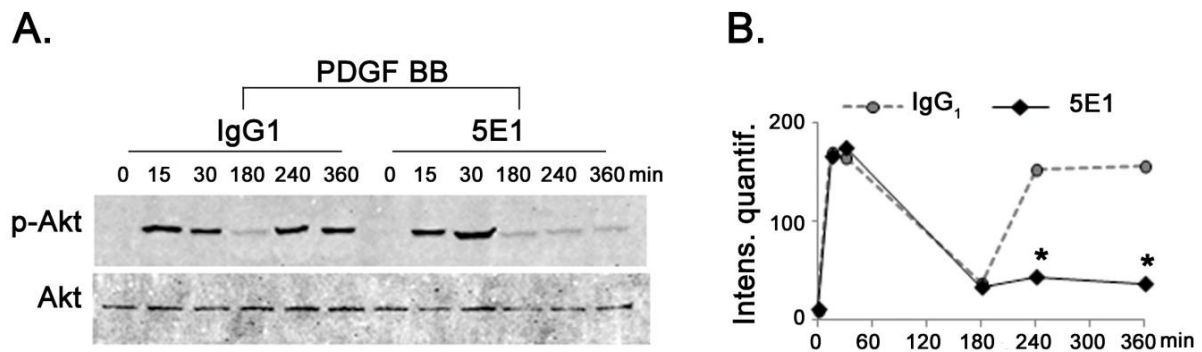


**Figure 53 : Rôle de Shh sur la migration des CML induite par le PDGF BB**

2,5.10<sup>5</sup> CML par puits sont ensemencées dans une plaque de 6 puits et transfectées par différents siRNA-Shh ou un siRNA contrôle (siCtrl) à l'aide d'Interferine<sup>®</sup> pendant 24 heures. (A). L'efficacité d'inhibition des ARNm de Shh est évaluée par qPCR 48 heures après la transfection; (B). 6,5.10<sup>4</sup> CML transfectées par le siCtrl ou les siRNA-Shh sont déposées dans la cupule supérieure du Transwell. Les puits dans lesquels sont insérés les Transwells contiennent ou non du PDGF BB (10 ng/mL). La migration est stoppée au bout de 6 heures et évaluée. Trois puits sont utilisés pour chaque série et l'expérimentation est reproduite 3 fois. Les histogrammes représentent les moyennes  $\pm$  SD. (\*\* : p<0,005 et \*\*\* : p<0,0005)

Ainsi, l'inhibition de l'expression de Shh par des siRNA spécifiques inhibe partiellement la migration des CML induite par le PDGF BB, confirmant que le Shh produit autocrinement par la CML sous l'effet du PDGF BB, est impliqué dans l'effet chimiotactique de ce facteur. Comme nous avons montré que les effets chimiotactiques de Shh étaient modestes, et qu'aucun mécanisme n'a encore été décrit qui pourrait expliquer son action dans l'effet du PDGF BB, il peut être envisagé que Shh agit en induisant des voies de signalisation complémentaires ou synergiques à celles induites par le PDGF BB.





**Figure 54 : Rôle du Shh autocrine dans l'activation de la PI3K induite par le PDGF BB dans les CML**

2,5.10<sup>5</sup> CML sont ensemencées dans un puits d'une plaque de 6 puits et mises en quiescence dans du DMEM à 0% de sérum pendant 24 heures. Elles sont alors stimulées par le PDGF BB en présence ou non d'un anticorps bloquant dirigé contre les Hh, le 5E1 (1,5 µg/mL). L'activation est arrêtée 15, 30, 180, 240 ou 360 minutes après le traitement. Les protéines sont ensuite extraites après lyse des cellules et séparées par électrophorèse PAGE-SDS. La p-Akt (Ser473) et l'Akt totale sont détectées par Western blot en utilisant des anticorps spécifiques (**A**). Les niveaux de gris de chaque bande sont quantifiés à l'aide du logiciel Image J (**B**). L'immunoblot présenté est représentatif de 3 expérimentations indépendantes.

# CHAPITRE V : MECANISMES D'ACTION DE SHH AUTOCRINE DANS LA MIGRATION DES CML INDUITE PAR PDGF BB

---

## I. MODULATION DES VOIES DE TRANSDUCTION DU SIGNAL

Afin de déterminer plus précisément le mécanisme de la participation de Shh dans la migration des CML induite par le PDGF BB, différentes voies de signalisation ont été étudiées. Nos résultats précédents ont montré que, outre sa capacité à stimuler la voie de signalisation canonique Hh (stimulation de l'expression de Gli1), Shh induit aussi une phosphorylation des MAPK ERK1/2 et de l'Akt via la PI3K $\gamma$ . C'est pourquoi nous sommes intéressés à identifier le rôle de ces voies dans les effets du PDGF BB.

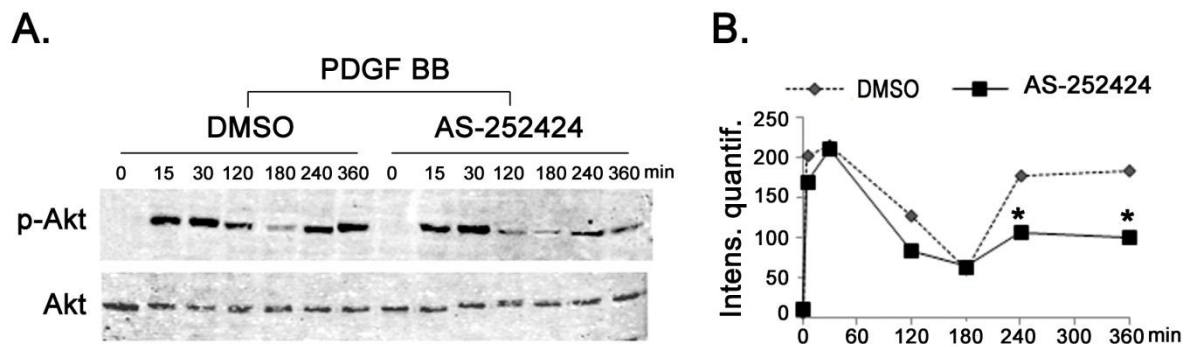
### 1. La voie PI3K $\gamma$

Après stimulation des CML par le PDGF BB, l'Akt est phosphorylée via l'activation de la PI3K (**Fig. 54A**). Une phase rapide et transitoire de phosphorylation (ser473) est observée avec un pic à 15 minutes suivi d'un retour au niveau de base 3 heures après la stimulation. Au delà de la 3<sup>ème</sup> heure, on observe une nouvelle augmentation de la phosphorylation de l'Akt et le niveau d'activation se maintient au moins jusqu'à la 6<sup>ème</sup> heure.

La présence d'un anticorps dirigé contre les Hh dans le milieu d'incubation inhibe la phase tardive de phosphorylation de l'Akt (4 à 6 heures) tandis que la phase précoce n'est pas affectée (**Fig. 54B**), suggérant que la phase tardive de phosphorylation de l'Akt est dépendante de l'expression autocrine de Shh.

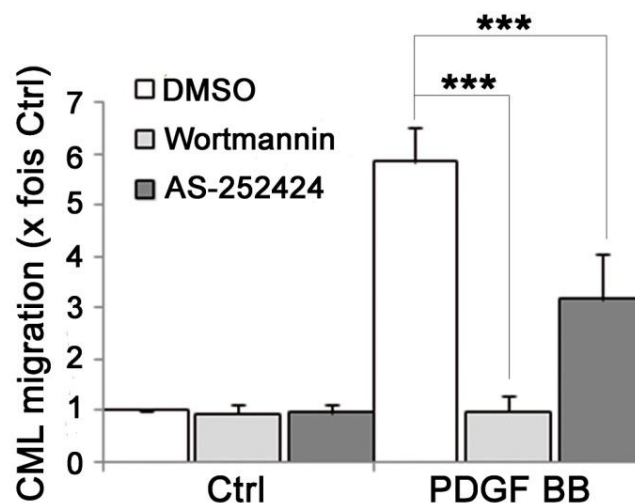
Etant donné que nous avons démontré précédemment (**Fig. 34B**) que Shh est un inducteur de la PI3K $\gamma$ , nous avons posé l'hypothèse que la phase tardive de la phosphorylation d'Akt est aussi dépendante de la PI3K $\gamma$ .

Si l'activation des CML par le PDGF BB est effectuée en présence d'un inhibiteur sélectif de la PI3K $\gamma$ , la phase tardive de phosphorylation de l'Akt est effectivement inhibée partiellement par l'AS-252424, un inhibiteur sélectif de la PI3K $\gamma$ , alors que la phase précoce n'est pas touchée par cet inhibiteur, confirmant que le PDGF BB qui se fixe sur un récepteur à activité tyrosine kinase, est un inducteur des PI3K $\alpha/\beta/\delta$ .



**Figure 55 : Implication de la PI3K $\gamma$  dans la phosphorylation tardive de l'Akt induite par le PDGF BB dans les CML**

$2,5 \cdot 10^5$  CML sont stimulées par le PDGF BB en présence ou non d'un inhibiteur sélectif de la PI3K $\gamma$  (AS-252424, 100 nmole/L). L'activation est arrêtée 15, 30, 180, 240 ou 360 minutes après le traitement. La p-Akt (Ser473) et l'Akt totale sont détectées par Western blot en utilisant des anticorps spécifiques (A). Les niveaux de gris de chaque bande sont quantifiés à l'aide du logiciel Image J (B). L'immunoblot présenté est représentatif de 3 expérimentations indépendantes.



**Figure 56 : Rôle de la PI3K $\gamma$  dans la migration des CML induite par le PDGF BB**

$6,5 \cdot 10^5$  CML quiescentes sont ensemencées dans la cupule supérieure du Transwell. Le puits inférieur contient ou non du PDGF BB en présence ou non de Wortmannin (inhibiteur ubiquitaire de la PI3K, 100 nmole/L) ou d'AS-252424 (inhibiteur sélectif de la PI3K $\gamma$ , 100 nmole/L). La migration est stoppée au bout de 6 heures, puis les cellules n'ayant pas migré sont éliminées par grattage de la face supérieure de la membrane du Transwell. Les cellules restantes sur la face inférieure sont fixées, colorées à l' et comptées. Trois puits sont utilisés pour chaque série et l'expérimentation est reproduite 3 fois. Les histogrammes représentent les moyennes  $\pm$  SD. (\*\*\*) :  $p < 0,0005$ )

Ces données démontrent donc que la seconde vague de phosphorylation de l'Akt est induite par l'activation de la PI3K $\gamma$  qui elle-même est dépendante de l'expression autocrine de Shh suite à l'activation des CML par le PDGF BB (**Fig. 55**).

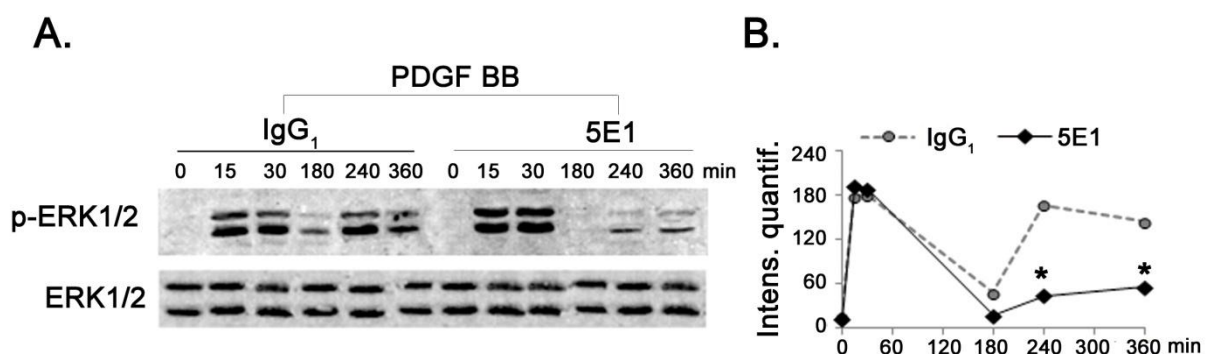
La migration des CML induite par le PDGF BB est complètement inhibée par un inhibiteur ubiquitaire de la PI3K (Wortmannin) tandis qu'elle est inhibée de 44% par l'inhibiteur sélectif de la PI3K $\gamma$  (**Fig. 56**), ce qui suggère que la PI3K $\gamma$  activée par le Shh produit autocrinement est un déterminant important de la migration des CML induite par le PDGF BB en activant une voie qui vient compléter celles induites par le PDGF BB et menant à la migration des CML.

## 2. Les MAPK ERK1/2

L'activation de la cascade des MAPK, notamment l'activation des ERK1/2, est un des mécanismes importants impliqués dans la migration des CML vasculaires (Gerthoffer, 2007).

La stimulation des CML par le PDGF BB induit une activation biphasique de la phosphorylation des ERK1/2 (**Fig. 57A**). Une première phase de phosphorylation qui est maximale aux alentours de 15 à 30 minutes après la stimulation suivie d'un retour à la valeur basale en 3 heures. Cette activation rapide et transitoire est suivie d'une deuxième vague de phosphorylation débutant vers la 4<sup>ème</sup> heure et se maintenant au moins jusqu'à 6 heures.

Comme nous avons montré que Shh recombinant stimule ERK1/2 dans les CML (**Fig. 33**), que l'expression de Shh est induite par le PDGF BB, nous avons cherché à savoir si la phase tardive d'activation des ERK1/2 par le PDGF BB impliquait Shh.



**Figure 57 : Rôle de Shh dans l'activation des ERK1/2 induite par le PDGF BB**

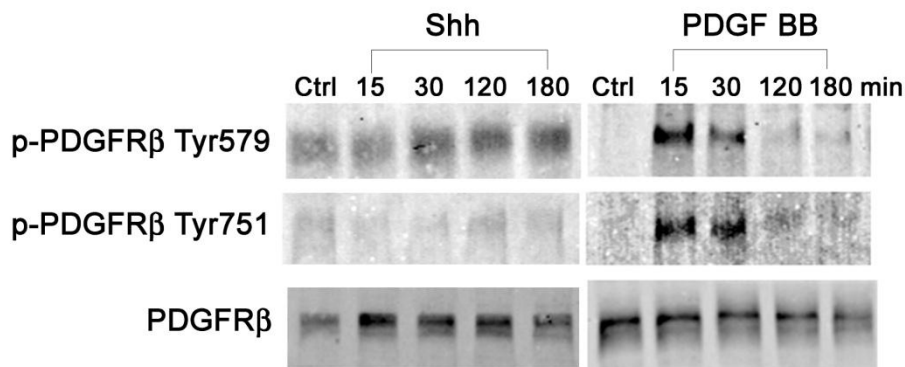
2,5.10<sup>5</sup> CML quiescentes sont stimulées par le PDGF BB (10 ng/mL) en présence ou non d'un anticorps bloquant dirigé contre les protéines Hh 5E1 (1,5 µg/mL). L'activation est arrêtée 15, 30, 180, 240 ou 360 minutes après le traitement. Les ERK1/2 phosphorylées (p-ERK1/2 Tyr202/204) et totales sont détectées par Western blot en utilisant des anticorps spécifiques de ces différentes formes (**A**). Les niveaux de gris de chaque bande sont quantifiés à l'aide du logiciel Image J (**B**). Immunoblot représentatif de 3 expérimentations indépendantes.

Quand l'activation par PDGF BB est effectuée en présence de l'anticorps bloquant anti-Hh (5E1), la première phase de phosphorylation des ERK1/2 n'est pas modifiée tandis que l'activation de la phase tardive est inhibée (**Fig. 57B**), démontrant qu'effectivement l'expression autocrine de Shh participe à l'activation retardée de ERK1/2.

Ne disposant pas d'outils pharmacologiques spécifiques pour inhiber la seconde vague de phosphorylation des ERK1/2, il n'est pas possible de dire si cette réactivation des ERK1/2 par Shh autocrine est impliquée dans la potentialisation de l'effet migratoire de PDGF BB par le Shh produit autocrinement par la CML. On peut seulement envisager que la simple prolongation de l'activation des ERK1/2 par Shh autocrine est impliquée dans l'effet potentialisateur de Shh.

### 3. La phosphorylation du PDGFR $\beta$

Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) peuvent activer le PDGFR $\beta$  via un processus de transactivation qui implique l'activation de Src, induisant l'autophosphorylation du PDGFR $\beta$  et généralement l'activation des voies PI3K et MAPK ERK1/2 (Chen et al., 2012). L'autophosphorylation du récepteur PDGFR $\beta$  et les voies de kinase PI3K ou MAPK ERK1/2 sont cruciales pour la migration des CML (Gerthoffer, 2007). Nos résultats précédents montrent l'activation de la voie PI3K et MAPK ERK1/2 par Shh. Nous avons donc émis l'hypothèse que Shh pourrait transactiver le PDGFR $\beta$  via son récepteur Smo qui est un RCPG et renforcerait ainsi l'activité intracellulaire de la signalisation du PDGF BB. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons examiné l'effet de Shh sur la phosphorylation de PDGFR $\beta$  sur les résidus Tyr579 et Tyr751.



**Figure 58 : Rôle de Shh dans la transactivation de PDGFR $\beta$**

2,5.10<sup>5</sup> CML quiescentes sont stimulées par le Shh (1  $\mu$ g/mL) ou par le PDGF BB (10 ng/mL). L'activation est arrêtée 15, 30, 120 et 180 minutes après le traitement. Les formes phosphorylées (p-PDGFR $\beta$  Tyr579, p-PDGFR $\beta$  Tyr751) et totale du PDGFR $\beta$  sont détectées par Western blot en utilisant des anticorps spécifiques. Immunoblot représentatif de 3 expérimentations indépendantes.

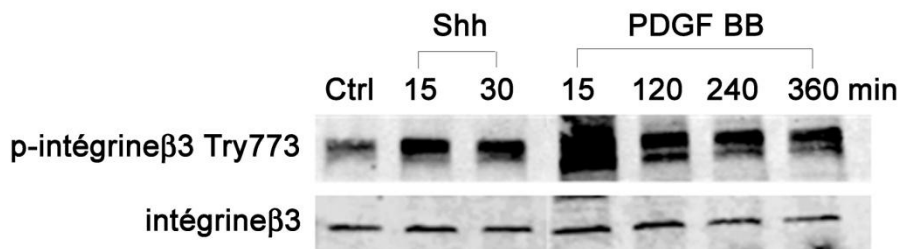


Le PDGF BB induit la phosphorylation du PDGFR $\beta$  sur les résidus Tyr579 (120 fois) et Tyr751 (107 fois) dès la 15<sup>ème</sup> minute suivant la stimulation des CML; le niveau de phosphorylation diminue à 30 minutes (73 fois et 97 fois, respectivement) puis revient pratiquement au niveau basal à 120 minutes. Par contre, la protéine recombinante Shh n'induit pas la phosphorylation des Tyr 579 et 751 du PDGFR $\beta$  dans les 3 heures qui suivent la stimulation des CML (**Fig. 58**).

Ceci signifie que Shh ne transactive pas le PDGFR $\beta$  et par conséquent que le Shh autocrine ne participe pas à l'augmentation de la migration par cette voie.

#### 4. La phosphorylation d'intégrines

Les intégrines sont nécessaires à l'adhésion des CML à la matrice extracellulaire et promeuvent la mise en route de cascades de signalisations intracellulaires. L'activation via les intégrines déclenche un ensemble d'évènements moléculaires qui participe au processus migratoire (Gerhardt et al., 2003). La phosphorylation de l'intégrine  $\beta$ 3, notamment sur la Tyr773, induit la phosphorylation des kinases Src et FAK, et stimule des protéines structurales, telles que la vinculine, la paxiline et l' $\alpha$ -actine (Cai et al., 2009). Aussi, nous avons investigué sur l'effet de Shh dans l'activation de l'intégrine  $\beta$ 3 en détectant la phosphorylation du résidu Tyr773.



**Figure 59 : Rôle du Shh dans la phosphorylation de l'intégrine  $\beta$ 3**

$2,5 \cdot 10^5$  CML quiescentes ont été stimulées par le Shh (1  $\mu$ g/mL) ou par le PDGF BB (10 ng/mL). L'activation est arrêtée 15 et 30, 15, 120, 240 et 180 minutes après le traitement, respectivement. L'intégrine  $\beta$ 3 phosphorylée sur la Tyr 773 (p-intégrine  $\beta$ 3 Tyr773) et l'intégrine  $\beta$ 3 totale sont détectées par Western blot en utilisant des anticorps spécifiques. Immunoblot représentatif de 3 expérimentations indépendantes.

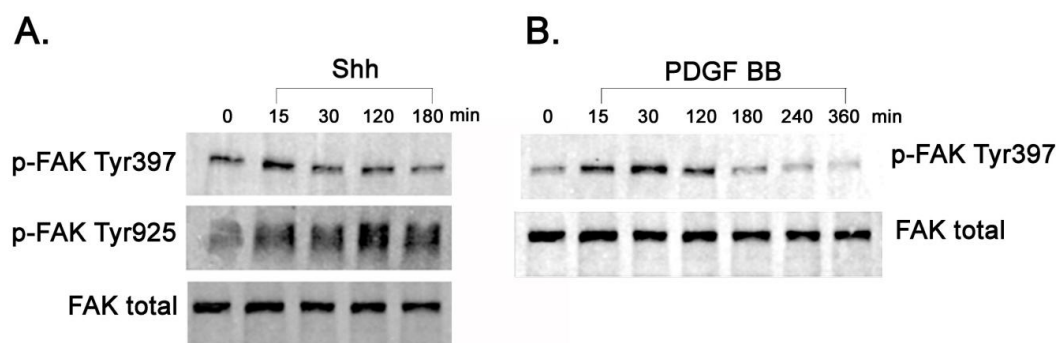
Le PDGF BB induit une phosphorylation importante de l'intégrine $\beta$ 3 sur la Tyr773 15 minutes après la stimulation (127 fois); un haut niveau de phosphorylation est maintenu jusqu'à 6 heures après la stimulation (**Fig. 59**). La protéine recombinante Shh induit aussi la phosphorylation de l'intégrine  $\beta$ 3 sur la Tyr773 avec la même cinétique que le PDGF BB,

mais à un niveau plus faible que le PDGF BB (54 fois pour 15 minutes et 47 fois pour 30 minutes). Puisque Shh n'est exprimé qu'à partir de 4 heures après stimulation par le PDGF BB, il pourrait être impliqué dans le maintien, au-delà de la 4<sup>ème</sup> heure, d'un niveau relativement élevé de phosphorylation de l'intégrine  $\beta 3$  sur la Tyr773 induite par le PDGF BB. L'inhibition de Shh par l'anticorps 5E1 devrait permettre de confirmer le rôle de Shh dans la phosphorylation de l'intégrine  $\beta 3$  par le PDGF BB mais cette hypothèse reste à confirmer.

## 5. La phosphorylation de la FAK

Le contact focal transitoire entre la membrane cellulaire et la matrice extracellulaire est nécessaire à la migration. Un constituant et modulateur majeur de ces contacts focaux est la "Focal Adhesion Kinase" (FAK) Lors de la migration, le résidu Tyr397 de la FAK est autophosphorylé, permettant le recrutement des kinases de la famille Src. Dans les CML, la Tyr925 est ensuite phosphorylée grâce au Src (Gerthoffer, 2007).

Récemment, il a été montré que les microparticules qui portent du Shh induisent une phosphorylation de FAK sur le résidu Tyr925 et favorisent la tubulogénèse des CE sur Matrigel (Soleti et al., 2009). Hormis cette démonstration, l'activation de la FAK par Shh n'a pas été impliquée dans le mécanisme de la migration cellulaire. Notre hypothèse est que Shh active la FAK via sa phosphorylation en Tyr397 puis Tyr925 et ainsi renforce la migration des CML induite par le PDGF BB.



**Figure 60 : Rôle du Shh et du PDGF BB dans la phosphorylation de FAK**

2,5.10<sup>5</sup> quiescentes sont stimulées (A) par Shh (1 µg/mL) ou (B) par le PDGF BB (10 ng/mL) pendant des durées différentes. La p-FAK Tyr397, la p-FAK Tyr925 et la FAK totale sont détectées par Western blot en utilisant des anticorps spécifiques. Immunoblot représentatif de 3 expérimentations indépendantes.

Après stimulation des CML par le PDGF BB, il est noté une augmentation rapide (26 fois pour 15 minutes) de la phosphorylation de la FAK sur la tyrosine 397 qui atteint un maximum 30 minutes (37 fois) après la stimulation puis revient au niveau basal (Fig.60).

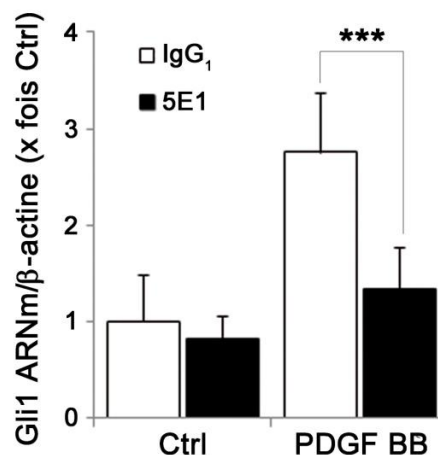
La Tyr397 de la FAK est aussi phosphorylée transitoirement autour de la 15<sup>ème</sup> minutes après la stimulation des CML par la protéine recombinante Shh (7 fois), puis le niveau de phosphorylation revient à l'état basal. Le niveau de phosphorylation de la Tyr925 de la FAK augmente progressivement suite à la stimulation des CML par Shh, pour atteindre un pic (31 fois) 2 heures après la stimulation (**Fig. 60**).

Puisque d'une part Shh n'est exprimé qu'à partir de la 4<sup>ème</sup> heure suivant la stimulation des CML par le PDGF BB, et puisque d'autre part la phosphorylation de la FAK est rapide et transitoire, et n'est pas réactivée au-delà de la 4<sup>ème</sup> heure, il est peu probable que le Shh produit autocrinement puisse jouer un rôle dans son activation et compléter l'action migratoire du PDGF BB par cette voie.

## II. ACTIVATION DE LA VOIE GLI1 ET CONSEQUENCES

### 1. Activation de la voie Gli1 par le PDGF BB

Le PDGF BB augmente de 2,8 fois la quantité d'ARNm de Gli1 dans les CML 6 heures après la stimulation (**Fig. 61**). Sachant que la voie de Gli1 est la voie canonique induite par les protéines Hh et qu'il a été démontré que la protéine Shh recombinante activait la voie canonique dans les CML (**Fig. 32**), nous avons envisagé que l'expression autocrine de Shh induite par le PDGF BB pouvait participer à l'action migratoire du PDGF BB par cette voie.



**Figure 61 : Rôle de Shh dans l'activation de Gli1 induite par le PDGF BB**

2,5.10<sup>5</sup> CML quiescentes sont stimulées par le PDGF BB (10 ng/mL) en présence ou non d'un anticorps bloquant dirigé contre les Hh 5E1 (1,5 µg/mL) pendant 6 heures. L'ARNm total est extrait et le niveau de l'expression de Gli1 est évalué par qPCR pour chaque condition. Trois puits sont utilisés pour chaque série et l'expérimentation est reproduite 3 fois. Les histogrammes représentent les moyennes ± SD. (\*\*\*) : p<0,0005)

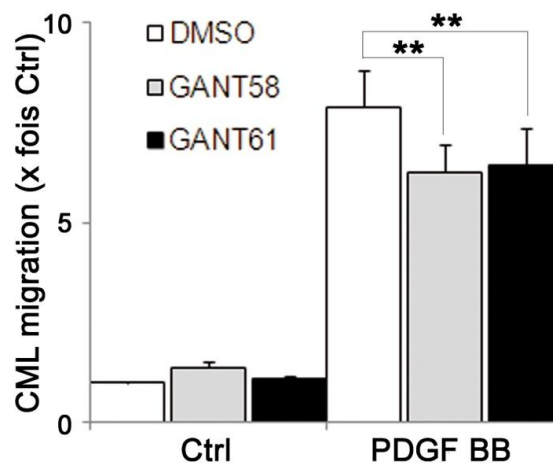
De fait, la présence de l'anticorps anti-Shh 5E1 lors de la stimulation des CML par le PDGF BB inhibe complètement l'augmentation de Gli1 (**Fig. 61**) confirmant que c'est bien l'expression autorine de Shh qui est responsable de l'activation de Gli1.

## 2. Implication de la voie Gli1 dans la migration des CML

### A. Inhibition pharmacologique de Gli1

Afin de déterminer le rôle de l'activation de Gli1 dans la migration des CML induite par le PDGF BB, deux inhibiteurs de l'activation de la transcription de Gli1 ont été utilisés (**Fig. 62**) : GANT58 et GANT61.

La stimulation des CML par le PDGF BB induit une augmentation de la migration des cellules d'environ 7,9 fois par rapport à celle des cellules non stimulées. L'addition de GANT58 ou de GANT61 inhibe de 20% ou de 19% cette migration induite par le PDGF BB, démontrant l'implication de Gli1 dans la migration induite par ce facteur.



**Figure 62 : Rôle de Gli1 dans la migration des CML induite par le PDGF BB : approche pharmacologique**

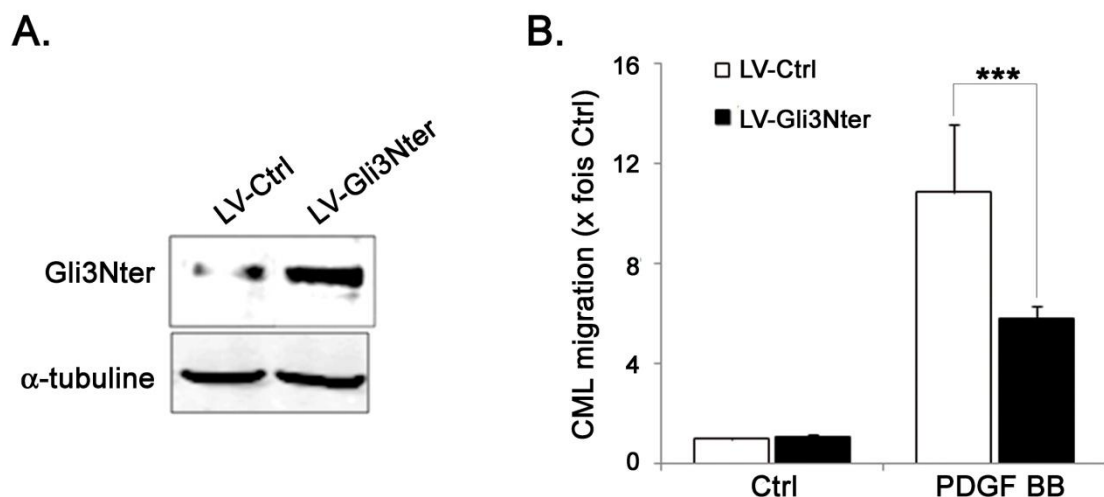
6,5.10<sup>5</sup> CML quiescentes sontensemencées dans la cupule supérieure du Transwell. Le puits inférieur contient ou non du PDGF BB (10 ng/mL) en présence ou non de GANT58 ou de GANT61 (5 µM). La migration est stoppée au bout de 6 heures et évaluée. Trois puits sont utilisés pour chaque série et l'expérimentation est reproduite 3 fois. Les histogrammes représentent les moyennes ± SD. (\*\* : p<0,005)

### B. Inhibition de Gli1 par dominant négatif

Le facteur de transcription de type zinc finger Gli3 est un régulateur de la signalisation de la voie Hh. Il est composé d'un domaine de transactivation en C-terminal et d'un domaine répresseur en N-terminal. Biologiquement, le N-terminal de Gli3 est utilisé en tant que

dominant négatif de la voie Gli1 afin d'inhiber son activité. Pour inhiber l'expression de Gli1 nous avons transduit des CML par un lentivirus (MOI=50) qui porte une séquence codant pour le N-terminal de Gli3. Dans la condition contrôle, les CML ont été transduites par un lentivirus vide. L'efficacité de la transduction a été vérifiée par Western blot.

La transduction par le lentivirus codant pour le N-terminal enrichit effectivement la quantité de Gli3 répresseur dans les CML (**Fig. 63A**). La stimulation par le PDGF BB induit une migration des CML contrôles d'environ 10,8 fois par rapport aux cellules non stimulées. La migration induite par le PDGF BB des CML transduites par le lentivirus N-terminal de Gli3 est diminuée de 46% (**Fig. 63B**), démontrant la participation de Gli1 dans la migration des CML induite par le PDGF BB.



**Figure 63 : Rôle de Gli1 dans la migration des CML induite par le PDGF BB : inhibition de Gli1 par le dominant négatif Gli3Nter**

(A). Le domaine N-terminal de Gli3 est recherché par Western blot dans des extraits protéiques de CML transduites soit par un lentivirus qui porte la séquence codant pour le N-terminal de Gli3, soit par un lentivirus contrôle. (B).  $6,5 \cdot 10^5$  CML contrôles ou transduites par le N-terminal de Gli3 sont ensemencées dans la cupule supérieure du Transwell. La migration induite par le PDGF BB (10 ng/mL) pendant 6 heures est évaluée. Trois puits sont utilisés pour chaque série et l'expérimentation est reproduite 3 fois. Les histogrammes représentent les moyennes  $\pm$  SD. (\*\*\*) :  $p < 0,0005$ )

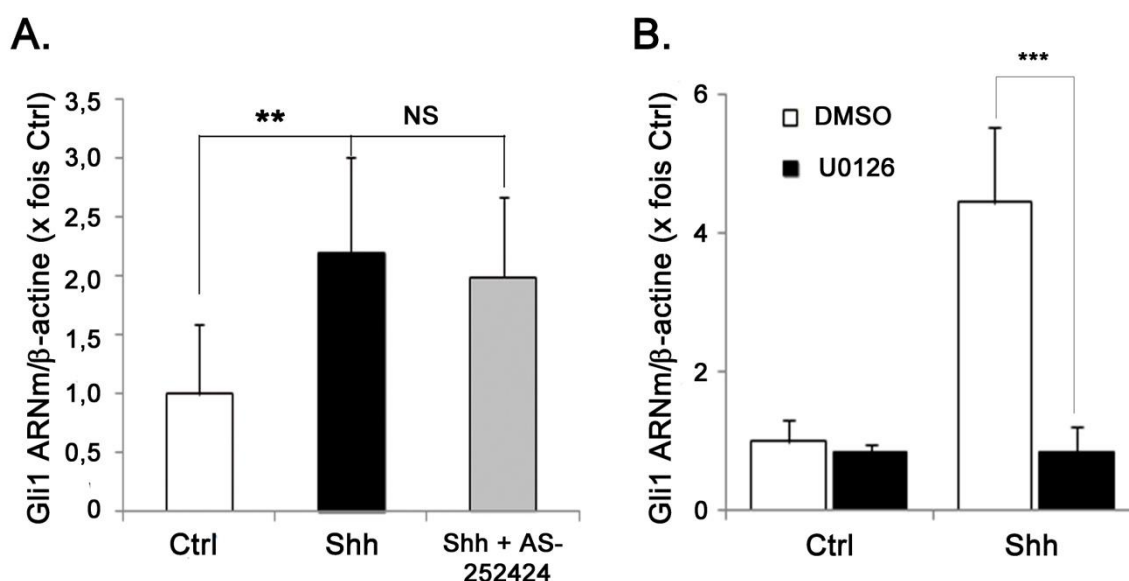
### C. Relation entre les voies de kinase et la voie Gli1-dépendante

Dans les CML, les voies PI3K et MAPK sont activées quelques minutes après la mise en contact avec les stimuli (PDGF BB, Shh) tandis que la voie de transcription Gli1 n'est activée qu'à partir de la 4<sup>ème</sup> heure. Par ailleurs, il a été montré que dans les fibroblastes 3T3, l'activation précoce (quelques minutes) de PI3K et ERK1/2 par Shh est nécessaire à

l'activation de Gli1 à long terme (quelque heures) (Riobo et al., 2006a; Riobo et al., 2006b). Nos résultats mettent en évidence que dans les CML aussi ces 3 voies de signalisation sont activées. Nous avons donc cherché à savoir si l'activation des voies kinase pouvaient moduler l'activation de la voie Gli1.

Par RT-qPCR nous avons montré que l'inhibiteur de la PI3K $\gamma$  AS-252424 n'influence pas l'augmentation de l'expression des ARNm de Gli1 induite par le Shh (**Fig. 64A**) tandis que l'inhibiteur des ERK1/2 U0126 inhibe complètement cette activation (**Fig. 64B**).

Ces résultats suggèrent que l'activation des MAPK ERK1/2, mais pas celle de la PI3K $\gamma$ , est nécessaire pour activer la voie canonique Gli1-dépendante.



**Figure 64 : Influence de la PI3K $\gamma$  et la MAPK sur l'activation de la voie Gli1**

2,5.10<sup>5</sup> CML quiescentes sont stimulées par le Shh (1  $\mu$ g/mL) pendant 6 heures en présence ou non (A) d'un inhibiteur sélectif de la PI3K $\gamma$  (AS-252424 : 100 nmole/L) ou (B) d'un inhibiteur d'ERK1/2 (U0126 : 10  $\mu$ mole/L). L'ARNm total est extrait et le niveau d'expression de Gli1 est évalué par qPCR pour chaque condition. Trois puits sont utilisés pour chaque série et l'expérimentation est reproduite 3 fois. Les histogrammes représentent les moyennes  $\pm$  SD. (NS :  $p > 0,05$ , \*\* :  $p < 0,005$  et \*\*\* :  $p < 0,0005$ )

#### D. Identification des cibles de la voie Gli1 impliquées dans la migration des CML induite par le PDGF BB

Nous avons mis en évidence que la potentialisation de l'effet migratoire du PDGF BB par Shh était en partie dû à l'activation de la voie Gli. Gli1 est un facteur de transcription qui active la transcription de gènes tels que Ptch1, Hip et Gli1 lui-même. Mais il active aussi nombre de gènes dans différents types cellulaires qui sont notamment impliqués dans le développement et la prolifération cellulaires, tels que la cycline D2, l'Insulin-like Growth Factor Binding Protein-6 (IGFBP-6), la plakoglobine, le Nkx2.2, la méthyltransférase, le

"Bone Morphogenetic Protein-4 et -7" (BMP-4 et BMP-7) et le "Fibroblast Growth Factor-15" (FGF-15) (Kawai and Sugiura, 2001 ; Saitsu et al., 2005; Wu et al., 2004 ; Yoon et al., 2002 ).

Afin d'aborder ce problème, nous avons décidé d'utiliser une approche gènes candidats et de cibler des gènes :

- dont il a été montré que la transcription était dépendante du facteur de transcription Gli1,
- et qui ont été impliqués dans la migration des CML.

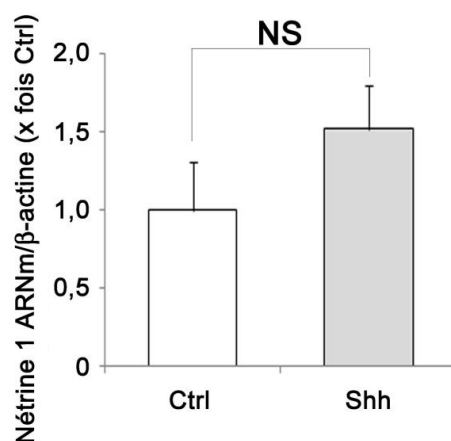
Les études mettant en évidence l'induction par la voie Gli de gènes potentiellement impliqués dans la migration cellulaire sont rares. C'est cependant le cas de la nétrine-1, de l'OPN et de Cyr61 (Harris et al., 2012; Hynes et al., 2000; Yoon et al., 2002). Nous nous sommes limités à l'étude de ces 3 gènes.

#### *a. Nétrine 1*

Il a été montré que la Nétrine 1 est un gène cible de Gli1 dans le développement du tube neural (Hynes et al., 2000). Il induit la prolifération et la migration des CML aortiques humaines et est un acteur important pour la musculation des vaisseaux (Fan et al., 2008).

Le niveau des ARNm de la Nétrine 1 n'est pas modifié par Shh (**Fig. 65**), démontrant que la Nétrine 1 n'est pas un gène cible du facteur de transcription Gli1 activé par Shh.

Il est donc peu probable que la potentialisation de l'effet migratoire du PDGF BB par Shh passe par une augmentation de l'expression de la Nétrine 1 via Gli1.



**Figure 65 : Shh et expression de la nétrine 1 dans les CML**

$2,5 \cdot 10^5$  CML quiescentes sont stimulées par le Shh (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) pendant 6 heures. L'ARNm total est extrait et le niveau de l'expression de la nétrine 1 est évalué par qPCR dans chaque condition. Trois puits sont utilisés pour chaque série et l'expérimentation est reproduite 3 fois. Les histogrammes représentent les moyennes  $\pm$  SD. (NS :  $p > 0,05$ )

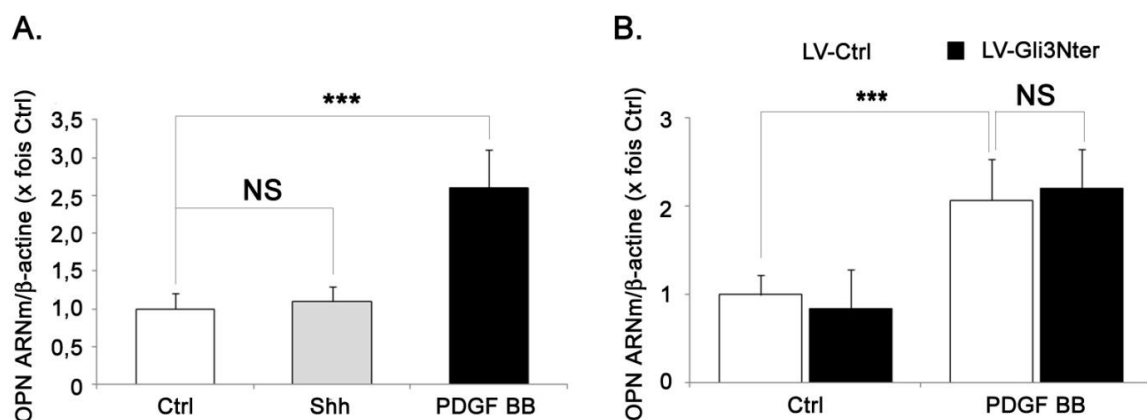
## b. OPN

Le rôle de l'OPN dans le développement des pathologies vasculaires a été confirmé par de nombreuses études (Lyle et al., 2012 ; Vaughan et al., 2012). En particulier elle favorise la progression de l'athérosclérose (Witkiewicz et al., 2010) et est impliquée dans la migration et l'activation des CML (Jalvy et al., 2007b). Une étude réalisée dans la lignée cellulaire épithéliale RK33 du rein transfectée ou non par un plasmide codant pour le Gli1 a identifié l'OPN comme un gène cible de Gli1 (séquence de fixation : GACCTCCCA) (Yoon et al., 2002).

Le niveau des ARNm de l'OPN est modulé par le PDGF BB, mais pas par le Shh, suggérant que l'OPN n'est pas un gène cible de la signalisation de Shh, et plus particulièrement de la voie Gli1 (**Fig. 66A**).

Afin de confirmer cette hypothèse, des CML ont été transduites par le lentivirus codant pour le dominant négatif de la voie Gli1 (Gli3Nter), inhibiteur de la voie Gli, puis stimulées par le PDGF BB. Dans ces conditions l'expression de l'OPN induite par le PDGF BB n'est pas diminuée, confirmant que le Shh produit autocrinement ne participe pas, via la voie Gli, à l'augmentation de l'expression de l'OPN, et par conséquent que l'OPN ne participe pas à la potentialisation de la migration par Shh (**Fig. 66B**).

Ces résultats mettent en évidence que l'OPN n'est pas un gène ciblé par la voie de transcription Gli1-dépendante.



**Figure 66 : Expression de l'OPN dans les CML : modulation par Shh et le PDGF BB**

(A).  $2,5 \cdot 10^5$  CML quiescentes sont stimulées par Shh (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ou le PDGF BB (10  $\text{ng}/\text{mL}$ ) pendant 6 heures. L'ARNm total est extrait et le niveau d'expression de l'OPN est évalué par qPCR dans chaque condition. (B).  $2,5 \cdot 10^5$  CML transduites par le lentivirus codant pour un dominant négatif de Gli1 (LV-Gli3Nter) ou par un lentivirus contrôle sont ensemencées dans les puits d'une plaque de 6 puits et mises en quiescence. Le niveau d'expression de l'OPN est évalué par qPCR après 6 heures de traitement par le PDGF BB (10  $\text{ng}/\text{mL}$ ). Trois puits sont utilisés pour chaque série et l'expérimentation est reproduite 3 fois. Les histogrammes représentent les moyennes  $\pm$  SD. (NS :  $p > 0,05$  et \*\*\* :  $p < 0,0005$ )

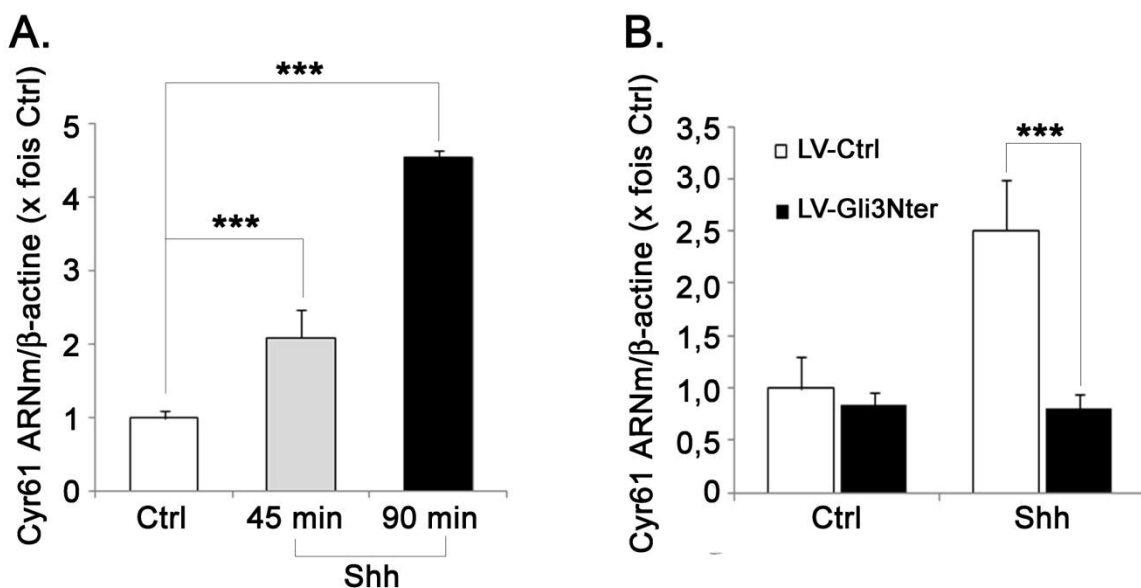


*c. "Cystéine-riche protéin 61" (Cyr61)*

Le gène *Cyr61* est fortement exprimé dans les CML de la média de l'aorte et les CML en culture. *Cyr61* est un facteur angiogénique et migratoire pour les CML (Unoki et al., 2003). Une étude récente démontre qu'il est transcrit par l'activation de la voie *Gli1* dans des cellules cancéreuses du sein (Harris et al., 2012) et par conséquent impliqué dans l'angiogenèse tumorale et dans la métastase hématogène. La séquence du site de la fixation de *Gli1* sur le promoteur de *Cyr61* est : GTCCTCCCA.

Nous avons dans un premier temps vérifié l'hypothèse que le *Cyr61* est aussi activé par le facteur de transcription *Gli1* dans les CML. Une stimulation de CML par *Shh* augmente de 2,0 fois la quantité de l'ARNm de *Cyr61* en 45 minutes, puis son expression continue d'augmenter (4,7 fois) 90 minutes après le traitement (**Fig. 67A**), démontrant que *Shh* est un inducteur d'une expression rapide de *Cyr61*.

L'augmentation de l'expression de *Cyr61* par *Shh* ne se produit pas dans les CML préalablement transduites par un lentivirus codant pour le N-terminal de *Gli3* (**Fig. 67B**), suggérant que l'augmentation de *Cyr61* par *Shh* est associée à l'activation de la voie *Gli1*.

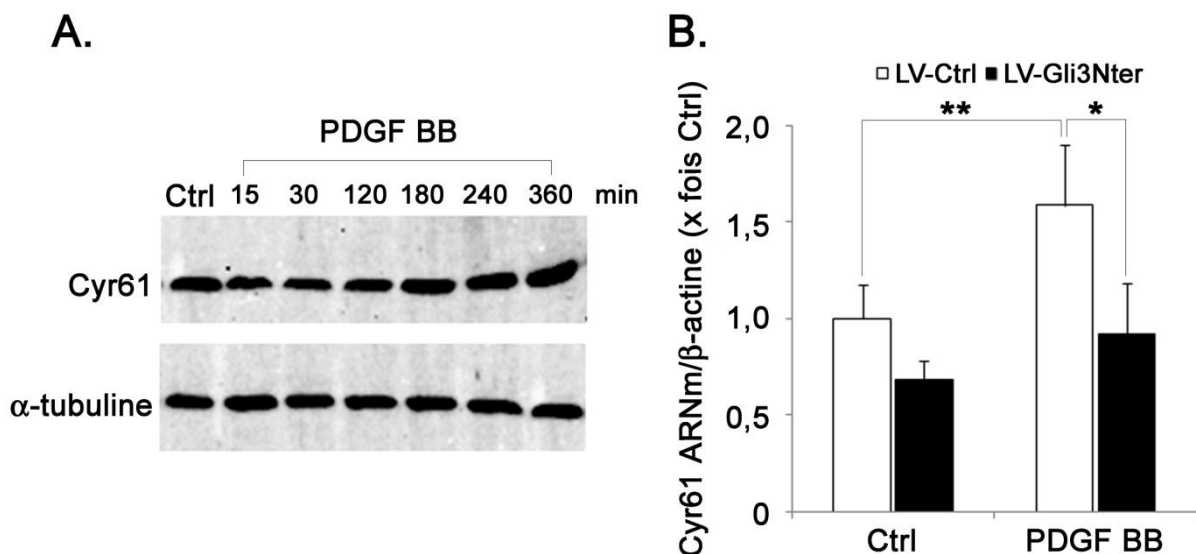


**Figure 67 : Induction par *Shh* de l'expression de *Cyr61* dans les CML**

(A). Cinétique de l'expression de *Cyr61* dans les CML stimulées par *Shh* (1 µg/mL). La stimulation est stoppée au bout de 45 ou 90 minutes. (B).  $2,5 \cdot 10^5$  CML transduites par le lentivirus codant pour un dominant négatif de *Gli1* (LV-Gli3Nter) ou un lentivirus contrôle sont ensemencées dans des puits d'une plaque de 6 puits et mises en quiescence dans du milieu sans sérum pendant 24 heures. Le niveau d'expression de *Cyr61* est évalué par qPCR après 45 minutes de traitement des CML par *Shh* (1 µg/mL). Trois puits sont utilisés pour chaque série et l'expérimentation est reproduite 3 fois. Les histogrammes représentent les moyennes  $\pm$  SD. (\*\*\*) :  $p < 0,0005$ )

Afin d'étudier le rôle de l'activation de Gli1 dans la modulation de Cyr61 induite par le PDGF BB, nous avons dans un premier temps réalisé une cinétique de l'expression de Cyr61 après stimulation des CML par le PDGF BB. Le PDGF BB n'induit pas d'augmentation de la protéine Cyr61 pendant les 2 premières heures suivant la stimulation. Par contre, on note une légère augmentation de la protéine à partir de la 3<sup>ème</sup> heure suivant la stimulation des CML par le PDGF BB (**Fig. 68A**). Au vu de cette cinétique, nous avons posé l'hypothèse que le Shh produit autocrinement après stimulation par le PDGF BB est à l'origine de l'augmentation tardive de Cyr61 détectée après stimulation des CML par le PDGF BB.

Afin de vérifier cette hypothèse, des CML ont été transduites par le lentivirus dominant négatif de Gli1 ou un lentivirus contrôle puis stimulées par le PDGF BB. Après stimulation par le PDGF BB, l'expression de Cyr61 est augmentée 1,6 fois dans les CML transduites avec le lentivirus contrôle, alors que l'expression de Cyr61 ne subit pas d'augmentation dans les CML transduites avec dominant négatif de Gli1 (**Fig. 68B**).



**Figure 68 : Rôle de Gli1 dans l'induction de l'expression de Cyr61 dans les CML par le PDGF BB**

(A). Cinétique de l'induction de l'expression de la protéine Cyr61 par le PDGF BB (10 ng/mL) suivie par Western blot. La stimulation est stoppée 15, 30, 120, 180, 240 et 360 minutes après la stimulation. Les protéines sont extraites après lyse des cellules et séparées par électrophorèse PAGE-SDS. Le Cyr61 et l' $\alpha$ -tubuline sont détectés par Western blot en utilisant des anticorps spécifiques ; (B).  $2,5 \cdot 10^5$  CML transduites par les lentivirus LV-Gli3Nter ou contrôle sont ensemencées dans les puits d'une plaque de 6 puits et mises en quiescence dans du milieu sans sérum pendant 24 heures. Le niveau d'expression de Cyr61 est évalué après stimulation par le PDGF BB (10 ng/mL) pendant 6 heures. Trois puits sont utilisés pour chaque série et l'expérimentation est reproduite 3 fois. Les histogrammes représentent les moyennes  $\pm$  SD. (\* :  $p < 0,05$  et \*\* :  $p < 0,005$ ).

Ainsi l'expression de Cyr 61 induite via la production autocrine de Shh après stimulation des CML par le PDGF BB pourrait participer à la potentialisation de la migration induite par PDGF BB. Cette hypothèse devra être confortée en bloquant soit l'expression de Cyr61 (par siRNA), soit en bloquant la protéine Cyr61 (au niveau de son récepteur ou par un anticorps bloquant la protéine).

#### *d. Le récepteur PDGFR $\beta$*

Le récepteur PDGFR $\beta$  est un récepteur à activité tyrosine kinase. Sa liaison avec le PDGF BB représente une voie majeure dans la migration des CML (Doanes et al., 1998). A l'aide du logiciel Genomatix, nous avons constaté que le promoteur de PDGFR $\beta$  possède 3 sites potentiels de fixation au facteur de transcription Gli (Tab. 15).

Numéro	Position	Séquence
1	333-347	gcgtCCACcctccct
2	356-370	gctcCCCCccaccaa
3	440-454	caggcctCCCAgaca

Tableau 15 : Sites de fixation de Gli1 sur le promoteur du PDGFR $\beta$  chez le rat (NC\_005106.3)

Nous avons émis l'hypothèse que l'expression du PDGFR $\beta$  pourrait être dépendante de Gli1 dont l'expression est elle-même dépendante de l'action de la production autocrine de Shh par les CML. Pour ce faire, nous avons cherché à savoir si l'expression du PDGFR $\beta$  en ARNm est induite par la voie Shh et plus précisément par la voie Gli1.

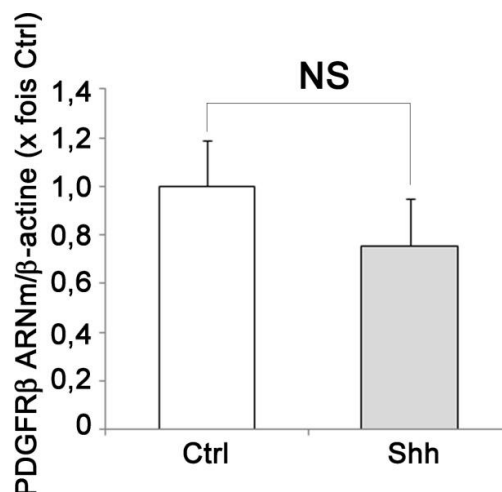


Figure 69 : Shh et expression du récepteur PDGFR $\beta$  dans les CML

2,5.10<sup>5</sup> CML quiescentes sont stimulées par Shh (1  $\mu$ g/mL) pendant 6 heures. L'ARNm total est extrait et le niveau de l'expression de PDGFR $\beta$  est évalué par qPCR dans chaque condition. (NS : p>0,05)

La **Figure 69** montre que le niveau des ARNm du PDGFR $\beta$  dans les CML n'est pas augmenté par une stimulation de ces cellules par Shh. Ceci suggère que le PDGFR $\beta$  n'est pas un gène cible du facteur de transcription Gli1 dans les CML et que par conséquent la potentialisation de la migration des CML par Shh ne passe pas par cette voie.

## **E. Conclusion**

Nos résultats ont montré que le PDGF BB stimule l'expression de Gli1 dans les CML et que cette expression de Gli1 est de façon logique le résultat d'une stimulation des CML par le Shh produit autocrinement par les CML sous l'action du PDGF BB. De façon plus inattendue nous avons montré que l'activation de la voie canonique Hh (Gli1) participait à l'effet promoteur de la migration des CML par Shh.

Le blocage de Gli1 par des inhibiteurs pharmacologiques ou par un dominant négatif a permis de mettre en évidence l'implication de la voie Gli1 dans la migration des CML induite par le PDGF BB. Cette voie Gli1 est dépendante de l'expression autocrine de Shh sous l'effet du PDGF BB, ainsi que de l'activation des MAPK ERK1/2, mais indépendante de la signalisation PI3K $\gamma$ .

Gli1 étant un facteur de transcription nous avons recherché parmi les cibles de Gli1 décrites dans la littérature celles qui pourraient participer à la migration des CML. Nous avons identifié Cyr61 comme un candidat potentiel répondant à Shh. Il reste toutefois à vérifier ses propriétés dans la migration des CML. Par ailleurs, une analyse plus large par microarray devrait permettre d'isoler d'autres cibles de Gli1 en comparant par exemple le profil d'expression dans des CML traitées ou non par le PDGF BB en présence ou non d'un inhibiteur de Gli ou d'un dominant négatif de Gli.

- **Partie II : Hh, maturation et stabilisation des néovaisseaux *in vivo***



La couverture de vaisseaux par des cellules murales est essentielle à leur stabilité et leur fonctionnalité. Le PDGF BB est l'un des principaux facteurs reconnus pour jouer un rôle essentiel dans la maturation des néovaisseaux, notamment dans le recrutement des cellules murales, péricytes et CML (Hellstrom et al., 1999). Le recrutement des cellules murales sur les néovaisseaux requiert la migration des CML vers les CE, qui se fait notamment selon un gradient de PDGF BB sécrété par les CE (Kano et al., 2005).

Nos travaux réalisés *in vitro* mettent en évidence le rôle de Shh dans la migration des CML induite par le PDGF BB. *In vivo*, l'intervention de la voie Hh dans le mécanisme d'action du PDGF BB dans la maturation des néovaisseaux n'a jamais été décrite. Toutefois, il a été avancé que Shh pouvait intervenir dans la maturation des néovaisseaux puisque, lors de la réparation du réseau vasculaire après infarctus du myocarde, l'administration de Shh favorise la musculation des néovaisseaux (Kusano et al., 2005). Mais aucun lien entre l'effet Shh et le PDGF BB n'a été établi.

Le but de ce travail est de déterminer le rôle des protéines Hh et de leur signalisation dans le recrutement des cellules murales sur les néovaisseaux *in vivo* et de vérifier notamment si elles interviennent dans le mécanisme d'action du PDGF BB.

Afin d'aborder ce problème nous avons fait appel à un modèle d'angiogenèse chez l'adulte, le modèle d'angiogenèse de la cornée chez la souris.

## I. MODELE D'ANGIOGENESE DE LA CORNEE CHEZ LA SOURIS

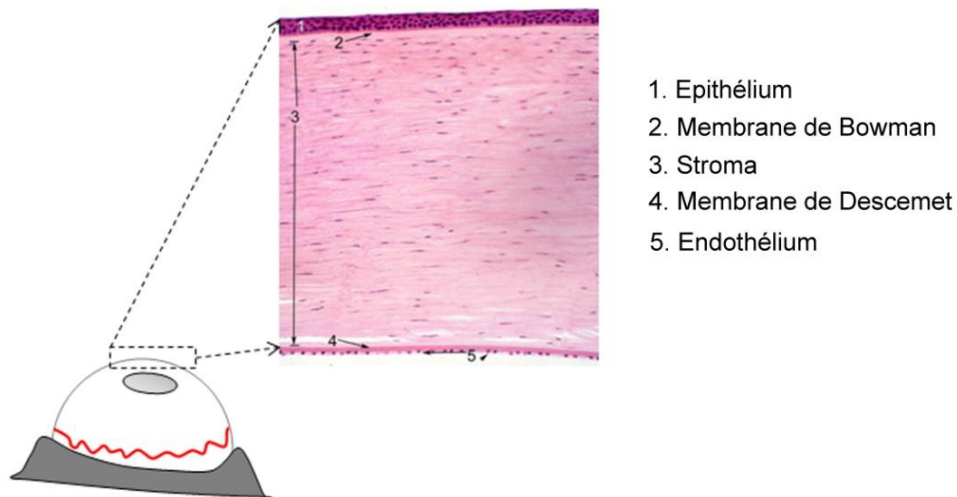
Le modèle d'angiogenèse de la cornée a été développé chez la souris et utilisé essentiellement pour étudier la néovascularisation induite par des facteurs définis ou l'effet inhibiteur des molécules pharmacologiques contre l'angiogenèse (Kim et al., 2012 ; Mohan et al., 2011; Sivak et al., 2011 ).

### 1. Description de la cornée normale

La cornée contient 4 couches (**Fig. 70**) dont :

- un épithélium, membrane épithéliale non-kératinisée, qui protège l'ensemble de l'œil et se régénère rapidement suite à une blessure ;
- la membrane de Bowman, couche acellulaire composée de fibrilles de collagène, qui permet à la cornée de garder la forme hémisphérique;

- le stroma, couche relativement épaisse, composée de plusieurs couches de fibres de collagène sécrété par des kératocytes, qui assure la transparence de la cornée à la lumière ;
- la membrane de Descemet, constituée de polysaccharides, qui est un support pour la membrane endothéliale ;
- un endothélium, qui contrôle le flux et par conséquent l'homéostasie de la cornée.



**Figure 70 : Structure de la cornée**

## **2. Modèle expérimental**

La cornée normale et saine n'est pas vascularisée et reçoit les éléments nutritifs à partir de vaisseaux sanguins périphériques qui appartiennent au réseau de la choroïde.

La néovascularisation de la cornée est un évènement qui peut se produire suite à une lésion de la cornée. Elle peut aussi être générée expérimentalement par introduction, dans la partie stromale, d'un implant qui diffuse progressivement un facteur angiogénique et crée ainsi un gradient du facteur angiogénique. En général, 5 jours après l'opération, des vaisseaux sanguins se sont développés vers l'implant pro-angiogénique. Ce réseau vasculaire va se musclicariser progressivement (Zhang et al., 2009).

Dans les travaux qui suivent, le facteur angiogénique VEGF a été utilisé afin de générer la croissance de vaisseaux dans la cornée de souris.



## II. ROLE DE LA VOIE HH DANS L'ANGIOGENESE DE LA CORNEE INDUITE PAR LE VEGF

Il a été proposé que Shh est un facteur angiogénique qui est notamment impliqué dans l'angiogenèse réparatrice du muscle soumis à une ischémie aiguë du muscle de la patte inférieure chez la souris (Pola et al., 2003). Il promeut la migration et la morphogénèse capillaire des CE en culture via l'activation de la voie RhoA (Renault et al., 2010) et PI3K (Kanda et al., 2003). Il a aussi été suggéré que la thérapie génique par Shh induisait la formation de vaisseaux plus muscularisés (Kusano et al., 2005). Cependant, l'effet des protéines Hh et de leurs voies de transduction dans le recrutement des cellules murales, la maturation et la stabilisation des vaisseaux, reste encore largement méconnu.

Afin d'aborder ce problème, nous avons choisi d'utiliser le modèle d'angiogenèse de la cornée chez la souris adulte car :

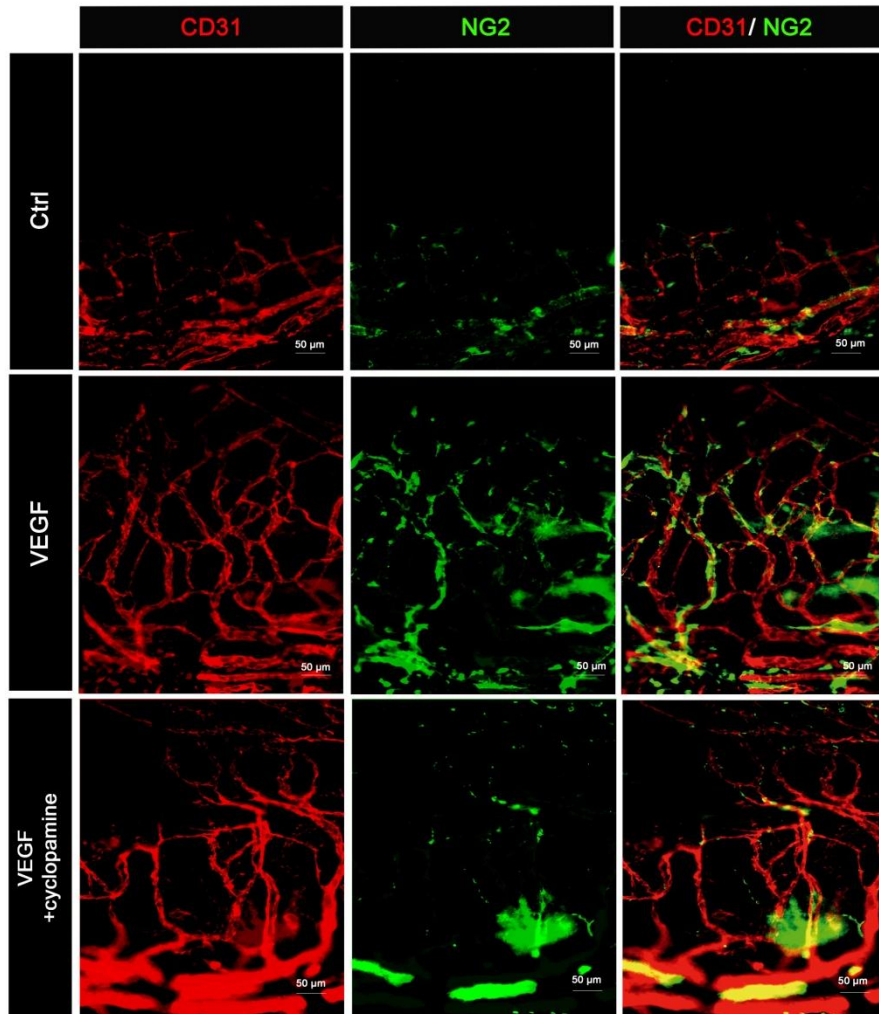
- la croissance de vaisseaux dans ce modèle, est totalement dépendante du facteur angiogénique diffusant depuis l'implant ;
- il est facile d'introduire un inhibiteur pharmacologique en association avec le facteur inducteur;
- les structures et l'architecture des néovaisseaux peuvent être suivies aisément par microscopie ;
- les néovaisseaux se muscularisent ce qui permet de suivre l'influence des facteurs activateurs ou inhibiteurs du recrutement des cellules murales;
- à plus long terme, les néovaisseaux régressent, le réseau vasculaire se réorganise, ce qui permet d'aborder la stabilisation des vaisseaux.

### 1. Effet de la voie Hh dans l'angiogenèse induite par le VEGF

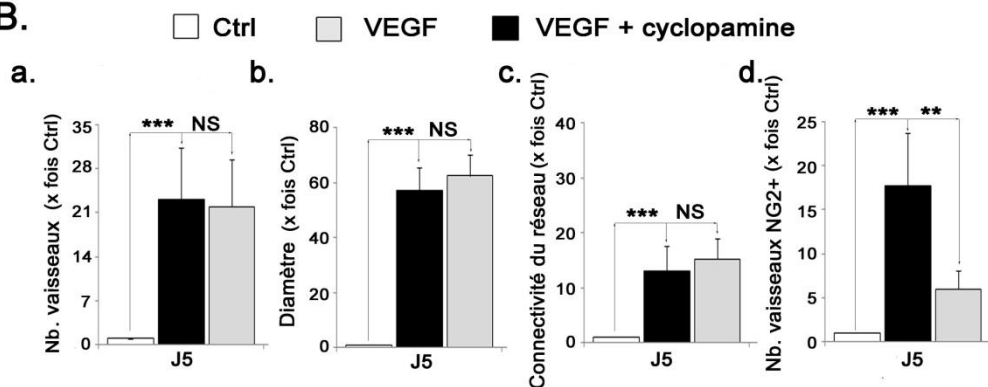
L'effet angiogénique de la protéine Shh a aussi été observé dans le modèle d'angiogenèse de la cornée (Pola et al., 2001). Cependant, le rôle de la voie Hh dans l'angiogenèse induite par d'autres facteurs, en particulier le VEGF, n'a pas été étudié, et surtout, aucune étude ne s'est focalisée sur la place jouée par les protéines Hh dans le recrutement des cellules murales et donc la muscularisation des vaisseaux.

Afin d'aborder ce problème, nous avons dans un premier temps cherché à connaître les conséquences du blocage de la voie Hh par la cyclopamine, un inhibiteur de Smo sur l'angiogenèse de la cornée induite par le VEGF.

A.



B.



**Figure 71 : Effet de l'inhibition de la signalisation de la voie Shh sur la néovascularisation de la cornée induite par le VEGF**

Des implants contenant ou non 5 µg de VEGF ± cyclopamine (10 nmol) ont été insérés dans les cornées de souris C3HeB/FeJ (n=8/groupe). (A) La détection du marqueur endothélial CD31 (rouge : Alexa568®) et du marqueur des cellules murales NG2 (vert : Alexa468®) est réalisée par immunohistofluorescence 5 jours après l'opération. Les images sont prises en microscopie à épi-fluorescence. (B) Le nombre (B-a), le diamètre (B-b), la connectivité des vaisseaux (maille vasculaire) (B-c) sont comptés et quantifiés à partir des images prises. Le nombre des vaisseaux NG2<sup>+</sup> est déterminé par comptage des vaisseaux colonisés par des cellules NG2<sup>+</sup> (B-d). Les résultats sont exprimés en nombre de fois la valeur du contrôle (implant sans VEGF). (NS : p>0,05 et \*\*\* : p>0,0005)

Cinq jours après la mise en place de l'implant contenant le VEGF, un réseau vasculaire important s'est développé aussi bien en présence qu'en absence de cyclopamine. Il n'y pas de différences sur le nombre des vaisseaux (**Fig. 71A et Fig. 71B-a**), sur leur diamètre (**Fig. 71A et Fig. 71B-b**), ou sur la connectivité du réseau vasculaire (**Fig. 71A et Fig. 71B-c**). Par contre, le nombre de vaisseaux NG2<sup>+</sup> (un marqueur des cellules murales, en particulier des péricytes) est 60% plus faible en présence de cyclopamine que dans les contrôles (**Fig. 71A et Fig. 71B-d**), suggérant que la signalisation Hh est impliquée dans le recrutement des cellules murales sur les néovaisseaux de la cornée induits par VEGF.

## **2. Expression et localisation des protéines Hh dans les néovaisseaux de la cornée induits par VEGF**

Puisque la voie Hh est active dans les néovaisseaux et sachant que cette voie est activée que par les protéines Hh et les oxystérols, nous avons dans un premier temps cherché à vérifier s'il y avait bien expression de Hh dans les néovaisseaux, puis à identifier les cellules exprimant ces protéines Hh.

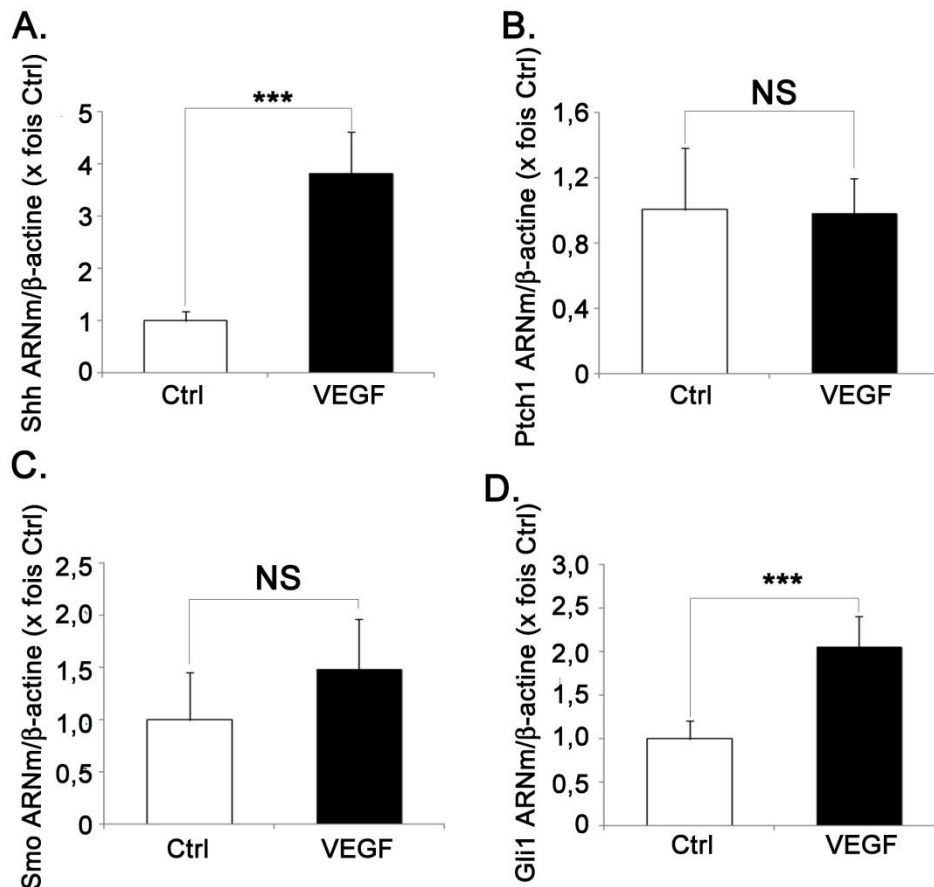
### **A. Expression des Hh dans les néovaisseaux : approche qPCR**

Les cornées entières traitées ou non par le VEGF sont excisées et les ARN totaux en sont extraits en vue de déterminer par PCR l'expression des différents Hh, ainsi que celles de différents éléments de la voie Hh.

L'expression de Shh est augmentée de 3,8 fois dans les cornées traitées par le VEGF par rapport aux cornées contrôles (**Fig. 72A**) tandis qu'Ihh et Dhh sont très faiblement exprimés ou ne sont pas détectables y compris dans les cornées VEGF.

Le récepteur Ptch1 et son co-récepteur Smo ne sont pas modulés significativement par le traitement des cornées par le VEGF (**Fig. 72B et 72C**).

Par contre, Gli1, le marqueur de la voie canonique, est également augmenté dans les cornées-VEGF (**Fig. 72**), confirmant que la voie Hh est bien activée au cours de la néovascularisation induite par le VEGF, probablement suite à l'augmentation de l'expression de Shh.

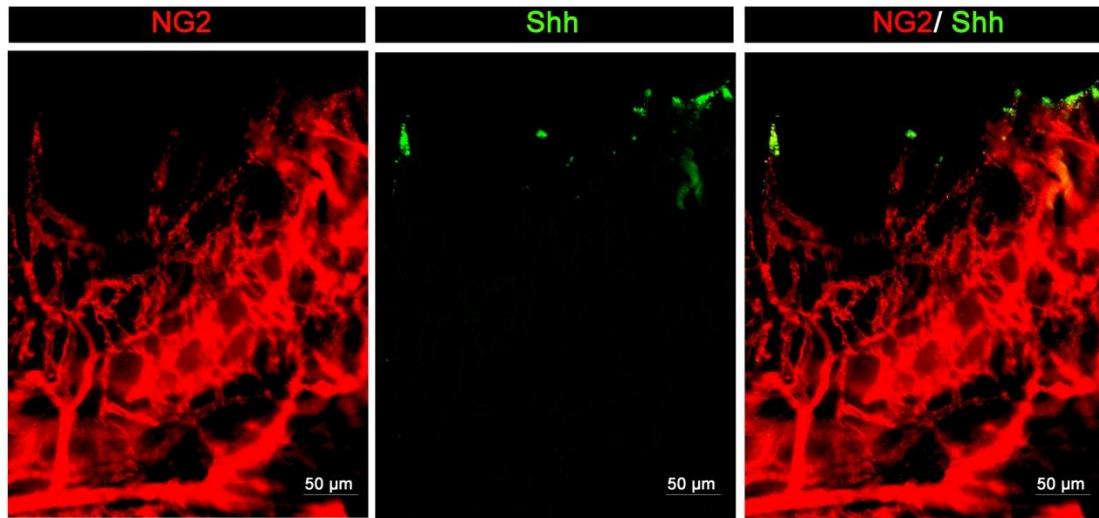


**Figure 72 : Expression des éléments de la voie Hh dans les cornées traitées par le VEGF.** Les expressions de Shh, Ptch1, Smo et Gli1 dans les cornées traitées ou non par 5 µg de VEGF (n=8/groupe) sont évaluées par qPCR 5 jours après la pose de l'implant. (\*\*\*) :  $p < 0,0005$  et NS:  $p > 0,05$ )

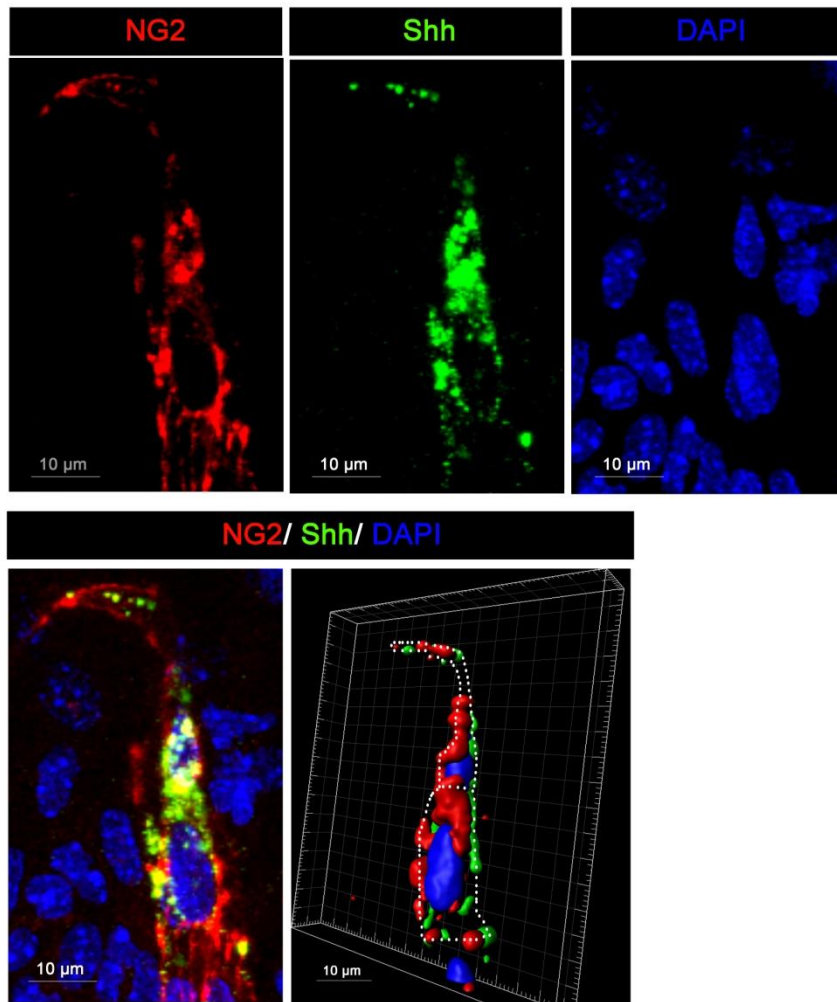
## B. Expression des protéines Hh dans les néovaisseaux : approche immunohistochimique

L'étude immunohistologique à l'aide d'un anticorps dirigé contre la partie C-terminale de Shh permet de mettre en évidence que la protéine Shh se localise effectivement dans les néovaisseaux des cornées VEGF, notamment à l'extrémité apicale de ces vaisseaux (**Fig. 73A**). 72% des vaisseaux en croissance portent le marquage Shh (comptage sous microscope). A l'aide de la microscopie confocale, nous avons constaté que la protéine Shh est retrouvée plus précisément au niveau des cellules exprimant le marqueur des cellules murales NG2 situées à l'extrémité des néovaisseaux en croissance et, dans ces cellules, est localisée dans le cytoplasme et sur la membrane plasmique (**Fig. 73B**).

A.



B.



**Figure 73 : Localisation de Shh dans les néovaisseaux de la cornée**

L'angiogenèse de la cornée est induite par la pose d'un implant contenant 5 µg de VEGF. La détection de NG2 (rouge : Alexa568®), Shh (vert : Alexa468®) et des noyaux (bleu : DAPI) est réalisée 5 jours après la pose de l'implant. Les images sont prises en microscopie à épifluorescence (A) et en microscopie confocale (B) et traitées à l'aide du logiciel IMARIS®. Détourage des cellules a été réalisé manuellement.

### C. Conclusion

Ces études démontrent que Shh est effectivement exprimé au niveau des néovaisseaux lors de l'angiogenèse de la cornée induite par le VEGF, et que cette expression est localisée dans des cellules murales NG2<sup>+</sup> situées à l'extrémité des vaisseaux en croissance.

### 3. Mécanismes d'induction de l'expression de Shh dans les cellules murales des néovaisseaux

Nous avons envisagé 2 hypothèses (Fig. 74):

- ou bien c'est le VEGF qui active l'expression de Shh en agissant directement sur les cellules murales,
- ou bien le VEGF active au niveau des CE la production de facteurs qui vont agir sur les cellules murales et induire l'expression de Shh par ces cellules.

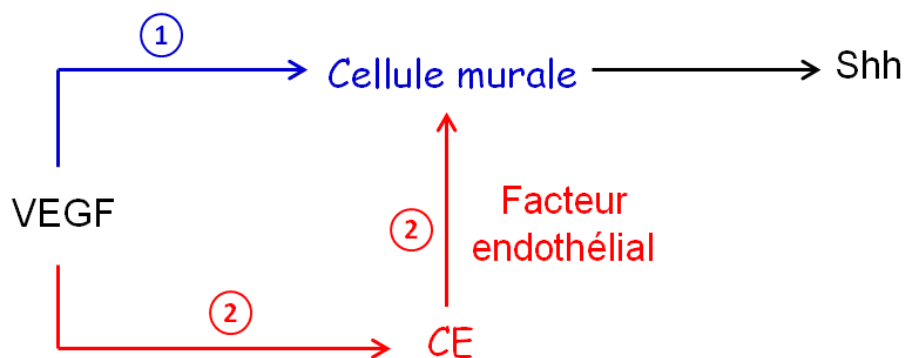


Figure 74 : Mécanismes hypothétiques de l'induction de l'expression de Shh dans les cellules murales durant la néovascularisation induite par le VEGF

#### A. Hypothèse 1 : activation directe de Shh dans les cellules murales

Afin de vérifier cette hypothèse, des CML en culture ont été stimulées par le VEGF et l'expression de Shh suivie par qPCR. Quelle que soit sa concentration, le VEGF n'induit pas l'expression de Shh, suggérant que l'activation directe des cellules murales par VEGF n'est pas responsable de l'expression de Shh localisé à l'extrémité des vaisseaux en croissance. Toutefois, il sera nécessaire de vérifier si le VEGF est capable de moduler l'expression de Shh dans d'autres types notamment les péricytes.

## B. Hypothèse 2 : induction par le VEGF de facteurs endothéliaux activateurs des cellules murales

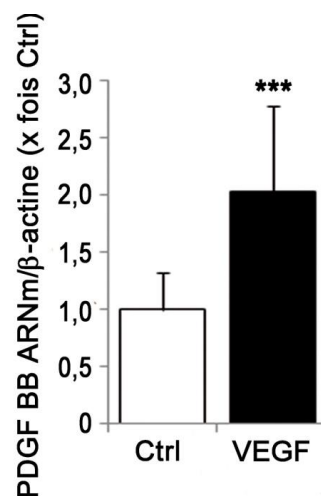
Différentes études montrent que la stimulation des CE par le VEGF induit l'expression de PDGF BB (Enge et al., 2002 ; Hellstrom et al., 1999). De plus, nos résultats obtenus sur des CML en culture (**Partie I/Chapitre IV**) montrent que le PDGF BB induit l'expression de Shh dans ces cellules. Nous avons donc examiné l'hypothèse selon laquelle les CE de la cornée, sous l'effet du VEGF diffusant depuis l'implant, vont produire du PDGF BB qui, à son tour, pourra agir sur les cellules murales pour induire l'expression de Shh.

Nous avons donc successivement recherché :

- s'il y avait augmentation de l'expression de PDGF BB dans les cornées traitées par VEGF,
- quelles étaient les cellules qui produisaient le PDGF BB,
- et si le PDGF BB d'une part était bien à l'origine de l'expression de Shh dans les cellules murales, et d'autre part jouait un rôle dans la musculation des néovaisseaux.

### a. Expression du PDGF BB par les CE des cornées traitées par le VEGF

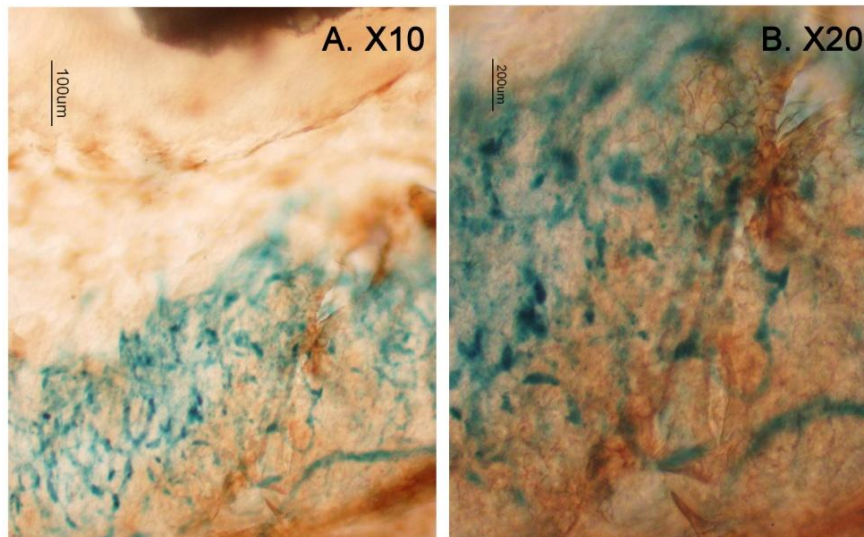
Cinq jours après la pose d'implants contenant ou non du VEGF, les cornées entières ont été excisées et les ARN totaux extraits. L'expression de PDGF BB dans les cornées traitées par le VEGF, déterminée par qPCR, est 2,1 fois plus élevée que dans celle des cornées contrôles (**Fig. 75**).



**Figure 75 : Expression du PDGF BB au cours de la néovascularisation de la cornée**  
Un implant contenant ou non 5 µg de VEGF est inséré dans les cornées des souris C3HeB/FeJ. L'expression de PDGF BB dans les cornées traitées ou non par VEGF (n=8/groupe) est évaluée par qPCR 5 jours après la pose de l'implant. (\*\*\*) : p<0,0005)



L'expression du PDGF BB dans la cornée a été confirmée par une approche génique à l'aide d'un gène rapporteur (*lacZ*). Les souris PDGF B-Cre-ER<sup>T2/+</sup> ; Rosa26<sup>R/+</sup> sont des souris transgéniques dans lesquelles le gène *lacZ* est spécifiquement transcrit dans les cellules exprimant le PDGF BB (principalement les CE). L'activité  $\beta$ -galactosidase (gène rapporteur *LacZ*) est détectée dans les vaisseaux préexistants en périphérie de la cornée, mais dans les néovaisseaux colonisant la cornée après implantation de VEGF (**Fig. 76**).



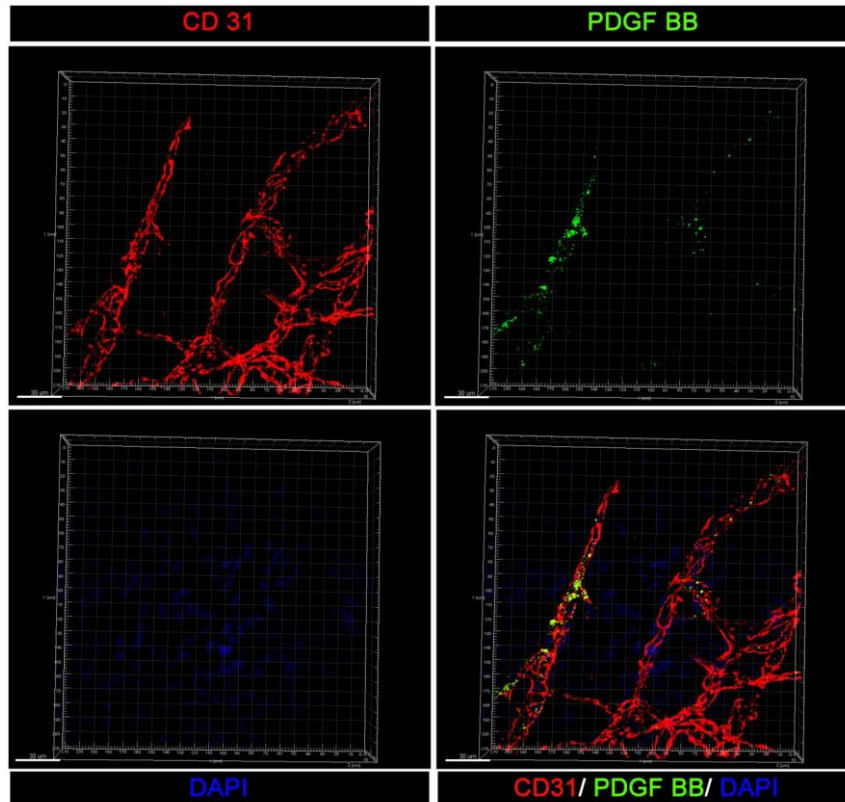
**Figure 76 : Détection des structures exprimant le PDGF BB dans la cornée de la souris PDGF B-Cre-ER<sup>T2/+</sup> ; Rosa26<sup>R/+</sup>**

Un implant contenant 5  $\mu$ g de VEGF est inséré dans les cornées des souris PDGF B-Cre-ER<sup>T2/+</sup> ; Rosa26<sup>R/+</sup>. L'activité X-Gal (spécifiquement activée dans les cellules exprimant le PDGF B) est révélée après incubation des cornées entières avec le substrat X-Gal 5 jours après la pose de l'implant. Les photos sont prises au grossissement x10 (**A**) et x20 (**B**).

La détection de PDGF BB par immunohistochimie dans les cornées VEGF, montre que le PDGF BB est exprimé par des CE (CD31<sup>+</sup>) des vaisseaux néoformés, particulièrement au niveau de zones situées près de la pointe de ces vaisseaux (**Fig. 77**). Cette étude montre que les CE des néovaisseaux des cornées traitées par VEGF expriment le PDGF BB.

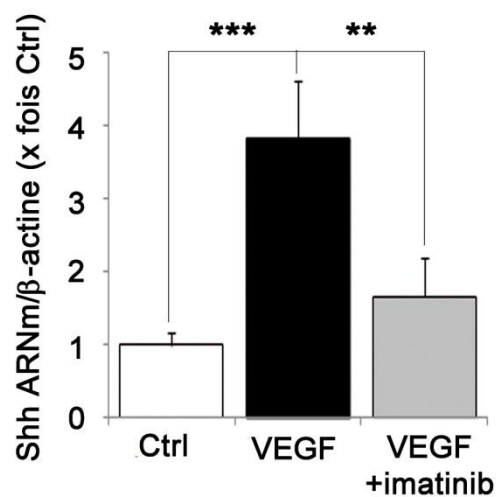
La démonstration que le PDGF BB est effectivement exprimé par les CE des vaisseaux en croissance dans la cornée soumise à l'action du VEGF est compatible avec l'hypothèse selon laquelle le PDGF BB produit par les CE des néovaisseaux est à l'origine de la stimulation de l'expression de Shh par les cellules murales voisines.





**Figure 77 : Localisation du PDGF BB dans les néovaisseaux de la cornée**

Un implant contenant ou non 5  $\mu$ g de VEGF est introduit dans les cornées des souris C3HeB/FeJ. Les détections de CD31 (rouge : Alexa568®), PDGF BB (vert : Alexa468®) et des noyaux (bleu : DAPI) sont réalisées 5 jours après la pose de l'implant. Les images sont prises en microscopie confocale et traitées par le logiciel IMARIS®.



**Figure 78 : Effet de l'imatinib sur l'expression de Shh dans les cornées traitées par le VEGF**

Des implants contenant 5  $\mu$ g de VEGF en présence ou non d'un inhibiteur du PDGFR $\beta$  (imatinib : 10 mmol) ont été insérés dans les cornées des souris C3HeB/FeJ. L'expression de Shh des cornées (n=8/groupe) est évaluée par qPCR 5 jours après la pose de l'implant. (\*\*\*) : p<0,0005 et \*\* : p<0,005)

### ***b. PDGF BB et expression de Shh***

Afin de vérifier l'hypothèse que le PDGF BB produit par les CE des cornées traitées par le VEGF est bien responsable de l'activation de l'expression de Shh dans les cellules murales, nous avons inhibé les effets du PDGF BB par l'imatinib, un inhibiteur du récepteur PDGFR $\beta$ , dans les cornées traitées par le VEGF et évalué l'expression de Shh par qPCR.

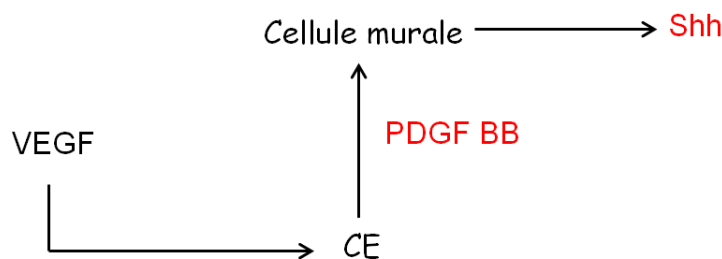
La quantité d'ARNm de Shh est 3,8 fois plus élevée dans les cornées traitées par VEGF que les contrôles. La présence d'imatinib diminue l'augmentation de l'expression de Shh de 58% (**Fig. 78**), démontrant une régulation positive de Shh par le PDGF BB.

Ainsi, en complément à la mise en évidence que les cellules murales des néovaisseaux dans la cornée VEGF expriment Shh (**Fig. 73**), nous mettons ici en évidence, comme nous l'avons démontré *in vitro* sur les CML en culture, que l'induction de l'expression Shh dans les cellules murales des néovaisseaux est la résultante directe de l'action du PDGF BB produit par les CE sur les cellules murales durant la formation et la maturation des vaisseaux.

### **C. Conclusion**

Dans cette partie du travail, nous avons mis en évidence la production de PDGF BB dans les CE des néovaisseaux induits par le VEGF, ainsi que l'expression de Shh dans les cellules murales NG2<sup>+</sup> situées à l'extrémité apicale des néovaisseaux. De plus, nous montrons que l'expression de Shh dans les cellules murales est liée à l'activation de ces cellules par le PDGF BB exprimé dans les CE adjacentes au niveau des pointes des vaisseaux néo-formés dans la cornée des souris. Ces différents résultats nous amènent à proposer le schéma suivant (**Fig. 79**) pour illustrer le mécanisme d'activation de l'expression de Shh dans les néovaisseaux de la cornée induits par VEGF :

- induction de la production de PDGF BB par les CE sous l'action du VEGF,
- induction de l'expression de Shh par les cellules murales sous l'action du PDGF BB.



**Figure 79 : Mécanismes de l'induction de l'expression de Shh dans les cellules murales durant la néovascularisation induite par le VEGF**

Comme le PDGF BB est un facteur chimiotactique majeur des CML, ceci nous a amené à nous poser la question de la part jouée par Shh produit par les cellules murales dans le recrutement de ces dernières sur les néovaisseaux immatures durant l'angiogenèse de la cornée.

#### **4. Rôle du Shh induit par le PDGF BB dans le recrutement des cellules murales**

Nous avons démontré en début de ce Chapitre qu'un blocage du co-récepteur des ligands Hh (Smo) diminuait le recrutement des cellules murales sur les néovaisseaux de la cornée (**Fig. 71**), suggérant que la voie de signalisation Hh prenait part à la maturation des néovaisseaux.

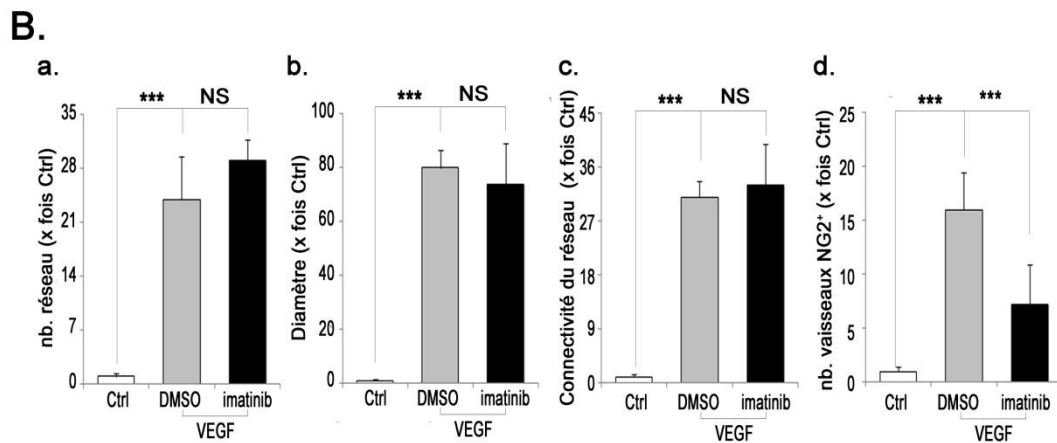
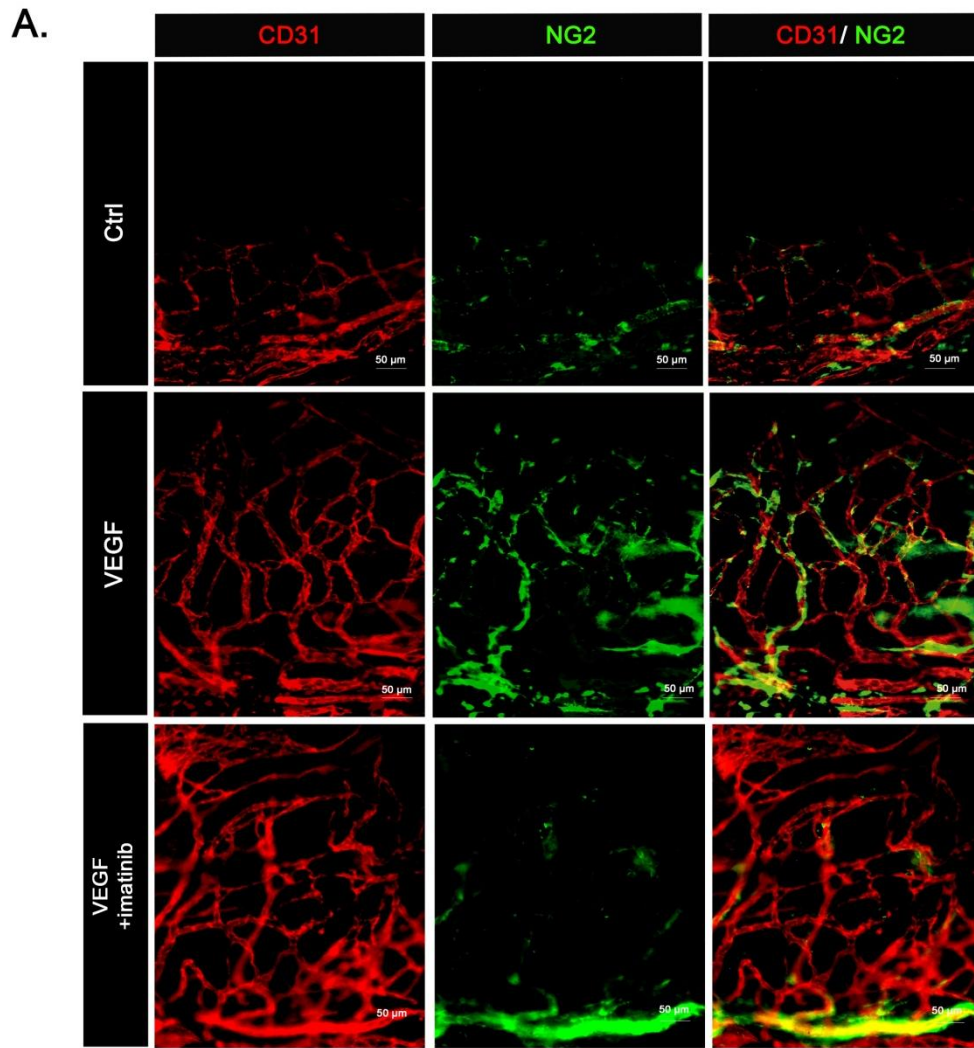
Afin de démontrer que le mécanisme d'action du PDGF BB sur le recrutement des cellules murales dans l'angiogenèse induite par le VEGF implique la stimulation de Shh par ce facteur et l'activation de la voie Hh, nous avons réalisé 2 types d'expériences :

- la pose d'un implant VEGF contenant ou non de l'imatinib, un inhibiteur du PDGFR $\beta$ , pour vérifier que le PDGF BB est un acteur majeur du recrutement des CML ;
- la pose d'un implant PDGF BB contenant ou non de la cyclopamine (inhibiteur de Smo), pour évaluer l'effet direct de Shh dans le recrutement des cellules murales induit par le PDGF BB sachant que ce facteur est un inducteur de l'expression de Shh dans ce modèle.

##### **A. PDGF BB et recrutement des cellules murales induit par le VEGF**

Comme nous l'avons vu précédemment, un réseau de vaisseaux muscularisés (exprimant NG2) se développe dans les cornées traitées par VEGF. Afin de vérifier que le PDGF BB produit dans les cornées traitées par VEGF est bien un acteur du recrutement des cellules murales sur les néovaisseaux, nous avons suivi l'influence du traitement des cornées par l'imatinib, un inhibiteur du récepteur PDGFR $\beta$ , sur l'état de la muscularisation des vaisseaux.

Le traitement par l'imatinib, qui bloque la signalisation de PDGF BB, n'a d'effet ni sur le nombre total de vaisseaux (**Fig. 80A et Fig. 80B-a**), ni sur leur diamètre (**Fig. 80A et Fig. 80B-b**), ni sur la connectivité du réseau (**Fig. 80A et Fig. 80B-c**). Par contre, l'imatinib diminue de 55% le nombre de vaisseaux exprimant le marqueur NG2<sup>+</sup> (**Fig. 80A et Fig. 80B-d**) démontrant ainsi un rôle dans le recrutement des cellules NG2<sup>+</sup>.



**Figure 80 : Effet de l'inhibition de la signalisation du PDGF BB sur la néovascularisation induite par le VEGF**

Des implants contenant ou non 5  $\mu\text{g}$  de VEGF  $\pm$  imatinib (10 mmol) ont été insérés dans les cornées de souris C3HeB/FeJ ( $n=8/\text{groupe}$ ). (A) La détection du marqueur endothélial CD31 (rouge : Alexa568®) et du marqueur des cellules murales NG2 (vert : Alexa468®) est réalisée par immunohistofluorescence 5 jours après la pose de l'implant. Les images sont prises en microscopie à épi-fluorescence. (B) Le nombre (B-a), le diamètre (B-b) et la connectivité des vaisseaux (maille vasculaire) (B-c) sont comptés et quantifiés à partir des images prises. Le nombre des vaisseaux NG2<sup>+</sup> (B-d) est déterminé par comptage des vaisseaux colonisés par des cellules NG2<sup>+</sup>. Les résultats sont exprimés en nombre de fois par rapport aux cornées contrôles (implant sans VEGF). (NS :  $p>0,05$  et \*\*\* :  $p>0,0005$ )

Ce résultat montre que le PDGF BB est capable de favoriser le recrutement des cellules murales sur les vaisseaux en formation, confirmant ainsi les données de la littérature démontrant que le PDGF BB est un facteur majeur pour le recrutement des cellules murales et la maturation des vaisseaux (Enge et al., 2002; Hellstrom et al., 1999).

## **B. Shh et recrutement des cellules murales induit par le PDGF BB**

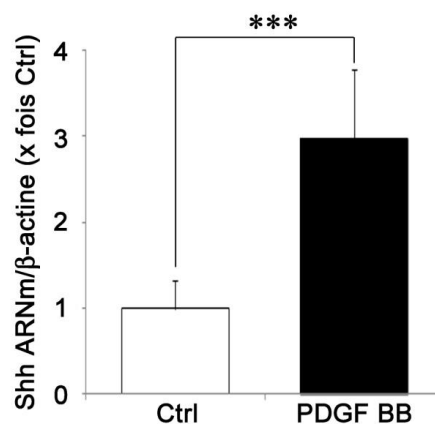
Dans le développement et l'angiogenèse, le PDGF BB est surtout connu en tant qu'inducteur du recrutement des cellules murales (Enge et al., 2002; Hellstrom et al., 1999), bien qu'il soit démontré qu'il est aussi un facteur pro-angiogénique (Zhang et al., 2009).

Afin d'étudier directement le rôle de Shh dans le recrutement des cellules murales induit par le PDGF BB (sachant que nous avons démontré que le Shh est une cible du PDGF BB *in vitro*), la néovascularisation dans la cornée est induite par la pose d'implants contenant :

- du PDGF BB afin de confirmer que le PDGF BB est bien angiogénique par lui-même et qu'il induit aussi l'expression de Shh,
- du PDGF BB en présence de cyclopatamine, un inhibiteur du récepteur Smo, pour bloquer la voie de signalisation de Shh et évaluer son niveau de participation dans le recrutement des cellules murales.

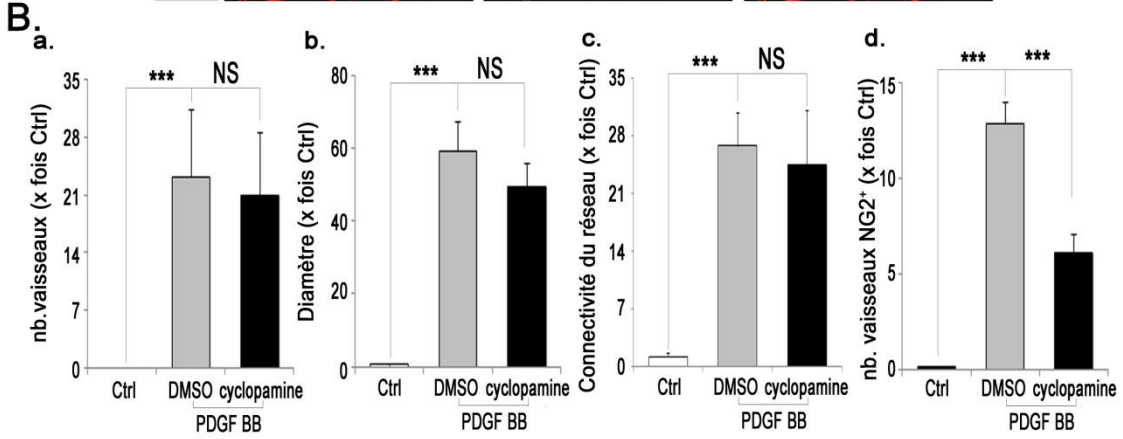
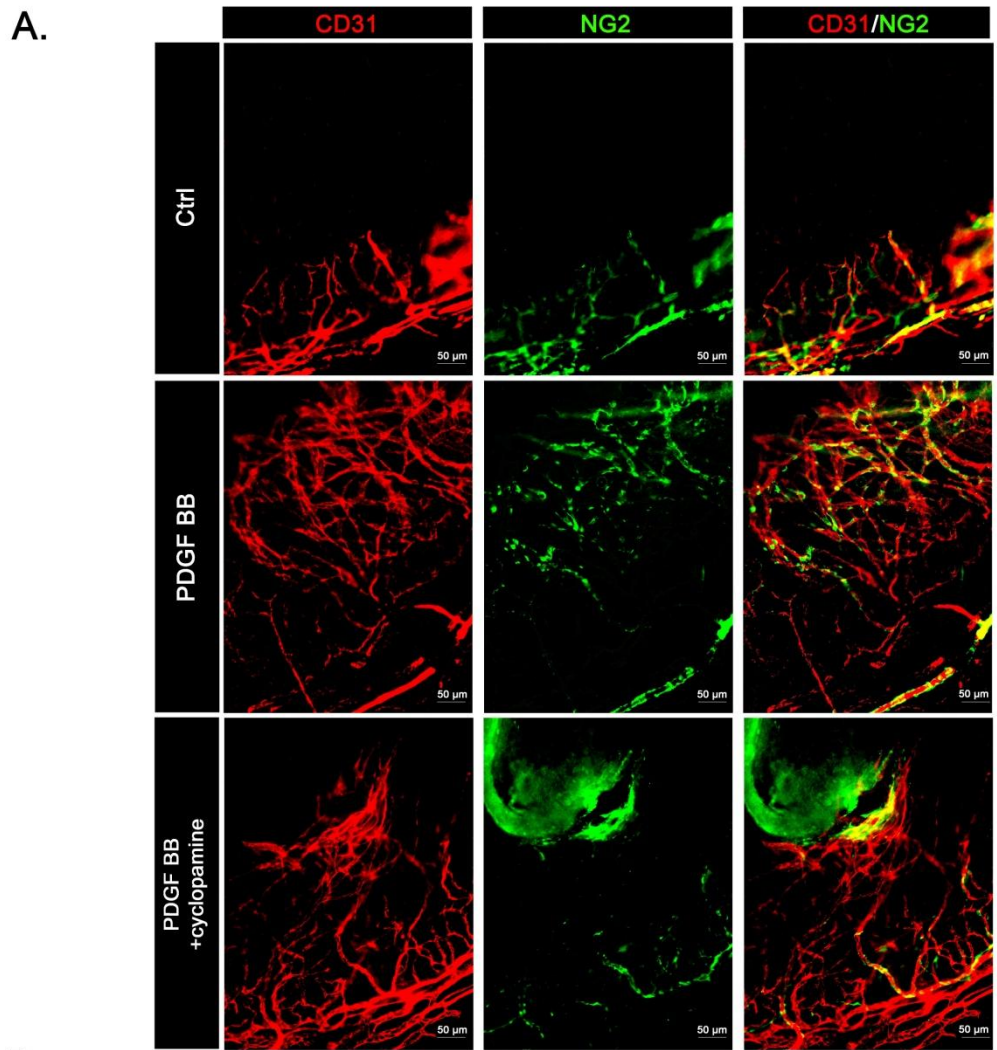
### **a. Expression de Shh dans la néovascularisation induite par le PDGF BB**

Cinq jours après la pose d'implants contenant ou non du PDGF BB, les cornées entières sont excisées et soit fixées en vue de l'étude morphologique, soit utilisées pour extraire les ARN totaux. L'expression de Shh dans les cornées traitées par le PDGF BB, déterminée par qPCR, est 2,9 fois plus élevée que celle des cornées contrôles (**Fig. 81**).



**Figure 81 : Expression de Shh dans les cornées traitées par le PDGF BB**

Les expressions de Shh dans les cornées traitées ou non par à 0,5  $\mu$ g de PDGF BB (n=8/groupe) sont évaluées par qPCR 5 jours après la pose d'implants. (\*\*\*) :  $p < 0,0005$  et NS :  $p > 0,05$



**Figure 82 : Effet de l'inhibition de la signalisation de Shh sur la néovascularisation induite par le PDGF BB**

Des implants contenant ou non 0,5 µg de PDGF BB ± cyclopamine (10 mmol) sont insérés dans les cornées de souris C3HeB/FeJ (n=8/groupe). (A) La détection du marqueur endothélial CD31 (rouge : Alexa568®) et du marqueur des cellules murales NG2 (vert : Alexa468®) est réalisée par immunohistofluorescence 5 jours après l'opération. Les images sont prises en microscopie à épi-fluorescence. (B) Le nombre (B-a), le diamètre (B-b), la connectivité des vaisseaux (maille vasculaire) (B-c) sont comptés et quantifiés à partir des images prises. Le nombre des vaisseaux NG2<sup>+</sup> (B-d) est déterminé par comptage des vaisseaux colonisés par des cellules NG2<sup>+</sup>. Les résultats sont exprimés en nombre de fois par rapport aux cornées contrôles. (NS : p>0,05 et \*\*\* : p>0,0005)

### ***b. Rôle de Shh dans le recrutement des cellules murales induit par le PDGF BB***

L'implant contenant du PDGF BB induit une angiogenèse comparable à celle induite par le VEGF; de plus le réseau vasculaire obtenu est muscularisé comme celui induit par VEGF (**Fig. 82A**). L'implant contenant du PDGF BB induit un réseau vasculaire muscularisé comme celui induit par VEGF. En présence de cyclopamine, le nombre de vaisseaux induits par PDGF BB (**Fig. 82A et Fig. 82B-a**), le diamètre des vaisseaux (**Fig. 82A et Fig. 82B-b**) et la connectivité du réseau (**Fig. 82A et Fig. 82B-c**) ne varient pas de façon significative. Par contre, le blocage de la voie Shh diminue le nombre de vaisseaux comprenant des cellules NG2<sup>+</sup> (**Fig. 82A et Fig. 82B-d**) d'un ordre de grandeur identique à celui du blocage du PDGF BB par l'imatinib: 49% versus 55%, confirmant que Shh et sa voie de transduction font partie intégrante du mécanisme d'action du PDGF BB dans le recrutement des cellules murales sur les vaisseaux néo-formés.

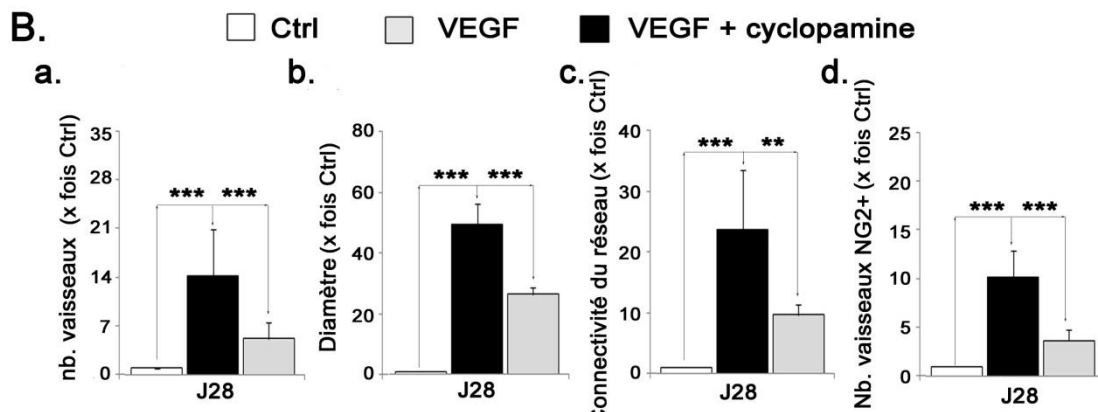
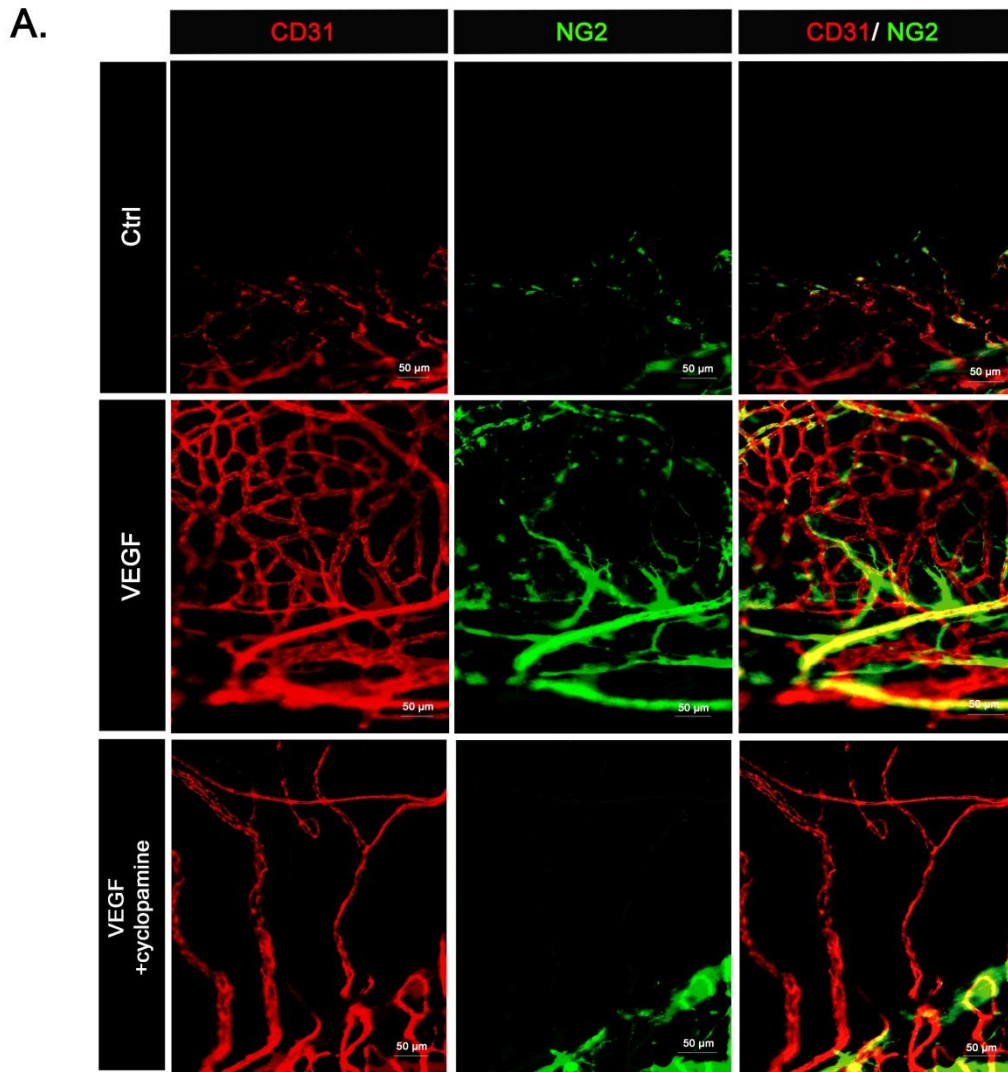
## **III. ROLE DE LA VOIE HH DANS LA STABILISATION DES VAISSEAUX**

Le lien entre la couverture des vaisseaux par des cellules murales et la stabilisation des vaisseaux est maintenant bien établi (Armulik et al., 2005; Armulik et al., 2011; Raza et al., 2010). Une déficience en cellules murales génère des vaisseaux perméables et instables, et est associée à des maladies vasculaires telles que la rétinopathie diabétique et l'artériopathie cérébrale autosomique dominante et par conséquent à la dysfonction d'organe (Enge et al., 2002).

Notre objectif a été ici d'évaluer les conséquences du déficit en Shh sur la survie à moyen terme des vaisseaux néoformés dans les cornées traitées par VEGF.

Cinq jours après la pose d'un implant VEGF le réseau vasculaire est encore immature. Il ne se caractérise pas des mailles peu nombreuses et de taille très variable et un nombre important de vaisseaux peu branchés qui s'alignent dans le sens du gradient de VEGF. Vingt huit jours après la pose de l'implant VEGF, le réseau vasculaire a été remodelé, il est dense et bien organisé en mailles de taille relativement homogènes qui recouvrent l'ensemble de la cornée sans que l'on ne puisse reconnaître particulièrement le site d'insertion de l'implant. Alors qu'à 5 jours les cellules NG2<sup>+</sup> sont nombreuses et tapissent la partie distale des vaisseaux en croissance, à 28 jours elles sont moins nombreuses et distribuées de façon sporadique.





**Figure 83 : Rôle de Shh sur la stabilisation à long terme des vaisseaux de la cornée induits par le VEGF**

Des implants contenant ou non 5  $\mu$ g de VEGF  $\pm$  cyclopamine (10 nmol) ont été insérés dans les cornées de souris C3HeB/FeJ (n=8/groupe). (A). La détection du marqueur endothélial CD31 (rouge : Alexa568®) et du marqueur des cellules murales NG2 (vert : Alexa468®) est réalisée par immunohistofluorescence 28 jours après l'opération. Les images sont prises en microscopie à épi-fluorescence. (B) Le nombre (B-a), le diamètre (B-b), la connectivité des vaisseaux (maille vasculaire) (B-c) sont comptés et quantifiés à partir des images prises. Le nombre des vaisseaux NG2<sup>+</sup> (B-d) est déterminé par comptage des vaisseaux colonisés par des cellules NG2<sup>+</sup>. Les résultats sont exprimés en nombre de fois par rapport aux cornées de contrôle. (NS : p>0,05 et \*\*\* : p<0,0005)



Le blocage de la signalisation Hh par la cyclopamine entraîne d'importantes modifications du réseau vasculaire 28 jours après l'insertion de l'implant. Comme observé à 5 jours, pendant la phase de croissance des néo-vaisseaux en présence de cyclopamine, le nombre cellules NG2<sup>+</sup> sur les vaisseaux est faible. Même si les vaisseaux s'allongent une large partie de la cornée, la surface couverte est réduite par rapport à celle observée en absence de cyclopamine; leur nombre est fortement diminué (63% de réduction) (**Fig. 83A et Fig. 83B-a**). Ils sont fins avec une réduction de leur diamètre de 47% (**Fig. 83A et Fig. 83B-b**) et peu branchés, ce qui se traduit par une diminution de 59% de leur connectivité (**Fig. 83A et Fig. 83B-c**) et par la disparition du réseau en mailles.

Le traitement par la cyclopamine conduit à ce que les néovaisseaux de la cornée induits par le VEGF présentent une déficience du recrutement en cellules murales, de ce fait ces vaisseaux deviennent plus fins, perdent leurs branchements et leurs interconnections, suggérant ainsi qu'ils régressent plus rapidement.

Ces résultats suggèrent que la signalisation Shh est cruciale pour la stabilisation et la survie du réseau vasculaire à long terme, et que son mécanisme d'action est en grande partie lié au recrutement des cellules murales sur les néovaisseaux.

Dans ce travail, seule une analyse morphologique des vaisseaux a été réalisée. Elle ne permet pas d'aborder les mécanismes par lesquels Shh intervient dans la stabilisation des néovaisseaux. Son action se limite-t-elle au recrutement des cellules murales ou agit-elle par d'autres mécanismes, par exemple en agissant sur la survie des cellules de ces néovaisseaux. Des expérimentations complémentaires seront donc nécessaires pour répondre à ces questions.

#### IV. CONCLUSION

Dans ce chapitre nous avons démontré pour la première fois, *in vivo*, que Shh est un médiateur de l'activité du PDGF BB dans le recrutement des cellules murales lors de l'angiogenèse expérimentale de la cornée. Nos résultats obtenus *in vivo* sont en parfait accord avec les données que nous avons obtenues *in vitro* qui démontraient que la migration des CML induite par le PDGF BB impliquait la production de Shh par la CML et l'activation de sa voie de signalisation. En effet, dans le modèle d'angiogenèse de la cornée chez la souris, nous établissons que le PDGF BB produit par les CE des néovaisseaux stimule l'expression de Shh dans les cellules murales NG2<sup>+</sup>, expression qui est cruciale pour leur recrutement sur les néovaisseaux et pour la stabilisation des vaisseaux néoformés.



# **CONCLUSION GENERALE ET DISCUSSION**



Au cours du développement embryonnaire ou de la réparation tissulaire chez l'adulte, la formation du système vasculaire ou la néovascularisation sont des étapes très importantes permettant le transport des nutriments et donc la formation ou la régénération des tissus. Un évènement crucial dans ces processus est le recrutement des cellules murales sur les néovaisseaux qui conduit à la stabilisation et la maturation des vaisseaux néoformés.

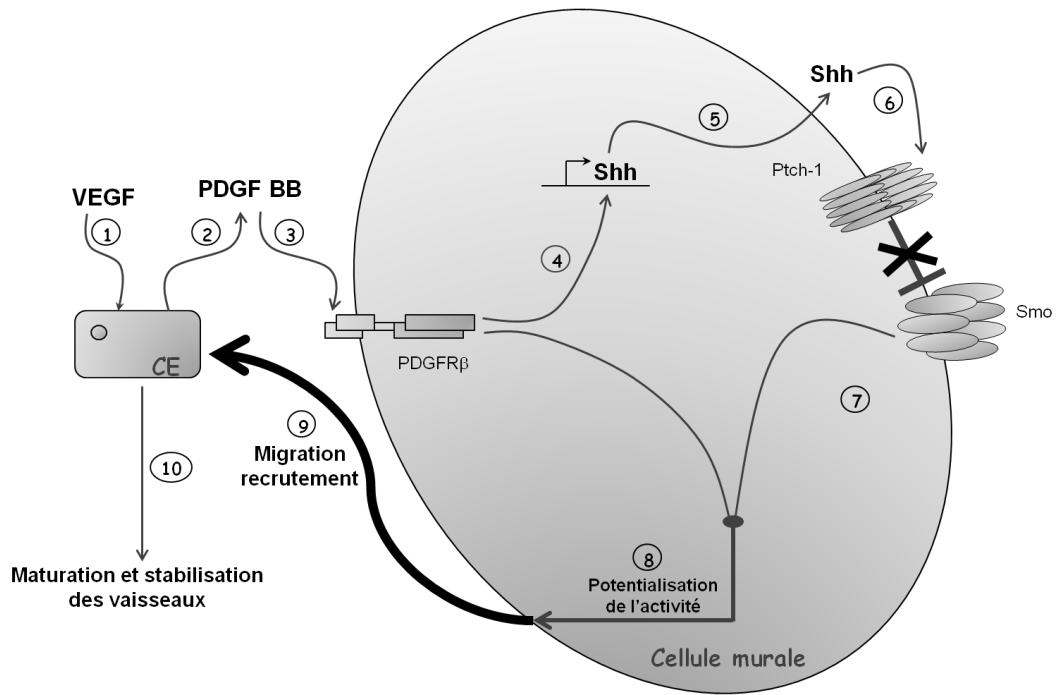
La voie de signalisation Hh a été impliquée essentiellement dans le développement vasculaire embryonnaire (Nagase et al., 2008). Cependant, quelques études, et notamment celles du groupe de D. Losordo, ont mis en évidence le rôle de cette voie chez l'adulte en participant aux mécanismes de réparation tissulaire, notamment en favorisant la croissance de nouveaux vaisseaux, dans l'infarctus du myocarde et l'ischémie du muscle de la patte (Kusano et al., 2005; Pola et al., 2003). Toutefois, le mode d'action des protéines Hh dans la formation de néovaisseaux reste encore à définir, bien qu'il ait été suggéré que les protéines Hh pourraient intervenir au niveau de la maturation du vaisseau en favorisant le recrutement des cellules murales (Kusano et al., 2005).

Dans ce travail, notre objectif principal était de démontrer que la voie Hh est impliquée dans le recrutement des cellules murales sur les néovaisseaux et d'en définir les modes d'action.

Afin de répondre à ces questions, nous avons utilisé :

- d'une part une approche *in vitro* pour définir le rôle des protéines Hh dans la migration des CML en culture,
- d'autre part une approche *in vivo* ayant pour but de vérifier l'effectivité des mécanismes mis en évidence lors de l'étude *in vitro* dans un modèle d'angiogenèse expérimentale de la cornée chez la souris adulte.

Le principal résultat de nos études *in vitro* et *in vivo* est que Shh est une cible du PDGF BB endothélial dans les cellules murales et que l'expression de Shh et l'activation de ses voies de signalisation dans les cellules murales participent à la migration et au recrutement des cellules murales sur les tubes endothéliaux néo-formés (**Fig. 84**). Ce recrutement des cellules murales dépendant de l'expression autocrine de Shh est associé à la maturation et à la stabilisation du nouveau réseau vasculaire.



**Figure 84 : Schéma récapitulatif de l'activation de Shh et de son rôle dans la maturation des néovaisseaux:** l'expression de Shh (1-4) est induite dans les cellules murales en réponse au PDGF BB qui est sécrété par les CE sous stimulation de VEGF. (5-9) L'activation de sa signalisation intracellulaire renforce la migration et le recrutement des cellules murales induite par le PDGF BB vers les néovaisseaux. (10) Les néovaisseaux sont ainsi maturés, ce qui leur confère une meilleure longévité et fonctionnalité.

# CHAPITRE I : SHH DANS LA MIGRATION DES CELLULES MURALES

---

La migration des cellules murales durant l'angiogenèse vers les CE se fait selon un gradient de facteurs produits par la CE (PDGF BB et le HB-EGF) (Enge et al., 2002; Iivanainen et al., 2003). Un des objectifs de cette thèse était de mettre en évidence et de caractériser le rôle des protéines Hh et de leur signalisation dans la migration des CML induite par les facteurs d'origine endothéliale, notamment le PDGF BB.

## I. IMPLICATION DE LA VOIE DE SIGNALISATION HH DANS L'EFFET CHIMIOTACTIQUE DES CE POUR LES CML

Dans ce travail nous avons démontré que la stimulation des CE en culture par le VEGF, un facteur proangiogénique reconnu, induisait une production plus importante de facteurs promigratoires pour les CML. Nous avons confirmé en particulier l'augmentation de la sécrétion de PDGF BB. Nous avons confirmé ce résultat *in vivo* dans le modèle d'angiogenèse de la cornée de souris induite par le VEGF : l'expression de PDGF BB est induite dans les CE des néovaisseaux.

L'implication de la voie de signalisation Hh dans l'effet promigratoire des MC-VEGF des CE a été démontrée à la fois par blocage des protéines Hh (par un anticorps bloquant) et par inhibition de la voie de transduction Hh (par inhibition de Smo). Ces résultats ont par la suite été étendus à la migration des CML induite par le PDGF BB, le facteur chimiotactique de référence des CML.

Le rôle des protéines Hh avait été précédemment décrit dans la guidance de l'axone (Sanchez-Camacho and Bovolenta, 2009) et dans la migration de cellules cancéreuses, (Tang et al., 2012; Zhong et al., 2012). Notre étude démontre, pour la première fois, que les protéines Hh et la signalisation dépendante de Smo sont aussi impliqués dans la migration des CML artérielles induite par des facteurs d'origine endothéliale, le PDGF BB en particulier.

## II. LES PROTEINES HH RECOMBINANTES ACTIVENT LES VOIES HH MAIS NE SONT PAS CHIMIOTACTIQUES POUR LES CML

Plusieurs études *in vivo* ont mis en évidence que les cellules murales pourraient être une cible des protéines Hh à cause de la forte expression forte des récepteurs Ptch-1 et Smo et

des facteurs de transcription Gli. Cette voie est active dans des CML (Byrd et al., 2002), ainsi que dans des péricytes (Nielsen and Dymecki, 2010). Très récemment, des études s'intéressant aux effets de Shh sur la prolifération et la survie des CML *in vitro* (Li et al., 2010a; Morrow et al., 2009) confirment que les CML répondent à Shh.

### **1. Activation des voies de signalisation par les protéines Hh**

Nous avons mis en évidence que les CML d'aorte de rat en culture expriment Ptc et Smo ainsi que les facteurs de transcription Gli. Ces CML répondent aux 3 protéines Hh non seulement par l'activation de la voie canonique Gli1-dépendante, mais aussi par l'activation des kinases MAPK ERK1/2 et PI3K. Cette double activation des voies canonique et non canonique a été observée dans d'autres cellules, par exemple dans les fibroblastes 3T3 (Riobo et al., 2006a; Riobo et al., 2006b). Dans d'autres types cellulaires, il n'existe qu'une voie d'activation; c'est le cas des CE qui répondent à Shh via l'activation de la RhoA (Renault et al., 2010).

Nous montrons aussi que les protéines Shh, Ihh et Dhh ont une capacité d'induction des voies de transduction équivalente dans les CML, alors qu'il a été observé une capacité de réponse de Shh supérieure à celle d'Ihh, elle-même supérieure à celle de Dhh dans d'autres types cellulaires (Pathi et al., 2001).

Nos résultats démontrent aussi pour la première fois l'activation de l'isoforme  $\gamma$  de la PI3K suite au traitement des CML par Shh. Ce résultat semble logique puisque le co-récepteur Smo des protéines Hh est un RCPG et qu'il est généralement admis que c'est la PI3K $\gamma$  qui est activée par les RCPG (Brazzatti et al., 2012). Cependant, l'induction de la PI3K $\gamma$  par Shh reste à confirmer en utilisant notamment le blocage de la PI3K $\gamma$  un dominant négatif.

De plus, nous avons mis en évidence l'activation de la voie canonique Gli-dépendante par les protéines Hh recombinantes dans les CML en culture, confirmant ce qui avait été montré pour Shh (Li et al., 2010a).

### **2. Les protéines Hh seules n'induisent pas la migration des CML**

Malgré le fait que les protéines Hh recombinantes activent plusieurs voies de signalisation dans les CML, nous avons trouvé qu'elles n'étaient pas chimiotactiques pour les CML (**Fig. 35**) contrairement à ce qui a été démontré pour les neurones (Sanchez-Camacho and Bovolenta, 2009). Cependant, les CML transduites par l'Ad-Shh présentent une motilité accrue dans le test de chimiokinèse en Transwell et en vidéomicroscopie par rapport les cellules transduites par l'Ad-Ctrl (**Fig. 40**).



### III. PARTICIPATION DE LA SHH DES CML A LA MIGRATION DES CML INDUITES PAR LES FACTEURS ENDOTHELIAUX, EN PARTICULIER LE PDGF BB

La migration des CML induite par le MC de CE stimulées par le VEGF est partiellement inhibée par blocage des protéines Hh suggérant une production des protéines Hh par les CE ou les CML.

Les protéines Hh des CE ne sont pas impliqués dans la migration des CML puisque non seulement leur expression est très faible, mais aussi parce que l'épuisement des protéines Hh dans le MC des CE ne modifie pas son activité migratoire.

L'hypothèse restante était que les protéines Hh étaient produites par les CML sous l'influence de facteurs produits par les CE stimulées par le VEGF. De fait, nous avons pu mettre en évidence une augmentation de l'expression de Shh lorsque les CML sont traitées par le MC des CE stimulées par le VEGF.

Nous avons montré que plusieurs facteurs potentiellement régulateurs de l'expression de Shh étaient sécrétés par les CE stimulées par le VEGF. Parmi eux, nous nous sommes particulièrement intéressés au PDGF BB, un facteur chimiotactique des CML, parfaitement reconnu pour être un acteur majeur du recrutement des cellules murales sur les néovaisseaux (Enge et al., 2002).

De fait, nous avons démontré que le PDGF BB recombinant induisait l'expression et la sécrétion de Shh dans les CML en culture, confirmant en cela les travaux de Li et al. (Li et al., 2010a), Par contre, les expressions d'Ihh et Dhh ne sont pas activées par le PDGF BB, laissant supposer une activation génique spécifique pour Shh dans les CML artérielles. Nous n'avons pas abordé dans cette étude les mécanismes de l'induction de l'expression de Shh par le PDGF BB, mais il est à noter qu'une étude a mis en évidence que Shh était régulé positivement par le PDGF BB via un mécanisme PI3K/Akt dépendant dans les cellules étoilées du foie (Yang et al., 2008).

De façon originale, nous avons mis en évidence que le Shh produit par les CML sous l'influence du PDGF BB participait effectivement à la migration des CML induite par le PDGF BB. Le fait que la protéine recombinante Shh ne soit pas chimiotactique pour les CML, mais que son expression autocrine dans les CML participe à la migration des CML induite par le PDGF BB pouvait s'expliquer soit par une complémentarité des voies de transduction induite par ces facteurs (cette hypothèse est confortée par le fait que le prétraitement des CML par Shh, qui n'est pas migratoire par lui-même, potentialise la migration induite par le PDGF

BB), soit par une préparation des CML à répondre au PDGF BB, soit encore par une augmentation de la chimiokinèse par le Shh produit par les CML.

La complémentation de l'activité migratoire du PDGF BB suite à la stimulation d'une production autocrine d'un nouveau facteur dans les CML a déjà été décrite : l'OPN, le MCP-1 et l'endothéline-1 sont induits suite à la stimulation des CML par le PDGF BB et participent à la migration induite par ce facteur (Bisaillon et al., 2010; Fougerat et al., 2012; Jalvy et al., 2007b).

#### IV. MECANISME DU SHH AUTOCHRINE DANS LA MIGRATION DES CML INDUITE PAR LE PDGF BB

Nous avons cherché à savoir comment le Shh produit dans les CML sous l'effet du PDGF BB pouvait potentialiser l'effet migratoire de ce facteur puisque Shh par lui-même est incapable d'induire la migration des CML.

Le rôle de Shh dans l'effet chimiotactique du PDGF BB pourrait s'expliquer par une coopération de Shh avec le PDGF BB favorisant la migration des CML. Un tel rôle synergique avec le PDGF BB a été déjà décrit pour les protéines de la MEC (fibronectine, laminine, collagène I ou IV) (Nelson et al., 1997), l'insuline (Golovchenko et al., 2003), le facteur de coagulation VII (FVII) (Siegbahn et al., 2008) et l'endothéline-1 (Kohno et al., 1998). Même si ce phénomène a été décrit les mécanismes sous-jacents sont encore mal compris et probablement spécifiques de la molécule étudiée.

Nous avons démontré que Shh possédait une activité chimiokinétique pour les CML pouvant expliquer ainsi son potentiel à augmenter l'activité chimiotactique du PDGF BB.

Dans ce travail nous avons aussi démontré que Shh induisait dans la CML une activation de différentes voies de signalisation susceptibles de potentialiser l'effet intracellulaire du PDGF BB comme la voie canonique Gli1-dépendante et les voies non-canoniques MAPK ERK1/2 et PI3K $\gamma$ . Cette double activation des voies canonique et non canonique a été observée dans d'autres cellules, comme les fibroblastes 3T3 (Riobo et al., 2006a; Riobo et al., 2006b).

##### 1. Voies non-canoniques

Nous avons démontré qu'il existe 2 pics d'activation de MAPK ERK1/2 par le PDGF BB : une première activation rapide et très transitoire liée à l'effet direct de PDGF BB suivie

d'une réactivation au-delà de la 4<sup>ème</sup> heure de stimulation par le PDGF BB, qui est dépendante de la production autocrine de Shh par les CML (**Fig. 57**). Le fait que le Shh autocrine participe à la migration des CML induite par le PDGF BB pourrait s'expliquer par la réactivation différée d'ERK1/2. L'inhibition des MEK1/2 au-delà de la 4<sup>ème</sup> heure de stimulation pourrait permettre de vérifier cette hypothèse.

Comme pour les ERK1/2, nous avons montré qu'il existait 2 phases d'activation de la PI3K par le PDGF BB dans les CML. La première activation est transitoire, insensible à un inhibiteur de la PI3K $\gamma$ , est la conséquence de l'activation des CML par le PDGF BB via son récepteur PDGFR $\beta$ . La deuxième activation est dépendante de la production autocrine de Shh. Grâce à la disponibilité d'un inhibiteur spécifique, nous avons pu montrer que la seconde phase d'activation de la PI3K était due à la PI3K $\gamma$  (**Fig. 55**) et que cette activation de la PI3K $\gamma$  était bien associée à la production autocrine de Shh et à la potentialisation de l'effet migratoire du PDGF BB.

Le rôle de la signalisation RCPG-dépendante dans la migration des CML est bien décrit dans la littérature scientifique. Cependant, l'implication de l'isoforme PI3K $\gamma$  dans la migration des CML n'a été rapportée que récemment pour les CML stimulées par MCP-1 (Fougerat et al., 2012) alors qu'il est bien décrit dans les cellules inflammatoires (Bony et al., 2001; Chen et al., 2008 ; Hannigan et al., 2002 ; Hasan et al., 2010 ; Jones et al., 2003 ).

Bien que notre étude montre que la 2<sup>ème</sup> vague de phosphorylation de l'Akt (due à l'activation de la PI3K $\gamma$  par Shh autocrine) est liée à l'augmentation de la migration induite par le PDGF BB, le mécanisme précis de cette augmentation reste encore à définir puisque la signalisation en aval des différentes PI3K semble être identique (Brazzatti et al., 2012). L'effet potentialisateur est-il simplement lié à un cumul des activations de ces différentes PI3K ou au fait que la PI3K $\gamma$  induise des réponses spécifiques? Des expérimentations complémentaires (surexpression de la PI3K $\gamma$ ) seront nécessaires pour répondre à cette question.

Il est fort possible que d'autres voies soient impliquées dans la potentialisation des effets migratoire du PDGF BB par le Shh autocrine en plus des voies MAPK ERK1/2 et PI3K $\gamma$ . Nous avons aussi mis en évidence que la transactivation de PDGFR $\beta$  et l'activation de la FAK ne sont pas impliquées dans l'effet de Shh. Par contre, l'activation directe de l'intégrine  $\beta$ 3 pourrait être une cible potentielle, puisque elle est phosphorylée par le Shh recombinant. Cette hypothèse reste à vérifier.

## 2. Voie canonique Gli1-dépendante

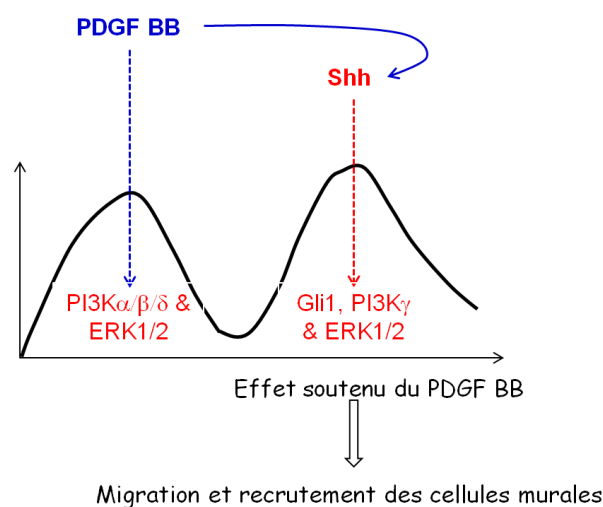
Nous avons mis en évidence une activation du facteur de transcription Gli1 dans les CML traitées par le PDGF BB. Cette activation de la voie Gli1 qui est liée à l'expression autocrine de Shh, est aussi impliquée dans la migration des CML induite par le PDGF BB. La migration cellulaire Gli1-dépendante a été décrite dans quelques types cellulaires, notamment les neurones et les cellules cancéreuses, mais aussi dans les CE, via l'induction de l'expression de facteurs pro-angiogéniques tels que Cyr61 (Harris et al., 2012).

Dans notre étude, nous avons cherché à identifier des gènes cibles qui pouvaient être impliqués dans l'effet potentialisateur de Shh sur la migration des CML. Cette approche a été réalisée via une approche gènes candidats selon deux critères : *i*). transcription dépendante du facteur de transcription Gli1; *ii*). implication dans la migration des CML.

Parmi les gènes étudiés (nétrine-1, OPN, Cyr 61 et PDGFR $\beta$ ), seul le Cyr61 est un cible de la voie Gli1 dans les CML puisqu'il est activé par Shh et PDGF BB recombinants via un mécanisme Gli1-dépendant. Il reste toutefois à vérifier son rôle dans la migration des CML dépendante de Shh par l'utilisation d'anticorps bloquant ou inhibition de l'expression par siRNA.

Une analyse plus large par microarray devrait permettre d'isoler d'autres cibles de Gli1 en comparant par exemple le profil d'expression génique dans des CML traitées ou non par le PDGF BB en présence ou non d'un inhibiteur de Gli ou d'un dominant négatif de Gli1.

## 3. Proposition de mécanisme d'action du Shh autocrine



**Figure 85 : Shh renforce l'effet chimiotactique du PDGF BB par maintien du signal intracellulaire et activation de la voie Gli1 : explication décrite dans le paragraphe suivant**

Nous avons montré que Shh est exprimé à partir de la 4<sup>ème</sup> heure dans les CML stimulées par PDGF BB. Le PDGF BB induit une première vague de signalisation intracellulaire suivie d'une seconde activation de PI3K $\gamma$ , ERK1/2 et Gli1. Nous avons montré que cette seconde vague est concomitante et dépendante de l'expression de Shh. Ce processus en cascade permet ainsi le maintien de l'activation cellulaire pendant une plus longue durée et la complétion du processus qui conduit à la migration (**Fig. 85**).

## V. CONCLUSION

Ce travail, réalisé essentiellement sur des cellules murales en culture (CML), démontre que :

- les protéines Hh par elles mêmes n'induisent pas la migration des CML;
- la voie Hh est impliquée dans la migration induite par le PDGF BB et probablement d'autres facteurs d'origine endothéliale ;
- Shh est exprimé dans les CML suite à une stimulation par le PDGF BB ;
- la potentialisation de l'effet migratoire du PDGF BB par Shh endogène est liée au maintien de l'activation des ERK1/2, et à l'activation de la PI3K $\gamma$  et de la transcription dépendante de Gli.

Le rôle de Shh dans la maturation des néovaisseaux pourrait par conséquent être lié à une augmentation de la migration des cellules murales (CML et péricytes) induite par les facteurs sécrétés par les CE et par conséquent à une augmentation des cellules murales sur les néovaisseaux.

Cette, hypothèse a été en partie confirmée par l'étude de l'influence de Shh sur la maturation des vaisseaux que nous avons réalisée sur le modèle d'angiogenèse de la cornée chez la souris.

## CHAPITRE II: SHH DANS LA MUSCULARISATION ET LA STABILISATION DES VAISSEAUX

---

### I. EXPRESSION DE SHH DURANT LA NEOVASCULARISATION

Chez l'adulte, l'expression de Shh est généralement faible en condition physiologique normale. Cependant durant différents processus pathologiques cette expression est fortement augmentée. En effet l'expression de Shh est activée dans les cellules épithéliales durant la fibrose (Fabian et al., 2012 ; Shin et al., 2011 ; Stewart et al., 2003), dans les cellules mésenchymateuses durant la néovascularisation (Pola et al., 2003), dans les cellules neuronales progénitrices durant la régénération neuronale et celle de la peau (Adolphe and Wainwright, 2005; Williams, 2005 ), ainsi que dans les cellules tumorales (Fan et al., 2004; Karhadkar et al., 2004; Sanchez et al., 2004).

Nos travaux apportent la première démonstration que Shh est exprimé *in vivo* par des cellules murales NG2<sup>+</sup> situées notamment à la pointe des vaisseaux en croissance lors de la néovascularisation. Comme dans les CML *in vitro*, nos résultats *in vivo* montrent que l'expression des 2 autres membres de la famille Hh (Ihh et Dhh) est très faible dans les cellules murales et suggèrent un rôle potentiellement prépondérant de Shh.

Nous avons démontré, tant *in vitro* (CML) qu'*in vivo* (cellules murales NG2<sup>+</sup>) que l'induction de l'expression de Shh dépendait de l'action de facteurs endothéliaux, notamment du PDGF BB. Dans cette étude, nous n'avons pas abordé le mécanisme de l'induction de l'expression de Shh. Il a été montré que le PDGF BB régule l'expression de Shh dans des cellules étoilées du foie myofibroblastiques via un mécanisme dépendant de la voie PI3K/Akt (Yang et al., 2008). D'autres études se sont intéressées aux mécanismes de la régulation génique de Shh dans d'autres types cellulaires (Kasperczyk et al., 2009 ; Sun et al., 2009; Wang et al., 2012 ). Les mécanismes de la régulation de l'expression de Shh par le PDGF BB dans des cellules murales en culture ainsi qu'*in vivo* au cours de la néovascularisation de la cornée restent à définir.

### II. ROLE DE SHH DANS LA MATURATION DES NEOVAISSEAUX

Notre hypothèse est que Shh dirige le mouvement de cellules murales pré-existantes. En effet nos résultats *in vitro* ont mis en évidence que Shh stimule la motilité (participation à

la migration induite par le PDGF BB et augmentation de la chimiokinèse) des cellules murales en culture (CML).

Dans le modèle d'angiogenèse de la cornée de souris nous avons mis en évidence que l'inhibition de la signalisation de Shh, comme de celle de PDGF BB, diminue le recrutement des cellules murales NG2<sup>+</sup> sur les néo-vaisseaux. Comme Shh est régulé positivement par le PDGF BB dans ce modèle comme dans les CML en culture, nous avons conclu que Shh fonctionne en tant qu'effecteur du PDGF BB dans le recrutement des cellules murales sur les vaisseaux néo-formés et par conséquent la maturation des vaisseaux. Nos résultats complètent par conséquent les données de la littérature montrant que la signalisation Shh intervient dans la musculation des vaisseaux (Kusano et al., 2005), en apportant une explication mécanistique.

La musculation des vaisseaux correspond à un ensemble de mécanismes qui contribuent à la couverture des vaisseaux par des cellules murales ayant potentiellement des origines différentes : *i*). cellules murales qui préexistent dans les tissus environnants et sont activées en réponse aux stimuli mitogènes ou promigratoires; *ii*). cellules mésenchymateuses ou CE qui se transdifférencient en cellules murales (Frid et al., 2002; Zhou et al., 2009 ).

### **1. Cellules vasculaires répondant à Shh**

Nos résultats proposent que le Shh produit par les cellules murales sous l'action de PDGF BB participe à leur recrutement. Une action autocrine peut être envisagée mais l'hypothèse d'une action paracrine indirecte reste encore une possibilité. Même si *in vitro* les éléments de la voie Hh (les récepteurs Ptch et Smo, les différents Gli) ont été caractérisés dans plusieurs types cellulaires incluant les CE et les CML, l'identification des cellules répondant aux protéines Hh est plus difficile à réaliser *in vivo* en raison d'un manque d'outils (pas d'anticorps anti-Ptch efficace) et du fait que les voies non-canoniques de Hh manquent de spécificité.

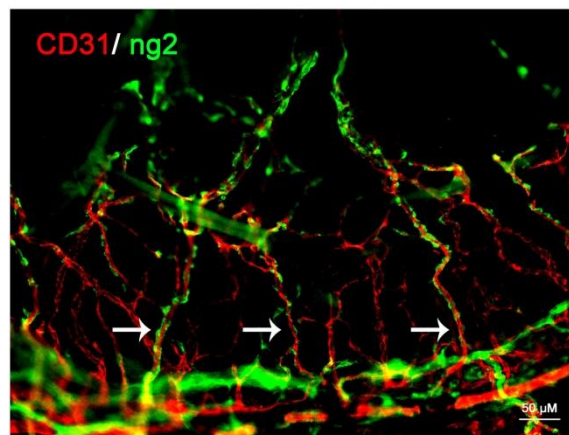
Outre nos expériences qui montrent que les cellules murales en culture (CML) répondent à Shh, de nombreux arguments de la littérature confirment une possibilité de réponse directe des cellules murales à Shh. L'utilisation de marqueurs spécifiques caractérisant l'activation de la voie Hh comme (Ptch-1, Gli1 et Gli2) a permis de proposer que durant la fibrose rénale, les cellules murales PDGFR $\beta$ <sup>+</sup>/SMA<sup>+</sup> (Fabian et al., 2012) répondent aux protéines Hh. Récemment, une étude a décrit pour la première fois la présence des éléments de la signalisation Hh (Ptch-1, Gli1 et Gli2) dans les péricytes autour des vaisseaux

du plexus choroïde (Nielsen and Dymecki, 2010). Dans la littérature, de nombreuses autres études ont utilisé des souris transgéniques rapporteuses de l'activité de la voie Hh pour montrer que les cellules murales (CML et péricytes) sont des cellules qui répondent à Shh. En particulier l'utilisation de souris Ptch1-lacZ dans lesquelles les cellules dont la voie Hh est activée sont identifiables par leur activité  $\beta$  galactosidase, a permis de démontrer qu'au cours de l'embryogenèse les CML (mais pas les CE) localisées dans le mésoderme sont la cible directe des protéines Hh (Byrd et al., 2002). De plus chez l'adulte, elles ont aussi permis de montrer que les CML et les fibroblastes périvasculaires de l'aorte répondent à un signal Hh (Pola et al., 2001).

En utilisant ces mêmes outils, il apparaît que les CE ne répondent pas à Shh par l'activation de la voie canonique.

## **2. Origine des cellules murales NG2<sup>+</sup> répondant à Shh**

L'origine des cellules murales recrutées chez l'adulte reste en discussion. Il a été suggéré que les cellules murales dans la cornée proviendraient soit de cellules préexistantes qui proliféreraient, soit de cellules progénitrices (Mancuso et al., 2011 ; Zhou et al., 2009).



**Figure 86 : Croissance de nouveaux vaisseaux à partir des vaisseaux préexistants**

Des implants contenant 5  $\mu$ g de VEGF ont été insérés dans les cornées de souris C3HeB/FeJ. La détection du marqueur endothélial CD31 (rouge : Alexa568®) et du marqueur des cellules murales NG2 (vert : Alexa468®) est réalisée par immunohistofluorescence 5 jours après l'opération. Les images sont prises en microscopie à épi-fluorescence.

La cornée saine est vascularisée sur son pourtour par une artère et 2 veines associées à un réseau connectant ces vaisseaux. L'artère est recouverte de cellules murales parmi lesquelles certaines expriment le marqueur NG2<sup>+</sup>. L'observation que les vaisseaux croissent à partir de ces vaisseaux périphériques et qu'il existe une continuité des vaisseaux néoformés avec ce réseau préexistant (**Fig. 86**) suggère que les cellules murales NG2<sup>+</sup> pourraient



provenir des gros vaisseaux périphériques en migrant le long du réseau vasculaire en croissance.

Par ailleurs, Shh est aussi connu pour maintenir l'état indifférencié des cellules progénitrices/souches et il a été récemment montré qu'il jouait un rôle dans le maintien des cellules progénitrices des cellules murales Sca1<sup>+</sup>/PDGFRβ<sup>+</sup> (Passman et al., 2008). Au cours de l'angiogenèse, Shh pourrait donc favoriser la prolifération et la croissance d'un pool de progéniteurs de cellules murales.

Une analyse de la cinétique de prolifération des cellules murales NG2<sup>+</sup> sur des temps courts après la pose d'un implant VEGF dans la cornée pourrait nous indiquer si les cellules murales recrutées sont issues de cellules qui ont récemment proliféré ou si elles proviennent de la migration de cellules murales quiescentes. L'expérience réalisée en présence de cyclophamide permettrait d'identifier les étapes précoces qui impliquent Shh. En parallèle une recherche des cellules Sca1<sup>+</sup>/PDGFRβ<sup>+</sup> devrait nous renseigner sur l'existence et le développement de cellules progénitrices localement.

### **3. Mécanismes d'action de Shh dans la musculation des vaisseaux**

Les expériences *in vitro* ont démontré que Shh participe à l'effet chimiotactique et de recrutement des cellules murales du PDGF BB, bien que Shh ne possède pas d'activité chimiotactique par lui-même. Nos résultats amènent donc à la conclusion que Shh fonctionne en tant qu'effecteur du PDGF BB produit par les CE. Cependant pour confirmer cette hypothèse, il serait intéressant de définir le rôle spécifique et le devenir des cellules murales NG2<sup>+</sup> répondant à Shh au cours de la maturation des vaisseaux. Cela est possible par une approche génétique utilisant des souris déficientes en Smo spécifiquement dans les cellules murales NG2<sup>+</sup> ou endothéliales (NG2<sup>ERT2</sup>-Cre ; Smo<sup>Flox/Flox</sup>., Tie2-Cre; Smo<sup>Flox/Flox</sup>).

## **III. SHH EST IMPLIQUÉ DANS LA STABILISATION DES VAISSEAUX**

La néovascularisation de la cornée est aussi un modèle de régression des néovaisseaux. Les vaisseaux croissent à partir de 2<sup>ème</sup> jour après l'opération et régressent après 1 ou 2 mois selon les lignées animales utilisées (Peebo et al., 2011). Dans cette étude, nous avons mis en évidence l'effet de Shh dans la stabilisation des néovaisseaux induits par VEGF. La présence de cyclophamide lors de l'induction de l'angiogenèse accélère la déstabilisation et la régression des vaisseaux néoformés.

Dans ce travail préliminaire, seule une analyse morphologique des vaisseaux a été réalisée. Il sera important de déterminer si l'accentuation de la régression des néovaisseaux en présence de cyclopamine est liée à l'inhibition du recrutement des cellules murales lors des premières étapes de l'angiogenèse ou si elle est due à l'inhibition d'un autre processus dépendant de Shh, comme par exemple la survie cellulaire.

**Notre étude démontre l'activation de l'expression et l'implication de Shh dans la maturation et la stabilisation des néovaisseaux au cours de l'angiogenèse chez l'adulte.**

**Conjointement, les études réalisées sur les CML vasculaires en culture et sur l'angiogenèse de la cornée montrent que l'expression de Shh dans les cellules murales est associée à leur stimulation par le PDGF BB d'origine endothéliale, dénotant le dialogue existant entre CE et cellules murales. Cette étude montre aussi que Shh agit en renforçant l'activité migratoire du PDGF BB et probablement d'autres facteurs endothéliaux impliqués dans le recrutement des CML sur les néovaisseaux.**

**Ainsi, notre étude fournit une explication sur le mécanisme d'action de Shh dans la maturation des vaisseaux, bien qu'il ne soit pas exclu que Shh puisse agir par d'autres mécanismes.**

# **BIBLIOGRAPHIE**



- Adolphe, C. and Wainwright, B., 2005. Pathways to improving skin regeneration. *Expert Rev Mol Med*, 7(20): 1-14.
- Agouni, A. et al., 2007. Sonic hedgehog carried by microparticles corrects endothelial injury through nitric oxide release. *Faseb J*, 21(11): 2735-41.
- Ahmed, R.P., Haider, K.H., Shujia, J., Afzal, M.R. and Ashraf, M., 2010. Sonic Hedgehog gene delivery to the rodent heart promotes angiogenesis via iNOS/netrin-1/PKC pathway. *PLoS One*, 5(1): e8576.
- Allen, B.L. et al., 2011. Overlapping roles and collective requirement for the coreceptors GAS1, CDO, and BOC in SHH pathway function. *Dev Cell*, 20(6): 775-87.
- Allen, C.L. and Bayraktutan, U., 2008. Differential mechanisms of angiotensin II and PDGF-BB on migration and proliferation of coronary artery smooth muscle cells. *J Mol Cell Cardiol*, 45(2): 198-208.
- Allende, M.L., Yamashita, T. and Proia, R.L., 2003. G-protein-coupled receptor S1P1 acts within endothelial cells to regulate vascular maturation. *Blood*, 102(10): 3665-7.
- Alvarez, J.I. et al., 2011. The Hedgehog pathway promotes blood-brain barrier integrity and CNS immune quiescence. *Science*, 334(6063): 1727-31.
- Ando, K. et al., 2011. Tenascin C may regulate the recruitment of smooth muscle cells during coronary artery development. *Differentiation*, 81(5): 299-306.
- Andrae, J., Gallini, R. and Betsholtz, C., 2008. Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. *Genes Dev*, 22(10): 1276-312.
- Aplin, A.C., Fogel, E. and Nicosia, R.F., 2010. MCP-1 promotes mural cell recruitment during angiogenesis in the aortic ring model. *Angiogenesis*, 13(3): 219-26.
- Arimura, K. et al., 2012. PDGF receptor beta signaling in pericytes following ischemic brain injury. *Curr Neurovasc Res*, 9(1): 1-9.
- Armulik, A., Abramsson, A. and Betsholtz, C., 2005. Endothelial/pericyte interactions. *Circ Res*, 97(6): 512-23.
- Armulik, A., Genove, G. and Betsholtz, C., 2011. Pericytes: developmental, physiological, and pathological perspectives, problems, and promises. *Dev Cell*, 21(2): 193-215.
- Asai, J. et al., 2006. Topical sonic hedgehog gene therapy accelerates wound healing in diabetes by enhancing endothelial progenitor cell-mediated microvascular remodeling. *Circulation*, 113(20): 2413-24.
- Astorga, J. and Carlsson, P., 2007. Hedgehog induction of murine vasculogenesis is mediated by Foxf1 and Bmp4. *Development*, 134(20): 3753-61.
- Augustin, H.G., Koh, G.Y., Thurston, G. and Alitalo, K., 2009. Control of vascular morphogenesis and homeostasis through the angiopoietin-Tie system. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10(3): 165-77.
- Ayers, K.L. and Therond, P.P., 2010. Evaluating Smoothened as a G-protein-coupled receptor for Hedgehog signalling. *Trends Cell Biol*, 20(5): 287-98.
- Bachinsky, W.B. et al., 1995. Sustained inhibition of intimal thickening. In vitro and in vivo effects of polymeric beta-cyclodextrin sulfate. *J Clin Invest*, 96(6): 2583-92.
- Ball, S.G., Shuttleworth, C.A. and Kielty, C.M., 2010. Platelet-derived growth factor receptors regulate mesenchymal stem cell fate: implications for neovascularization. *Expert Opin Biol Ther*, 10(1): 57-71.
- Barnes, E.A., Kong, M., Ollendorff, V. and Donoghue, D.J., 2001. Patched1 interacts with cyclin B1 to regulate cell cycle progression. *Embo J*, 20(9): 2214-23.
- Barst, R.J., 2005. PDGF signaling in pulmonary arterial hypertension. *J Clin Invest*, 115(10): 2691-4.
- Basciani, S., Mariani, S., Spera, G. and Gnassi, L., 2010. Role of platelet-derived growth factors in the testis. *Endocr Rev*, 31(6): 916-39.

- Benameur, T., Soleti, R., Porro, C., Andriantsitohaina, R. and Martinez, M.C., 2010. Microparticles carrying Sonic hedgehog favor neovascularization through the activation of nitric oxide pathway in mice. *PLoS One*, 5(9): e12688.
- Benjamin, L.E., Hemo, I. and Keshet, E., 1998. A plasticity window for blood vessel remodelling is defined by pericyte coverage of the preformed endothelial network and is regulated by PDGF-B and VEGF. *Development*, 125(9): 1591-8.
- Berman, D.M. et al., 2003. Widespread requirement for Hedgehog ligand stimulation in growth of digestive tract tumours. *Nature*, 425(6960): 846-51.
- Berrios-Otero, C.A., Wadghiri, Y.Z., Nieman, B.J., Joyner, A.L. and Turnbull, D.H., 2009. Three-dimensional micro-MRI analysis of cerebral artery development in mouse embryos. *Magn Reson Med*, 62(6): 1431-9.
- Betsholtz, C., Lindblom, P. and Gerhardt, H., 2005. Role of pericytes in vascular morphogenesis. *Exs*(94): 115-25.
- Bijlsma, M.F., Borensztajn, K.S., Roelink, H., Peppelenbosch, M.P. and Spek, C.A., 2007. Sonic hedgehog induces transcription-independent cytoskeletal rearrangement and migration regulated by arachidonate metabolites. *Cell Signal*, 19(12): 2596-604.
- Bijlsma, M.F. et al., 2009. Hypoxia induces a hedgehog response mediated by HIF-1alpha. *J Cell Mol Med*, 13(8B): 2053-60.
- Bisaillon, J.M. et al., 2010. Essential role for STIM1/Orai1-mediated calcium influx in PDGF-induced smooth muscle migration. *Am J Physiol Cell Physiol*, 298(5): C993-1005.
- Bitgood, M.J., Shen, L. and McMahon, A.P., 1996. Sertoli cell signaling by Desert hedgehog regulates the male germline. *Curr Biol*, 6(3): 298-304.
- Bjarnegard, M. et al., 2004. Endothelium-specific ablation of PDGFB leads to pericyte loss and glomerular, cardiac and placental abnormalities. *Development*, 131(8): 1847-57.
- Bony, C. et al., 2001. A specific role of phosphatidylinositol 3-kinase gamma. A regulation of autonomic Ca(2)+ oscillations in cardiac cells. *J Cell Biol*, 152(4): 717-28.
- Bourdeau, A., Dumont, D.J. and Letarte, M., 1999. A murine model of hereditary hemorrhagic telangiectasia. *J Clin Invest*, 104(10): 1343-51.
- Brazzatti, J.A. et al., 2012. Differential roles for the p101 and p84 regulatory subunits of PI3Kgamma in tumor growth and metastasis. *Oncogene*, 31(18): 2350-61.
- Brown, L.A. et al., 2000. Insights into early vasculogenesis revealed by expression of the ETS-domain transcription factor Fli-1 in wild-type and mutant zebrafish embryos. *Mech Dev*, 90(2): 237-52.
- Brown, S.L., Lundgren, C.H., Nordt, T. and Fujii, S., 1994. Stimulation of migration of human aortic smooth muscle cells by vitronectin: implications for atherosclerosis. *Cardiovasc Res*, 28(12): 1815-20.
- Buglino, J.A. and Resh, M.D., 2010. Identification of conserved regions and residues within Hedgehog acyltransferase critical for palmitoylation of Sonic Hedgehog. *PLoS One*, 5(6): e11195.
- Bussolino, F. et al., 1995. Platelet activating factor produced in vitro by Kaposi's sarcoma cells induces and sustains in vivo angiogenesis. *J Clin Invest*, 96(2): 940-52.
- Byrd, N. et al., 2002. Hedgehog is required for murine yolk sac angiogenesis. *Development*, 129(2): 361-72.
- Byrd, N. and Gabel, L., 2004. Hedgehog signaling in murine vasculogenesis and angiogenesis. *Trends Cardiovasc Med*, 14(8): 308-13.
- Cai, W.J. et al., 2009. Activation of the integrins alpha 5beta 1 and alpha v beta 3 and focal adhesion kinase (FAK) during arteriogenesis. *Mol Cell Biochem*, 322(1-2): 161-9.
- Calzolari, F. and Malatesta, P., 2010. Recent insights into PDGF-induced gliomagenesis. *Brain Pathol*, 20(3): 527-38.

- Camozzi, M. et al., 2005. Pentraxin 3 inhibits fibroblast growth factor 2-dependent activation of smooth muscle cells in vitro and neointima formation in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 25(9): 1837-42.
- Cao, R. et al., 2010. VEGFR1-mediated pericyte ablation links VEGF and PlGF to cancer-associated retinopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(2): 856-61.
- Capurro, M.I. et al., 2008. Glypican-3 inhibits Hedgehog signaling during development by competing with patched for Hedgehog binding. *Dev Cell*, 14(5): 700-11.
- Cardoso, F.L., Brites, D. and Brito, M.A., 2010. Looking at the blood-brain barrier: molecular anatomy and possible investigation approaches. *Brain Res Rev*, 64(2): 328-63.
- Carmeliet, P. and Jain, R.K., 2000. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*, 407(6801): 249-57.
- Carvalho, R.L. et al., 2007. Compensatory signalling induced in the yolk sac vasculature by deletion of TGFbeta receptors in mice. *J Cell Sci*, 120(Pt 24): 4269-77.
- Chae, S.S., Paik, J.H., Allende, M.L., Proia, R.L. and Hla, T., 2004. Regulation of limb development by the sphingosine 1-phosphate receptor S1p1/EDG-1 occurs via the hypoxia/VEGF axis. *Dev Biol*, 268(2): 441-7.
- Chambers, R.C., Leoni, P., Kaminski, N., Laurent, G.J. and Heller, R.A., 2003. Global expression profiling of fibroblast responses to transforming growth factor-beta1 reveals the induction of inhibitor of differentiation-1 and provides evidence of smooth muscle cell phenotypic switching. *Am J Pathol*, 162(2): 533-46.
- Chen, H., Ma, N., Xia, J., Liu, J. and Xu, Z., 2012. beta2-Adrenergic receptor-induced transactivation of epidermal growth factor receptor and platelet-derived growth factor receptor via Src kinase promotes rat cardiomyocyte survival. *Cell Biol Int*, 36(3): 237-44.
- Chen, J.K., Taipale, J., Cooper, M.K. and Beachy, P.A., 2002a. Inhibition of Hedgehog signaling by direct binding of cyclopamine to Smoothened. *Genes Dev*, 16(21): 2743-8.
- Chen, J.K., Taipale, J., Young, K.E., Maiti, T. and Beachy, P.A., 2002b. Small molecule modulation of Smoothened activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(22): 14071-6.
- Chen, J.N. et al., 1996. Mutations affecting the cardiovascular system and other internal organs in zebrafish. *Development*, 123: 293-302.
- Chen, S. et al., 2008. RACK1 regulates directional cell migration by acting on G betagamma at the interface with its effectors PLC beta and PI3K gamma. *Mol Biol Cell*, 19(9): 3909-22.
- Chen, W. et al., 2004. Activity-dependent internalization of smoothened mediated by beta-arrestin 2 and GRK2. *Science*, 306(5705): 2257-60.
- Chen, W. et al., 2011. Canonical hedgehog signaling augments tumor angiogenesis by induction of VEGF-A in stromal perivascular cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(23): 9589-94.
- Chiang, C. et al., 1996. Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function. *Nature*, 383(6599): 407-13.
- Chignalia, A.Z. et al., 2012. Testosterone induces vascular smooth muscle cell migration by NADPH oxidase and c-Src-dependent pathways. *Hypertension*, 59(6): 1263-71.
- Chinchilla, P., Xiao, L., Kazanietz, M.G. and Riobo, N.A., 2010. Hedgehog proteins activate pro-angiogenic responses in endothelial cells through non-canonical signaling pathways. *Cell Cycle*, 9(3): 570-79.
- Cho, H., Kozasa, T., Bondjers, C., Betsholtz, C. and Kehrl, J.H., 2003. Pericyte-specific expression of Rgs5: implications for PDGF and EDG receptor signaling during vascular maturation. *Faseb J*, 17(3): 440-2.

- Chon, J.H. and Chaikof, E.L., 2001. Soluble heparin-binding peptides regulate chemokinesis and cell adhesive forces. *Am J Physiol Cell Physiol*, 280(6): C1394-402.
- Chuang, P.T., Kawcak, T. and McMahon, A.P., 2003. Feedback control of mammalian Hedgehog signaling by the Hedgehog-binding protein, Hip1, modulates Fgf signaling during branching morphogenesis of the lung. *Genes Dev*, 17(3): 342-7.
- Chuang, P.T. and McMahon, A.P., 1999. Vertebrate Hedgehog signalling modulated by induction of a Hedgehog-binding protein. *Nature*, 397(6720): 617-21.
- Chung, U.I., Schipani, E., McMahon, A.P. and Kronenberg, H.M., 2001. Indian hedgehog couples chondrogenesis to osteogenesis in endochondral bone development. *J Clin Invest*, 107(3): 295-304.
- Cicha, I. et al., 2011. Resveratrol inhibits monocytic cell chemotaxis to MCP-1 and prevents spontaneous endothelial cell migration through Rho kinase-dependent mechanism. *J Atheroscler Thromb*, 18(12): 1031-42.
- Claxton, S. and Fruttiger, M., 2005. Oxygen modifies artery differentiation and network morphogenesis in the retinal vasculature. *Dev Dyn*, 233(3): 822-8.
- Claxton, S. et al., 2008. Efficient, inducible Cre-recombinase activation in vascular endothelium. *Genesis*, 46(2): 74-80.
- Cobourne, M.T., Miletich, I. and Sharpe, P.T., 2004. Restriction of sonic hedgehog signalling during early tooth development. *Development*, 131(12): 2875-85.
- Colnot, C. et al., 2005. Indian hedgehog synchronizes skeletal angiogenesis and perichondrial maturation with cartilage development. *Development*, 132(5): 1057-67.
- Cooper, M.K., Porter, J.A., Young, K.E. and Beachy, P.A., 1998. Teratogen-mediated inhibition of target tissue response to Shh signaling. *Science*, 280(5369): 1603-7.
- Cooper, M.K. et al., 2003. A defective response to Hedgehog signaling in disorders of cholesterol biosynthesis. *Nat Genet*, 33(4): 508-13.
- Dagnell, C. et al., 2007. Effects of neurotrophins on human bronchial smooth muscle cell migration and matrix metalloproteinase-9 secretion. *Transl Res*, 150(5): 303-10.
- Davey, M.G. et al., 2006. The chicken *talpid3* gene encodes a novel protein essential for Hedgehog signaling. *Genes Dev*, 20(10): 1365-77.
- Davis, G.E. and Senger, D.R., 2008. Extracellular matrix mediates a molecular balance between vascular morphogenesis and regression. *Curr Opin Hematol*, 15(3): 197-203.
- Day, R.M. et al., 2006. Serotonin induces pulmonary artery smooth muscle cell migration. *Biochem Pharmacol*, 71(3): 386-97.
- Dey, J. et al., 2012. Distinct *Smoothed* mutation causes severe cerebellar developmental defects and medulloblastoma in a novel transgenic mouse model. *Mol Cell Biol*.
- Dhar, K. et al., 2010. Tumor cell-derived PDGF-B potentiates mouse mesenchymal stem cells-pericytes transition and recruitment through an interaction with NRP-1. *Mol Cancer*, 9: 209.
- Diaz-Flores, L. et al., 2009. Pericytes. Morphofunction, interactions and pathology in a quiescent and activated mesenchymal cell niche. *Histol Histopathol*, 24(7): 909-69.
- Dickson, M.C. et al., 1995. Defective haematopoiesis and vasculogenesis in transforming growth factor-beta 1 knock out mice. *Development*, 121(6): 1845-54.
- Doanes, A.M., Irani, K., Goldschmidt-Clermont, P.J. and Finkel, T., 1998. A requirement for *rac1* in the PDGF-stimulated migration of fibroblasts and vascular smooth cells. *Biochem Mol Biol Int*, 45(2): 279-87.
- Dohle, E. et al., 2011. Comparative study assessing effects of sonic hedgehog and VEGF in a human co-culture model for bone vascularisation strategies. *Eur Cell Mater*, 21: 144-56.
- Domenga, V. et al., 2004. *Notch3* is required for arterial identity and maturation of vascular smooth muscle cells. *Genes Dev*, 18(22): 2730-5.



- Du, R. et al., 2008. HIF1 $\alpha$  induces the recruitment of bone marrow-derived vascular modulatory cells to regulate tumor angiogenesis and invasion. *Cancer Cell*, 13(3): 206-20.
- Duan, C., 2003. The chemotactic and mitogenic responses of vascular smooth muscle cells to insulin-like growth factor-I require the activation of ERK1/2. *Mol Cell Endocrinol*, 206(1-2): 75-83.
- Dumont, D.J. et al., 1994. Dominant-negative and targeted null mutations in the endothelial receptor tyrosine kinase, tek, reveal a critical role in vasculogenesis of the embryo. *Genes Dev*, 8(16): 1897-909.
- Dunaeva, M., Voo, S., van Oosterhoud, C. and Waltenberger, J., 2010. Sonic hedgehog is a potent chemoattractant for human monocytes: diabetes mellitus inhibits Sonic hedgehog-induced monocyte chemotaxis. *Basic Res Cardiol*, 105(1): 61-71.
- Dvorak, H.F., 2002. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. *J Clin Oncol*, 20(21): 4368-80.
- Dyer, M.A., Farrington, S.M., Mohn, D., Munday, J.R. and Baron, M.H., 2001. Indian hedgehog activates hematopoiesis and vasculogenesis and can respecify prospective neurectodermal cell fate in the mouse embryo. *Development*, 128(10): 1717-30.
- Eggenchwiler, J.T., Espinoza, E. and Anderson, K.V., 2001. Rab23 is an essential negative regulator of the mouse Sonic hedgehog signalling pathway. *Nature*, 412(6843): 194-8.
- Elenius, K., Paul, S., Allison, G., Sun, J. and Klagsbrun, M., 1997. Activation of HER4 by heparin-binding EGF-like growth factor stimulates chemotaxis but not proliferation. *Embo J*, 16(6): 1268-78.
- Enge, M. et al., 2002. Endothelium-specific platelet-derived growth factor-B ablation mimics diabetic retinopathy. *Embo J*, 21(16): 4307-16.
- Fabian, S.L. et al., 2012. Hedgehog-Gli pathway activation during kidney fibrosis. *Am J Pathol*, 180(4): 1441-53.
- Fan, L. et al., 2004. Hedgehog signaling promotes prostate xenograft tumor growth. *Endocrinology*, 145(8): 3961-70.
- Fan, Y. et al., 2008. Overexpression of netrin-1 induces neovascularization in the adult mouse brain. *J Cereb Blood Flow Metab*, 28(9): 1543-51.
- Farrington, S.M., Belaousoff, M. and Baron, M.H., 1997. Winged-helix, Hedgehog and Bmp genes are differentially expressed in distinct cell layers of the murine yolk sac. *Mech Dev*, 62(2): 197-211.
- Filmus, J., Capurro, M. and Rast, J., 2008. Glypicans. *Genome Biol*, 9(5): 224.
- Fougerat, A. et al., 2012. Key role of PI3K $\gamma$  in monocyte chemotactic protein-1-mediated amplification of PDGF-induced aortic smooth muscle cell migration. *Br J Pharmacol*, 166(5): 1643-53.
- Fraleigh, S.I. et al., 2010. A distinctive role for focal adhesion proteins in three-dimensional cell motility. *Nat Cell Biol*, 12(6): 598-604.
- Freitas-Andrade, M., Carmeliet, P., Charlebois, C., Stanimirovic, D.B. and Moreno, M.J., 2012. PlGF knockout delays brain vessel growth and maturation upon systemic hypoxic challenge. *J Cereb Blood Flow Metab*, 32(4): 663-75.
- French, W.J., Creemers, E.E. and Tallquist, M.D., 2008. Platelet-derived growth factor receptors direct vascular development independent of vascular smooth muscle cell function. *Mol Cell Biol*, 28(18): 5646-57.
- Frid, M.G., Kale, V.A. and Stenmark, K.R., 2002. Mature vascular endothelium can give rise to smooth muscle cells via endothelial-mesenchymal transdifferentiation: in vitro analysis. *Circ Res*, 90(11): 1189-96.

- Frontini, M.J. et al., 2011. Fibroblast growth factor 9 delivery during angiogenesis produces durable, vasoresponsive microvessels wrapped by smooth muscle cells. *Nat Biotechnol*, 29(5): 421-7.
- Fruttiger, M., 2002. Development of the mouse retinal vasculature: angiogenesis versus vasculogenesis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 43(2): 522-7.
- Gao, J. and Aifantis, I., 2009. Hedgehog and hematopoietic stem cell differentiation: don't believe the hype! *Cell Cycle*, 8(23): 3789-90.
- Garcia, J.G. et al., 2001. Sphingosine 1-phosphate promotes endothelial cell barrier integrity by Edg-dependent cytoskeletal rearrangement. *J Clin Invest*, 108(5): 689-701.
- Geng, L. et al., 2007. Hedgehog signaling in the murine melanoma microenvironment. *Angiogenesis*, 10(4): 259-67.
- Gerhardt, H. et al., 2003. VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *J Cell Biol*, 161(6): 1163-77.
- Gerhardt, H., Wolburg, H. and Redies, C., 2000. N-cadherin mediates pericytic-endothelial interaction during brain angiogenesis in the chicken. *Dev Dyn*, 218(3): 472-9.
- Gerthoffer, W.T., 2007. Mechanisms of vascular smooth muscle cell migration. *Circ Res*, 100(5): 607-21.
- Geudens, I. and Gerhardt, H., 2011. Coordinating cell behaviour during blood vessel formation. *Development*, 138(21): 4569-83.
- Goldman, J., Zhong, L. and Liu, S.Q., 2007. Negative regulation of vascular smooth muscle cell migration by blood shear stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 292(2): H928-38.
- Golovchenko, I., Yang, C.H., Goalstone, M.L. and Draznin, B., 2003. Garlic extract methylallyl thiosulfinate blocks insulin potentiation of platelet-derived growth factor-stimulated migration of vascular smooth muscle cells. *Metabolism*, 52(2): 254-9.
- Gorovoy, M. et al., 2005. LIM kinase 1 coordinates microtubule stability and actin polymerization in human endothelial cells. *J Biol Chem*, 280(28): 26533-42.
- Goumans, M.J., Liu, Z. and ten Dijke, P., 2009. TGF-beta signaling in vascular biology and dysfunction. *Cell Res*, 19(1): 116-27.
- Goumans, M.J. et al., 2002. Balancing the activation state of the endothelium via two distinct TGF-beta type I receptors. *Embo J*, 21(7): 1743-53.
- Greco, C.M. et al., 2012. Chemotactic effect of prorenin on human aortic smooth muscle cells: a novel function of the (pro)renin receptor. *Cardiovasc Res*, 95(3): 366-74.
- Greenberg, J.I. et al., 2008. A role for VEGF as a negative regulator of pericyte function and vessel maturation. *Nature*, 456(7223): 809-13.
- Grzeszkiewicz, T.M., Lindner, V., Chen, N., Lam, S.C. and Lau, L.F., 2002. The angiogenic factor cysteine-rich 61 (CYR61, CCN1) supports vascular smooth muscle cell adhesion and stimulates chemotaxis through integrin alpha(6)beta(1) and cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Endocrinology*, 143(4): 1441-50.
- Gustafsson, M.K. et al., 2002. Myf5 is a direct target of long-range Shh signaling and Gli regulation for muscle specification. *Genes Dev*, 16(1): 114-26.
- Hahn, H. et al., 1996. Mutations of the human homolog of Drosophila patched in the nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Cell*, 85(6): 841-51.
- Hall-Glenn, F. et al., 2012. CCN2/connective tissue growth factor is essential for pericyte adhesion and endothelial basement membrane formation during angiogenesis. *PLoS One*, 7(2): e30562.
- Hammond, R., Blaess, S. and Abeliovich, A., 2009. Sonic hedgehog is a chemoattractant for midbrain dopaminergic axons. *PLoS One*, 4(9): e7007.

- Hannigan, M. et al., 2002. Neutrophils lacking phosphoinositide 3-kinase gamma show loss of directionality during N-formyl-Met-Leu-Phe-induced chemotaxis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(6): 3603-8.
- Harris, L.G., Pannell, L.K., Singh, S., Samant, R.S. and Shevde, L.A., 2012. Increased vascularity and spontaneous metastasis of breast cancer by hedgehog signaling mediated upregulation of *cyr61*. *Oncogene*.
- Harvey, K.A., Welch, Z., Sliva, D. and Siddiqui, R.A., 2010. Role of Rho kinase in sphingosine 1-phosphate-mediated endothelial and smooth muscle cell migration and differentiation. *Mol Cell Biochem*, 342(1-2): 7-19.
- Hasan, A.M., Mourtada-Maarabouni, M., Hameed, M.S., Williams, G.T. and Dent, G., 2010. Phosphoinositide 3-kinase gamma mediates chemotactic responses of human eosinophils to platelet-activating factor. *Int Immunopharmacol*, 10(9): 1017-21.
- He, M., Xue, Z.M., Li, J. and Zhou, B.Q., 2012. Brevescapine inhibits high glucose-induced proliferation and migration of cultured vascular smooth muscle cells of rats via suppressing the ERK1/2 MAPK signaling pathway. *Acta Pharmacol Sin*, 33(5): 606-14.
- Hedges, J.C. et al., 1999. A role for p38(MAPK)/HSP27 pathway in smooth muscle cell migration. *J Biol Chem*, 274(34): 24211-9.
- Hedges, J.C., Singer, C.A. and Gerthoffer, W.T., 2000. Mitogen-activated protein kinases regulate cytokine gene expression in human airway myocytes. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 23(1): 86-94.
- Hedlund, E.M., Hosaka, K., Zhong, Z., Cao, R. and Cao, Y., 2009. Malignant cell-derived PIGF promotes normalization and remodeling of the tumor vasculature. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(41): 17505-10.
- Hellstrom, M. et al., 2001. Lack of pericytes leads to endothelial hyperplasia and abnormal vascular morphogenesis. *J Cell Biol*, 153(3): 543-53.
- Hellstrom, M., Kalen, M., Lindahl, P., Abramsson, A. and Betsholtz, C., 1999. Role of PDGF-B and PDGFR-beta in recruitment of vascular smooth muscle cells and pericytes during embryonic blood vessel formation in the mouse. *Development*, 126(14): 3047-55.
- Hirschi, K.K., Burt, J.M., Hirschi, K.D. and Dai, C., 2003. Gap junction communication mediates transforming growth factor-beta activation and endothelial-induced mural cell differentiation. *Circ Res*, 93(5): 429-37.
- Hirschi, K.K., Rohovsky, S.A., Beck, L.H., Smith, S.R. and D'Amore, P.A., 1999. Endothelial cells modulate the proliferation of mural cell precursors via platelet-derived growth factor-BB and heterotypic cell contact. *Circ Res*, 84(3): 298-305.
- Hirschi, K.K., Rohovsky, S.A. and D'Amore, P.A., 1998. PDGF, TGF-beta, and heterotypic cell-cell interactions mediate endothelial cell-induced recruitment of 10T1/2 cells and their differentiation to a smooth muscle fate. *J Cell Biol*, 141(3): 805-14.
- Ho, B. and Bendeck, M.P., 2009. Integrin linked kinase (ILK) expression and function in vascular smooth muscle cells. *Cell Adh Migr*, 3(2): 174-6.
- Hoch, R.V. and Soriano, P., 2003. Roles of PDGF in animal development. *Development*, 130(20): 4769-84.
- Horn, A. et al., 2012. Inhibition of hedgehog signalling prevents experimental fibrosis and induces regression of established fibrosis. *Ann Rheum Dis*, 71(5): 785-9.
- Hu, B. and Cheng, S.Y., 2009. Angiopoietin-2: development of inhibitors for cancer therapy. *Curr Oncol Rep*, 11(2): 111-6.
- Hwang, J.M. et al., 2008. Hypoxia-induced compensatory effect as related to Shh and HIF-1alpha in ischemia embryo rat heart. *Mol Cell Biochem*, 311(1-2): 179-87.

- Hynes, M. et al., 2000. The seven-transmembrane receptor smoothed cell-autonomously induces multiple ventral cell types. *Nat Neurosci*, 3(1): 41-6.
- Iivanainen, E. et al., 2003. Angiopoietin-regulated recruitment of vascular smooth muscle cells by endothelial-derived heparin binding EGF-like growth factor. *Faseb J*, 17(12): 1609-21.
- Iruela-Arispe, M.L. and Davis, G.E., 2009. Cellular and molecular mechanisms of vascular lumen formation. *Dev Cell*, 16(2): 222-31.
- Ishida, A. et al., 2001. Expression of vascular endothelial growth factor receptors in smooth muscle cells. *J Cell Physiol*, 188(3): 359-68.
- Issa, R. et al., 2006. GRO-alpha regulation in airway smooth muscle by IL-1beta and TNF-alpha: role of NF-kappaB and MAP kinases. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 291(1): L66-74.
- Izzi, L. et al., 2011. Boc and Gas1 each form distinct Shh receptor complexes with Ptch1 and are required for Shh-mediated cell proliferation. *Dev Cell*, 20(6): 788-801.
- Jaber, N. et al., 2012. Class III PI3K Vps34 plays an essential role in autophagy and in heart and liver function. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(6): 2003-8.
- Jalvy, S. et al., 2007a. CREB mediates UTP-directed arterial smooth muscle cell migration and expression of the chemotactic protein osteopontin via its interaction with activator protein-1 sites. *Circ Res*, 100(9): 1292-9.
- Jalvy, S. et al., 2007b. Autocrine expression of osteopontin contributes to PDGF-mediated arterial smooth muscle cell migration. *Cardiovasc Res*, 75(4): 738-47.
- Jenkins, D., 2009. Hedgehog signalling: emerging evidence for non-canonical pathways. *Cell Signal*, 21(7): 1023-34.
- Jeong, J. and McMahon, A.P., 2005. Growth and pattern of the mammalian neural tube are governed by partially overlapping feedback activities of the hedgehog antagonists patched 1 and Hhip1. *Development*, 132(1): 143-54.
- Ji, H. et al., 2011. Inhibition of sonic hedgehog signaling aggravates brain damage associated with the down-regulation of Gli1, Ptch1 and SOD1 expression in acute ischemic stroke. *Neurosci Lett*, 506(1): 1-6.
- Jin, S. et al., 2008. Notch signaling regulates platelet-derived growth factor receptor-beta expression in vascular smooth muscle cells. *Circ Res*, 102(12): 1483-91.
- Johnson, J.L., Dwivedi, A., Somerville, M., George, S.J. and Newby, A.C., 2011a. Matrix metalloproteinase (MMP)-3 activates MMP-9 mediated vascular smooth muscle cell migration and neointima formation in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 31(9): e35-44.
- Johnson, R.W. et al., 2011b. TGF-beta promotion of Gli2-induced expression of parathyroid hormone-related protein, an important osteolytic factor in bone metastasis, is independent of canonical Hedgehog signaling. *Cancer Res*, 71(3): 822-31.
- Jones, G.E. et al., 2003. Requirement for PI 3-kinase gamma in macrophage migration to MCP-1 and CSF-1. *Exp Cell Res*, 290(1): 120-31.
- Jones, N. et al., 2001. Rescue of the early vascular defects in Tek/Tie2 null mice reveals an essential survival function. *EMBO Rep*, 2(5): 438-45.
- Kalyankrishna, S. and Malik, K.U., 2003. Norepinephrine-induced stimulation of p38 mitogen-activated protein kinase is mediated by arachidonic acid metabolites generated by activation of cytosolic phospholipase A(2) in vascular smooth muscle cells. *J Pharmacol Exp Ther*, 304(2): 761-72.
- Kanda, S. et al., 2003. Sonic hedgehog induces capillary morphogenesis by endothelial cells through phosphoinositide 3-kinase. *J Biol Chem*, 278(10): 8244-9.

- Kano, M.R. et al., 2005. VEGF-A and FGF-2 synergistically promote neoangiogenesis through enhancement of endogenous PDGF-B-PDGFRbeta signaling. *J Cell Sci*, 118(Pt 16): 3759-68.
- Karhadkar, S.S. et al., 2004. Hedgehog signalling in prostate regeneration, neoplasia and metastasis. *Nature*, 431(7009): 707-12.
- Kasper, M., Regl, G., Frischauf, A.M. and Aberger, F., 2006. GLI transcription factors: mediators of oncogenic Hedgehog signalling. *Eur J Cancer*, 42(4): 437-45.
- Kasperczyk, H., Baumann, B., Debatin, K.M. and Fulda, S., 2009. Characterization of sonic hedgehog as a novel NF-kappaB target gene that promotes NF-kappaB-mediated apoptosis resistance and tumor growth in vivo. *Faseb J*, 23(1): 21-33.
- Kaur, D. et al., 2006. Airway smooth muscle and mast cell-derived CC chemokine ligand 19 mediate airway smooth muscle migration in asthma. *Am J Respir Crit Care Med*, 174(11): 1179-88.
- Kawai, S. and Sugiura, T., 2001. Characterization of human bone morphogenetic protein (BMP)-4 and -7 gene promoters: activation of BMP promoters by Gli, a sonic hedgehog mediator. *Bone*, 29(1): 54-61.
- Kawanami, D. et al., 2011. Thrombin induces MCP-1 expression through Rho-kinase and subsequent p38MAPK/NF-kappaB signaling pathway activation in vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 411(4): 798-803.
- Kher, N. and Marsh, J.D., 2004. Pathobiology of atherosclerosis--a brief review. *Semin Thromb Hemost*, 30(6): 665-72.
- Kim, I.T., Park, H.Y., Choi, J.S. and Joo, C.K., 2012. Anti-angiogenic effect of KR-31831 on corneal and choroidal neovascularization in rat models. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 53(6): 3111-9.
- Kinzler, K.W. et al., 1987. Identification of an amplified, highly expressed gene in a human glioma. *Science*, 236(4797): 70-3.
- Kobune, M. et al., 2004. Indian hedgehog gene transfer augments hematopoietic support of human stromal cells including NOD/SCID-beta2m-/- repopulating cells. *Blood*, 104(4): 1002-9.
- Kohno, M. et al., 1998. Effect of the endothelin family of peptides on human coronary artery smooth-muscle cell migration. *J Cardiovasc Pharmacol*, 31 Suppl 1: S84-9.
- Kolesova, H., Roelink, H. and Grim, M., 2008. Sonic hedgehog is required for the assembly and remodeling of branchial arch blood vessels. *Dev Dyn*, 237(7): 1923-34.
- Kono, M. et al., 2004. The sphingosine-1-phosphate receptors S1P1, S1P2, and S1P3 function coordinately during embryonic angiogenesis. *J Biol Chem*, 279(28): 29367-73.
- Koyama, N., Koshikawa, T., Morisaki, N., Saito, Y. and Yoshida, S., 1990. Bifunctional effects of transforming growth factor-beta on migration of cultured rat aortic smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 169(2): 725-9.
- Koyama, N., Morisaki, N., Saito, Y. and Yoshida, S., 1992. Regulatory effects of platelet-derived growth factor-AA homodimer on migration of vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*, 267(32): 22806-12.
- Kraemer, R., Nguyen, H., March, K.L. and Hempstead, B., 1999. NGF activates similar intracellular signaling pathways in vascular smooth muscle cells as PDGF-BB but elicits different biological responses. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 19(4): 1041-50.
- Krenning, G., Moonen, J.R., van Luyn, M.J. and Harmsen, M.C., 2008. Vascular smooth muscle cells for use in vascular tissue engineering obtained by endothelial-to-mesenchymal transdifferentiation (EnMT) on collagen matrices. *Biomaterials*, 29(27): 3703-11.
- Kubo, M. et al., 2004. Hedgehog signaling pathway is a new therapeutic target for patients with breast cancer. *Cancer Res*, 64(17): 6071-4.

- Kumon, Y. et al., 2002. Acute-phase, but not constitutive serum amyloid A (SAA) is chemotactic for cultured human aortic smooth muscle cells. *Amyloid*, 9(4): 237-41.
- Kusano, K.F. et al., 2004. Sonic hedgehog induces arteriogenesis in diabetic vasa nervorum and restores function in diabetic neuropathy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 24(11): 2102-7.
- Kusano, K.F. et al., 2005. Sonic hedgehog myocardial gene therapy: tissue repair through transient reconstitution of embryonic signaling. *Nat Med*, 11(11): 1197-204.
- Kuzmanov, A., Wielockx, B., Rezaei, M., Kettelhake, A. and Breier, G., 2011. Overexpression of factor inhibiting HIF-1 enhances vessel maturation and tumor growth via platelet-derived growth factor-C. *Int J Cancer*.
- Lai, L., Bohnsack, B.L., Niederreither, K. and Hirschi, K.K., 2003. Retinoic acid regulates endothelial cell proliferation during vasculogenesis. *Development*, 130(26): 6465-74.
- Lamont, R.E. et al., 2010. Hedgehog signaling via angiopoietin1 is required for developmental vascular stability. *Mech Dev*, 127(3-4): 159-68.
- Lauth, M., Bergstrom, A., Shimokawa, T. and Toftgard, R., 2007. Inhibition of GLI-mediated transcription and tumor cell growth by small-molecule antagonists. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(20): 8455-60.
- Lavine, K.J., Kovacs, A. and Ornitz, D.M., 2008a. Hedgehog signaling is critical for maintenance of the adult coronary vasculature in mice. *J Clin Invest*, 118(7): 2404-14.
- Lavine, K.J., Long, F., Choi, K., Smith, C. and Ornitz, D.M., 2008b. Hedgehog signaling to distinct cell types differentially regulates coronary artery and vein development. *Development*, 135(18): 3161-71.
- Lavine, K.J. et al., 2006. Fibroblast growth factor signals regulate a wave of Hedgehog activation that is essential for coronary vascular development. *Genes Dev*, 20(12): 1651-66.
- Lawson, N.D., Vogel, A.M. and Weinstein, B.M., 2002. sonic hedgehog and vascular endothelial growth factor act upstream of the Notch pathway during arterial endothelial differentiation. *Dev Cell*, 3(1): 127-36.
- Lee, C.S., Buttitta, L. and Fan, C.M., 2001. Evidence that the WNT-inducible growth arrest-specific gene 1 encodes an antagonist of sonic hedgehog signaling in the somite. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(20): 11347-52.
- Lee, P.C., Ho, I.C. and Lee, T.C., 2005. Oxidative stress mediates sodium arsenite-induced expression of heme oxygenase-1, monocyte chemoattractant protein-1, and interleukin-6 in vascular smooth muscle cells. *Toxicol Sci*, 85(1): 541-50.
- Li, C., Wernig, F., Leitges, M., Hu, Y. and Xu, Q., 2003. Mechanical stress-activated PKCdelta regulates smooth muscle cell migration. *Faseb J*, 17(14): 2106-8.
- Li, D.Y. et al., 1999. Defective angiogenesis in mice lacking endoglin. *Science*, 284(5419): 1534-7.
- Li, F. et al., 2010a. Sonic hedgehog signaling induces vascular smooth muscle cell proliferation via induction of the G1 cyclin-retinoblastoma axis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 30(9): 1787-94.
- Li, F., Shi, W., Capurro, M. and Filmus, J., 2011. Glypican-5 stimulates rhabdomyosarcoma cell proliferation by activating Hedgehog signaling. *J Cell Biol*, 192(4): 691-704.
- Li, F.H. et al., 2010b. [The expression of sonic hedgehog in rat vein grafts]. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi*, 48(7): 539-42.
- Li, J.J., Han, M., Wen, J.K. and Li, A.Y., 2007. Osteopontin stimulates vascular smooth muscle cell migration by inducing FAK phosphorylation and ILK dephosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun*, 356(1): 13-9.
- Li, V.W. and Li, W.W., 2008. Antiangiogenesis in the treatment of skin cancer. *J Drugs Dermatol*, 7(1 Suppl 1): s17-24.

- Lindblom, P. et al., 2003. Endothelial PDGF-B retention is required for proper investment of pericytes in the microvessel wall. *Genes Dev*, 17(15): 1835-40.
- Liu, H., Zhang, W., Kennard, S., Caldwell, R.B. and Lilly, B., 2010. Notch3 is critical for proper angiogenesis and mural cell investment. *Circ Res*, 107(7): 860-70.
- Liu, Y. et al., 2000. Edg-1, the G protein-coupled receptor for sphingosine-1-phosphate, is essential for vascular maturation. *J Clin Invest*, 106(8): 951-61.
- Low, J.A. and de Sauvage, F.J., 2010. Clinical experience with Hedgehog pathway inhibitors. *J Clin Oncol*, 28(36): 5321-6.
- Lu, J.T., Zhao, W.D., He, W. and Wei, W., 2012. Hedgehog signaling pathway mediates invasion and metastasis of hepatocellular carcinoma via ERK pathway. *Acta Pharmacol Sin*, 33(5): 691-700.
- Lum, L. et al., 2003. Identification of Hedgehog pathway components by RNAi in *Drosophila* cultured cells. *Science*, 299(5615): 2039-45.
- Lyle, A.N. et al., 2012. Reactive oxygen species regulate osteopontin expression in a murine model of postischemic neovascularization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 32(6): 1383-91.
- Maier, D., Cheng, S. and Hipfner, D., 2012. The complexities of G-protein-coupled receptor kinase function in Hedgehog signaling. *Fly (Austin)*, 6(3).
- Mancuso, P. et al., 2011. Circulating perivascular progenitors: a target of PDGFR inhibition. *Int J Cancer*, 129(6): 1344-50.
- Martinez, M.C. et al., 2006. Transfer of differentiation signal by membrane microvesicles harboring hedgehog morphogens. *Blood*, 108(9): 3012-20.
- Mathiisen, T.M., Lehre, K.P., Danbolt, N.C. and Ottersen, O.P., 2010. The perivascular astroglial sheath provides a complete covering of the brain microvessels: an electron microscopic 3D reconstruction. *Glia*, 58(9): 1094-103.
- McVerry, B.J. and Garcia, J.G., 2005. In vitro and in vivo modulation of vascular barrier integrity by sphingosine 1-phosphate: mechanistic insights. *Cell Signal*, 17(2): 131-9.
- Meoli, D.F. and White, R.J., 2011. Endothelin-1 induces pulmonary but not aortic smooth muscle cell migration by activating ERK1/2 MAP kinase. *Can J Physiol Pharmacol*, 88(8): 830-9.
- Merchan, P. et al., 2007. Sonic hedgehog promotes the migration and proliferation of optic nerve oligodendrocyte precursors. *Mol Cell Neurosci*, 36(3): 355-68.
- Mercier, S. et al., 2010. Genetic counseling and "molecular" prenatal diagnosis of holoprosencephaly (HPE). *Am J Med Genet C Semin Med Genet*, 154C(1): 191-6.
- Mill, P. et al., 2005. Shh controls epithelial proliferation via independent pathways that converge on N-Myc. *Dev Cell*, 9(2): 293-303.
- Mirsky, R. et al., 2002. Schwann cells as regulators of nerve development. *J Physiol Paris*, 96(1-2): 17-24.
- Mirsky, R., Parmantier, E., McMahon, A.P. and Jessen, K.R., 1999. Schwann cell-derived desert hedgehog signals nerve sheath formation. *Ann N Y Acad Sci*, 883: 196-202.
- Mitchell, T.S., Bradley, J., Robinson, G.S., Shima, D.T. and Ng, Y.S., 2008. RGS5 expression is a quantitative measure of pericyte coverage of blood vessels. *Angiogenesis*, 11(2): 141-51.
- Mitra, S.K., Hanson, D.A. and Schlaepfer, D.D., 2005. Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6(1): 56-68.
- Miyazawa, N. et al., 1998. Role of histamine H1 and H2 receptor antagonists in the prevention of intimal thickening. *Eur J Pharmacol*, 362(1): 53-9.
- Mohan, R.R. et al., 2011. Targeted decorin gene therapy delivered with adeno-associated virus effectively retards corneal neovascularization in vivo. *PLoS One*, 6(10): e26432.

- Morrow, D. et al., 2009. Sonic Hedgehog induces Notch target gene expression in vascular smooth muscle cells via VEGF-A. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 29(7): 1112-8.
- Moura, R., Tjwa, M., Vandervoort, P., Cludts, K. and Hoylaerts, M.F., 2007. Thrombospondin-1 activates medial smooth muscle cells and triggers neointima formation upon mouse carotid artery ligation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 27(10): 2163-9.
- Murga, C., Fukuhara, S. and Gutkind, J.S., 2000. A novel role for phosphatidylinositol 3-kinase beta in signaling from G protein-coupled receptors to Akt. *J Biol Chem*, 275(16): 12069-73.
- Nagase, T., Nagase, M., Machida, M. and Fujita, T., 2008. Hedgehog signalling in vascular development. *Angiogenesis*, 11(1): 71-7.
- Nagase, T., Nagase, M., Machida, M. and Yamagishi, M., 2007. Hedgehog signaling: a biophysical or biomechanical modulator in embryonic development? *Ann N Y Acad Sci*, 1101: 412-38.
- Nakagawa, S. et al., 2009. A new blood-brain barrier model using primary rat brain endothelial cells, pericytes and astrocytes. *Neurochem Int*, 54(3-4): 253-63.
- Nakamura, K. et al., 2010. Hedgehog promotes neovascularization in pancreatic cancers by regulating Ang-1 and IGF-1 expression in bone-marrow derived pro-angiogenic cells. *PLoS One*, 5(1): e8824.
- Nanba, D. et al., 2006. Loss of HB-EGF in smooth muscle or endothelial cell lineages causes heart malformation. *Biochem Biophys Res Commun*, 350(2): 315-21.
- Nelson, P.R., Yamamura, S. and Kent, K.C., 1996. Extracellular matrix proteins are potent agonists of human smooth muscle cell migration. *J Vasc Surg*, 24(1): 25-32; discussion 32-3.
- Nelson, P.R., Yamamura, S. and Kent, K.C., 1997. Platelet-derived growth factor and extracellular matrix proteins provide a synergistic stimulus for human vascular smooth muscle cell migration. *J Vasc Surg*, 26(1): 104-12.
- Nielsen, C.M. and Dymecki, S.M., 2010. Sonic hedgehog is required for vascular outgrowth in the hindbrain choroid plexus. *Dev Biol*, 340(2): 430-7.
- Noda-Heiny, H. and Sobel, B.E., 1995. Vascular smooth muscle cell migration mediated by thrombin and urokinase receptor. *Am J Physiol*, 268(5 Pt 1): C1195-201.
- Nusslein-Volhard, C. and Wieschaus, E., 1980. Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature*, 287(5785): 795-801.
- Oh, S.P. et al., 2000. Activin receptor-like kinase 1 modulates transforming growth factor-beta 1 signaling in the regulation of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(6): 2626-31.
- Okada, A. et al., 2006. Boc is a receptor for sonic hedgehog in the guidance of commissural axons. *Nature*, 444(7117): 369-73.
- Olsen, C.L., Hsu, P.P., Glienke, J., Rubanyi, G.M. and Brooks, A.R., 2004. Hedgehog-interacting protein is highly expressed in endothelial cells but down-regulated during angiogenesis and in several human tumors. *BMC Cancer*, 4: 43.
- Palladino, M. et al., 2011. Pleiotropic beneficial effects of sonic hedgehog gene therapy in an experimental model of peripheral limb ischemia. *Mol Ther*, 19(4): 658-66.
- Pan, P. et al., 2010. Angiotensin II upregulates the expression of placental growth factor in human vascular endothelial cells and smooth muscle cells. *BMC Cell Biol*, 11: 36.
- Parameswaran, K. et al., 2007. Modulation of human airway smooth muscle migration by lipid mediators and Th-2 cytokines. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 37(2): 240-7.
- Passman, J.N. et al., 2008. A sonic hedgehog signaling domain in the arterial adventitia supports resident Sca1+ smooth muscle progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(27): 9349-54.



- Patan, S., 1998. TIE1 and TIE2 receptor tyrosine kinases inversely regulate embryonic angiogenesis by the mechanism of intussusceptive microvascular growth. *Microvasc Res*, 56(1): 1-21.
- Pathi, S. et al., 2001. Comparative biological responses to human Sonic, Indian, and Desert hedgehog. *Mech Dev*, 106(1-2): 107-17.
- Peebo, B.B., Fagerholm, P., Traneus-Rockert, C. and Lagali, N., 2011. Cellular level characterization of capillary regression in inflammatory angiogenesis using an in vivo corneal model. *Angiogenesis*, 14(3): 393-405.
- Pellet-Many, C. et al., 2011. Neuropilin-1 mediates PDGF stimulation of vascular smooth muscle cell migration and signalling via p130Cas. *Biochem J*, 435(3): 609-18.
- Pepicelli, C.V., Lewis, P.M. and McMahon, A.P., 1998. Sonic hedgehog regulates branching morphogenesis in the mammalian lung. *Curr Biol*, 8(19): 1083-6.
- Petrova, T.V. et al., 2004. Defective valves and abnormal mural cell recruitment underlie lymphatic vascular failure in lymphedema distichiasis. *Nat Med*, 10(9): 974-81.
- Peyton, S.R. and Putnam, A.J., 2005. Extracellular matrix rigidity governs smooth muscle cell motility in a biphasic fashion. *J Cell Physiol*, 204(1): 198-209.
- Pfaendtner, J., De La Cruz, E.M. and Voth, G.A., 2010. Actin filament remodeling by actin depolymerization factor/cofilin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(16): 7299-304.
- Pineda-Alvarez, D.E. et al., 2012. Missense substitutions in the GAS1 protein present in holoprosencephaly patients reduce the affinity for its ligand, SHH. *Hum Genet*, 131(2): 301-10.
- Pintucci, G. et al., 2005. PDGF-BB induces vascular smooth muscle cell expression of high molecular weight FGF-2, which accumulates in the nucleus. *J Cell Biochem*, 95(6): 1292-300.
- Pola, R. et al., 2003. Postnatal recapitulation of embryonic hedgehog pathway in response to skeletal muscle ischemia. *Circulation*, 108(4): 479-85.
- Pola, R. et al., 2001. The morphogen Sonic hedgehog is an indirect angiogenic agent upregulating two families of angiogenic growth factors. *Nat Med*, 7(6): 706-11.
- Polizio, A.H. et al., 2011. Heterotrimeric Gi proteins link Hedgehog signaling to activation of Rho small GTPases to promote fibroblast migration. *J Biol Chem*, 286(22): 19589-96.
- Porter, J.A., Young, K.E. and Beachy, P.A., 1996. Cholesterol modification of hedgehog signaling proteins in animal development. *Science*, 274(5285): 255-9.
- Puri, M.C., Partanen, J., Rossant, J. and Bernstein, A., 1999. Interaction of the TEK and TIE receptor tyrosine kinases during cardiovascular development. *Development*, 126(20): 4569-80.
- Rabkin, S.W., 2009. The role of interleukin 18 in the pathogenesis of hypertension-induced vascular disease. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*, 6(3): 192-9.
- Ramalho-Santos, M., Melton, D.A. and McMahon, A.P., 2000. Hedgehog signals regulate multiple aspects of gastrointestinal development. *Development*, 127(12): 2763-72.
- Raza, A., Franklin, M.J. and Dudek, A.Z., 2010. Pericytes and vessel maturation during tumor angiogenesis and metastasis. *Am J Hematol*, 85(8): 593-8.
- Renault, M.A. et al., 2010. Sonic hedgehog induces angiogenesis via Rho kinase-dependent signaling in endothelial cells. *J Mol Cell Cardiol*, 49(3): 490-8.
- Ribes, V. and Briscoe, J., 2009. Establishing and interpreting graded Sonic Hedgehog signaling during vertebrate neural tube patterning: the role of negative feedback. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 1(2): a002014.
- Rice, R., Connor, E. and Rice, D.P., 2006. Expression patterns of Hedgehog signalling pathway members during mouse palate development. *Gene Expr Patterns*, 6(2): 206-12.

- Ridley, A.J. et al., 2003. Cell migration: integrating signals from front to back. *Science*, 302(5651): 1704-9.
- Riobo, N.A., Haines, G.M. and Emerson, C.P., Jr., 2006a. Protein kinase C-delta and mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase-1 control GLI activation in hedgehog signaling. *Cancer Res*, 66(2): 839-45.
- Riobo, N.A., Lu, K., Ai, X., Haines, G.M. and Emerson, C.P., Jr., 2006b. Phosphoinositide 3-kinase and Akt are essential for Sonic Hedgehog signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(12): 4505-10.
- Ross, R., Glomset, J., Kariya, B. and Harker, L., 1974. A platelet-dependent serum factor that stimulates the proliferation of arterial smooth muscle cells in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 71(4): 1207-10.
- Rowitch, D.H. et al., 1999. Sonic hedgehog regulates proliferation and inhibits differentiation of CNS precursor cells. *J Neurosci*, 19(20): 8954-65.
- Roztocil, E., Nicholl, S.M. and Davies, M.G., 2009. Mechanisms of sphingosine-1-phosphate-induced akt-dependent smooth muscle cell migration. *Surgery*, 145(1): 34-41.
- Ruat, M., Roudaut, H., Ferent, J. and Traiffort, E., 2011. Hedgehog trafficking, cilia and brain functions. *Differentiation*.
- Rubin, L.L. and de Sauvage, F.J., 2006. Targeting the Hedgehog pathway in cancer. *Nat Rev Drug Discov*, 5(12): 1026-33.
- Rudin, C.M., 2012. Vismodegib. *Clin Cancer Res*, 18(12): 3218-22.
- Saito, H. et al., 2005. Expression of the mouse *Fgf15* gene is directly initiated by Sonic hedgehog signaling in the diencephalon and midbrain. *Dev Dyn*, 232(2): 282-92.
- Samarzija, I. and Beard, P., 2012. Hedgehog pathway regulators influence cervical cancer cell proliferation, survival and migration. *Biochem Biophys Res Commun*.
- Sanchez-Arrones, L., Cardozo, M., Nieto-Lopez, F. and Bovolenta, P., 2012. Cdon and Boc: Two transmembrane proteins implicated in cell-cell communication. *Int J Biochem Cell Biol*.
- Sanchez-Camacho, C. and Bovolenta, P., 2009. Emerging mechanisms in morphogen-mediated axon guidance. *Bioessays*, 31(10): 1013-25.
- Sanchez, P. et al., 2004. Inhibition of prostate cancer proliferation by interference with SONIC HEDGEHOG-GLI1 signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(34): 12561-6.
- Sasaki, H., Hui, C., Nakafuku, M. and Kondoh, H., 1997. A binding site for Gli proteins is essential for HNF-3beta floor plate enhancer activity in transgenics and can respond to Shh in vitro. *Development*, 124(7): 1313-22.
- Sato, Y. et al., 1991. The stimulatory effect of PDGF on vascular smooth muscle cell migration is mediated by the induction of endogenous basic FGF. *Biochem Biophys Res Commun*, 174(3): 1260-6.
- Schumacher, M.A. et al., 2012. Gastric Sonic Hedgehog acts as a macrophage chemoattractant during the immune response to *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology*, 142(5): 1150-1159 e6.
- Seki, T., Hong, K.H. and Oh, S.P., 2006. Nonoverlapping expression patterns of ALK1 and ALK5 reveal distinct roles of each receptor in vascular development. *Lab Invest*, 86(2): 116-29.
- Sekiguchi, H. et al., 2012. Estradiol triggers sonic-hedgehog-induced angiogenesis during peripheral nerve regeneration by downregulating hedgehog-interacting protein. *Lab Invest*.
- Senger, D.R. and Davis, G.E., 2011. Angiogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 3(8): a005090.

- Sharony, R. et al., 2006. Matrix metalloproteinase expression in vein grafts: role of inflammatory mediators and extracellular signal-regulated kinases-1 and -2. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 290(4): H1651-9.
- Shibata, W. et al., 2012. Stromal cell-derived factor-1 overexpression induces gastric dysplasia through expansion of stromal myofibroblasts and epithelial progenitors. *Gut*.
- Shin, K. et al., 2011. Hedgehog/Wnt feedback supports regenerative proliferation of epithelial stem cells in bladder. *Nature*, 472(7341): 110-4.
- Sicklick, J.K. et al., 2006. Dysregulation of the Hedgehog pathway in human hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis*, 27(4): 748-57.
- Siegbahn, A., Johnell, M., Nordin, A., Aberg, M. and Velling, T., 2008. TF/FVIIa transactivate PDGFRbeta to regulate PDGF-BB-induced chemotaxis in different cell types: involvement of Src and PLC. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 28(1): 135-41.
- Sivak, J.M. et al., 2011. Pharmacologic uncoupling of angiogenesis and inflammation during initiation of pathological corneal neovascularization. *J Biol Chem*, 286(52): 44965-75.
- Slepian, M.J., Massia, S.P., Dehdashti, B., Fritz, A. and Whitesell, L., 1998. Beta3-integrins rather than beta1-integrins dominate integrin-matrix interactions involved in postinjury smooth muscle cell migration. *Circulation*, 97(18): 1818-27.
- Soleti, R. et al., 2009. Microparticles harboring Sonic Hedgehog promote angiogenesis through the upregulation of adhesion proteins and proangiogenic factors. *Carcinogenesis*, 30(4): 580-8.
- Solinas, A. et al., 2012. Acylthiourea, acylurea, and acylguanidine derivatives with potent hedgehog inhibiting activity. *J Med Chem*, 55(4): 1559-71.
- Song, N. et al., 2009. Overexpression of platelet-derived growth factor-BB increases tumor pericyte content via stromal-derived factor-1alpha/CXCR4 axis. *Cancer Res*, 69(15): 6057-64.
- Soriano, P., 1999. Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain. *Nat Genet*, 21(1): 70-1.
- St-Jacques, B. et al., 1998. Sonic hedgehog signaling is essential for hair development. *Curr Biol*, 8(19): 1058-68.
- St-Jacques, B., Hammerschmidt, M. and McMahon, A.P., 1999. Indian hedgehog signaling regulates proliferation and differentiation of chondrocytes and is essential for bone formation. *Genes Dev*, 13(16): 2072-86.
- Stanton, B.Z. and Peng, L.F., 2010. Small-molecule modulators of the Sonic Hedgehog signaling pathway. *Mol Biosyst*, 6(1): 44-54.
- Stanton, B.Z. et al., 2009. A small molecule that binds Hedgehog and blocks its signaling in human cells. *Nat Chem Biol*, 5(3): 154-6.
- Stecca, B. et al., 2007. Melanomas require HEDGEHOG-GLI signaling regulated by interactions between GLI1 and the RAS-MEK/AKT pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(14): 5895-900.
- Stein, J.J., Seymour, K.A., Maier, K.G. and Gahtan, V., 2010. The effects of nicotine on vascular smooth muscle cell chemotaxis induced by thrombospondin-1 and fibronectin. *Am J Surg*, 202(5): 545-8.
- Stengel, D. et al., 2006. PAF-receptor is preferentially expressed in a distinct synthetic phenotype of smooth muscle cells cloned from human internal thoracic artery: functional implications in cell migration. *Biochem Biophys Res Commun*, 346(3): 693-9.
- Stewart, G.A. et al., 2003. Expression of the developmental Sonic hedgehog (Shh) signalling pathway is up-regulated in chronic lung fibrosis and the Shh receptor patched 1 is present in circulating T lymphocytes. *J Pathol*, 199(4): 488-95.

- Stottmann, R.W. et al., 2011. Cholesterol metabolism is required for intracellular hedgehog signal transduction in vivo. *PLoS Genet*, 7(9): e1002224.
- Straface, G. et al., 2009. Sonic hedgehog regulates angiogenesis and myogenesis during post-natal skeletal muscle regeneration. *J Cell Mol Med*, 13(8B): 2424-35.
- Stratman, A.N., Davis, M.J. and Davis, G.E., 2011. VEGF and FGF prime vascular tube morphogenesis and sprouting directed by hematopoietic stem cell cytokines. *Blood*, 117(14): 3709-19.
- Stratman, A.N., Malotte, K.M., Mahan, R.D., Davis, M.J. and Davis, G.E., 2009. Pericyte recruitment during vasculogenic tube assembly stimulates endothelial basement membrane matrix formation. *Blood*, 114(24): 5091-101.
- Stratman, A.N., Schwindt, A.E., Malotte, K.M. and Davis, G.E., 2010. Endothelial-derived PDGF-BB and HB-EGF coordinately regulate pericyte recruitment during vasculogenic tube assembly and stabilization. *Blood*, 116(22): 4720-30.
- Streblov, D.N. et al., 1999. The human cytomegalovirus chemokine receptor US28 mediates vascular smooth muscle cell migration. *Cell*, 99(5): 511-20.
- Su, W. et al., 2012. Sonic hedgehog maintains survival and growth of chronic myeloid leukemia progenitor cells through beta-catenin signaling. *Exp Hematol*, 40(5): 418-27.
- Sun, L., Tian, Z. and Wang, J., 2009. A direct cross-talk between interferon-gamma and sonic hedgehog signaling that leads to the proliferation of neuronal precursor cells. *Brain Behav Immun*, 24(2): 220-8.
- Surace, E.M. et al., 2006. Inhibition of ocular neovascularization by hedgehog blockade. *Mol Ther*, 13(3): 573-9.
- Suri, C. et al., 1996. Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell*, 87(7): 1171-80.
- Tallquist, M. and Kazlauskas, A., 2004. PDGF signaling in cells and mice. *Cytokine Growth Factor Rev*, 15(4): 205-13.
- Tallquist, M.D., French, W.J. and Soriano, P., 2003. Additive effects of PDGF receptor beta signaling pathways in vascular smooth muscle cell development. *PLoS Biol*, 1(2): E52.
- Tang, S.N. et al., 2012. Inhibition of sonic hedgehog pathway and pluripotency maintaining factors regulate human pancreatic cancer stem cell characteristics. *Int J Cancer*, 131(1): 30-40.
- Teglund, S. and Toftgard, R., 2010. Hedgehog beyond medulloblastoma and basal cell carcinoma. *Biochim Biophys Acta*, 1805(2): 181-208.
- Tenzen, T. et al., 2006. The cell surface membrane proteins Cdo and Boc are components and targets of the Hedgehog signaling pathway and feedback network in mice. *Dev Cell*, 10(5): 647-56.
- Thayer, S.P. et al., 2003. Hedgehog is an early and late mediator of pancreatic cancer tumorigenesis. *Nature*, 425(6960): 851-6.
- Tilghman, R.W. et al., 2005. Focal adhesion kinase is required for the spatial organization of the leading edge in migrating cells. *J Cell Sci*, 118(Pt 12): 2613-23.
- Tillet, E. et al., 2005. N-cadherin deficiency impairs pericyte recruitment, and not endothelial differentiation or sprouting, in embryonic stem cell-derived angiogenesis. *Exp Cell Res*, 310(2): 392-400.
- Tsukui, T. et al., 1999. Multiple left-right asymmetry defects in *Shh*(<sup>-/-</sup>) mutant mice unveil a convergence of the *shh* and retinoic acid pathways in the control of *Lefty-1*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(20): 11376-81.
- Uchida, H. et al., 2011. Role of sonic hedgehog signaling in migration of cell lines established from CD133-positive malignant glioma cells. *J Neurooncol*, 104(3): 697-704.

- Ucuzian, A.A. et al., 2010. Characterization of the chemotactic and mitogenic response of SMCs to PDGF-BB and FGF-2 in fibrin hydrogels. *J Biomed Mater Res A*, 94(3): 988-96.
- Uemura, A. et al., 2002. Recombinant angiopoietin-1 restores higher-order architecture of growing blood vessels in mice in the absence of mural cells. *J Clin Invest*, 110(11): 1619-28.
- Umehara, F. et al., 2000. A novel mutation of desert hedgehog in a patient with 46,XY partial gonadal dysgenesis accompanied by minifascicular neuropathy. *Am J Hum Genet*, 67(5): 1302-5.
- Uden, A.B. et al., 1996. Mutations in the human homologue of *Drosophila* patched (PTCH) in basal cell carcinomas and the Gorlin syndrome: different in vivo mechanisms of PTCH inactivation. *Cancer Res*, 56(20): 4562-5.
- Unoki, H. et al., 2003. Up-regulation of *cyr61* in vascular smooth muscle cells of spontaneously hypertensive rats. *Lab Invest*, 83(7): 973-82.
- Urness, L.D., Sorensen, L.K. and Li, D.Y., 2000. Arteriovenous malformations in mice lacking activin receptor-like kinase-1. *Nat Genet*, 26(3): 328-31.
- Valentini, R.P. et al., 1997. Post-translational processing and renal expression of mouse Indian hedgehog. *J Biol Chem*, 272(13): 8466-73.
- van Tuyl, M. et al., 2007. Angiogenic factors stimulate tubular branching morphogenesis of sonic hedgehog-deficient lungs. *Dev Biol*, 303(2): 514-26.
- Vaughan, E.E. et al., 2012. Pre-treatment of Endothelial Progenitor Cells with Osteopontin Enhances Cell Therapy for Peripheral Vascular Disease. *Cell Transplant*.
- Vikkula, M. et al., 1996. Vascular dysmorphogenesis caused by an activating mutation in the receptor tyrosine kinase TIE2. *Cell*, 87(7): 1181-90.
- Vokes, S.A. et al., 2004. Hedgehog signaling is essential for endothelial tube formation during vasculogenesis. *Development*, 131(17): 4371-80.
- von Philipsborn, A. and Bastmeyer, M., 2007. Mechanisms of gradient detection: a comparison of axon pathfinding with eukaryotic cell migration. *Int Rev Cytol*, 263: 1-62.
- Wagenseil, J.E. and Mecham, R.P., 2009. Vascular extracellular matrix and arterial mechanics. *Physiol Rev*, 89(3): 957-89.
- Wang, G. et al., 2010a. Activation of the sonic hedgehog signaling controls human pulmonary arterial smooth muscle cell proliferation in response to hypoxia. *Biochim Biophys Acta*, 1803(12): 1359-67.
- Wang, K., Pan, L., Che, X., Cui, D. and Li, C., 2010b. Sonic Hedgehog/GLI signaling pathway inhibition restricts cell migration and invasion in human gliomas. *Neurol Res*, 32(9): 975-80.
- Wang, L. and Dudek, S.M., 2009. Regulation of vascular permeability by sphingosine 1-phosphate. *Microvasc Res*, 77(1): 39-45.
- Wang, T.P., Hsu, S.H., Feng, H.C. and Huang, R.F., 2012. Folate deprivation enhances invasiveness of human colon cancer cells mediated by activation of sonic hedgehog signaling through promoter hypomethylation and cross action with transcription nuclear factor-kappa B pathway. *Carcinogenesis*, 33(6): 1158-68.
- Wang, Y. et al., 2006. Class II phosphoinositide 3-kinase alpha-isoform regulates Rho, myosin phosphatase and contraction in vascular smooth muscle. *Biochem J*, 394(Pt 3): 581-92.
- Wang, Z., Castresana, M.R. and Newman, W.H., 2001a. NF-kappaB is required for TNF-alpha-directed smooth muscle cell migration. *FEBS Lett*, 508(3): 360-4.

- Wang, Z., Castresana, M.R. and Newman, W.H., 2001b. Reactive oxygen and NF-kappaB in VEGF-induced migration of human vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 285(3): 669-74.
- Ward, M.R. et al., 2001. Low blood flow after angioplasty augments mechanisms of restenosis: inward vessel remodeling, cell migration, and activity of genes regulating migration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 21(2): 208-13.
- Wassif, C.A. et al., 1998. Mutations in the human sterol delta7-reductase gene at 11q12-13 cause Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Am J Hum Genet*, 63(1): 55-62.
- Watanabe, S. et al., 2009. Expression of functional leukotriene B4 receptors on human airway smooth muscle cells. *J Allergy Clin Immunol*, 124(1): 59-65 e1-3.
- Watkins, D.N., Berman, D.M. and Baylin, S.B., 2003. Hedgehog signaling: progenitor phenotype in small-cell lung cancer. *Cell Cycle*, 2(3): 196-8.
- White, A.C., Lavine, K.J. and Ornitz, D.M., 2007. FGF9 and SHH regulate mesenchymal Vegfa expression and development of the pulmonary capillary network. *Development*, 134(20): 3743-52.
- Williams, C. et al., 2010. Hedgehog signaling induces arterial endothelial cell formation by repressing venous cell fate. *Dev Biol*, 341(1): 196-204.
- Williams, J.A., 2005. Hedgehog and spinal cord injury. *Expert Opin Ther Targets*, 9(6): 1137-45.
- Willinger, T. and Flavell, R.A., 2012. Canonical autophagy dependent on the class III phosphoinositide-3 kinase Vps34 is required for naive T-cell homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(22): 8670-5.
- Wilson, C.W. and Chuang, P.T., 2010. Mechanism and evolution of cytosolic Hedgehog signal transduction. *Development*, 137(13): 2079-94.
- Witkiewicz, W., Czyzewska-Buczynska, A., Balasz, S. and Gnus, J.J., 2010. [The role of osteopontin in cardiovascular diseases]. *Pol Merkur Lekarski*, 29(170): 79-83.
- Wolff, C. et al., 2004. iguana encodes a novel zinc-finger protein with coiled-coil domains essential for Hedgehog signal transduction in the zebrafish embryo. *Genes Dev*, 18(13): 1565-76.
- Wolpert, L., 1969. Positional information and the spatial pattern of cellular differentiation. *J Theor Biol*, 25(1): 1-47.
- Wu, X., Walker, J., Zhang, J., Ding, S. and Schultz, P.G., 2004. Purmorphamine induces osteogenesis by activation of the hedgehog signaling pathway. *Chem Biol*, 11(9): 1229-38.
- Xie, J. et al., 1998. Activating Smoothed mutations in sporadic basal-cell carcinoma. *Nature*, 391(6662): 90-2.
- Xu, S. et al., 2012. Increased expression of Nox1 in neointimal smooth muscle cells promotes activation of matrix metalloproteinase-9. *J Vasc Res*, 49(3): 242-8.
- Xu, X.F. et al., 2009. Gli1 maintains cell survival by up-regulating IGF6 and Bcl-2 through promoter regions in parallel manner in pancreatic cancer cells. *J Carcinog*, 8: 13.
- Xuan, C.R., Chen, Y., He, P.Y. and Shen, C.Y., 2009. [Chemoattractive effects of chemokine-like factor 1 on human arterial smooth muscle cells]. *Beijing Da Xue Xue Bao*, 41(2): 148-51.
- Yabkowitz, R., Mansfield, P.J., Ryan, U.S. and Suchard, S.J., 1993. Thrombospondin mediates migration and potentiates platelet-derived growth factor-dependent migration of calf pulmonary artery smooth muscle cells. *J Cell Physiol*, 157(1): 24-32.
- Yamazaki, M. et al., 2008. Sonic hedgehog derived from human pancreatic cancer cells augments angiogenic function of endothelial progenitor cells. *Cancer Sci*, 99(6): 1131-8.

- Yamboliev, I.A., Chen, J. and Gerthoffer, W.T., 2001. PI 3-kinases and Src kinases regulate spreading and migration of cultured VSMCs. *Am J Physiol Cell Physiol*, 281(2): C709-18.
- Yamboliev, I.A. and Gerthoffer, W.T., 2001. Modulatory role of ERK MAPK-caldesmon pathway in PDGF-stimulated migration of cultured pulmonary artery SMCs. *Am J Physiol Cell Physiol*, 280(6): C1680-8.
- Yan, T., Angelini, M., Alman, B.A., Andrulis, I.L. and Wunder, J.S., 2008. Patched-one or smoothed gene mutations are infrequent in chondrosarcoma. *Clin Orthop Relat Res*, 466(9): 2184-9.
- Yang, L. et al., 2008. Sonic hedgehog is an autocrine viability factor for myofibroblastic hepatic stellate cells. *J Hepatol*, 48(1): 98-106.
- Yang, X. et al., 1999. Angiogenesis defects and mesenchymal apoptosis in mice lacking SMAD5. *Development*, 126(8): 1571-80.
- Yoo, Y.A., Kang, M.H., Kim, J.S. and Oh, S.C., 2008. Sonic hedgehog signaling promotes motility and invasiveness of gastric cancer cells through TGF-beta-mediated activation of the ALK5-Smad 3 pathway. *Carcinogenesis*, 29(3): 480-90.
- Yoon, J.W. et al., 2002. Gene expression profiling leads to identification of GLI1-binding elements in target genes and a role for multiple downstream pathways in GLI1-induced cell transformation. *J Biol Chem*, 277(7): 5548-55.
- Yoshioka, K. et al., 2012. Endothelial PI3K-C2alpha, a class II PI3K, has an essential role in angiogenesis and vascular barrier function. *Nat Med*, 18(10): 1560-9.
- Zhang, H., Facemire, C.S., Baner, A.J. and Faber, J.E., 2002. Different alpha-adrenoceptors mediate migration of vascular smooth muscle cells and adventitial fibroblasts in vitro. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 282(6): H2364-70.
- Zhang, J. et al., 2009. Differential roles of PDGFR-alpha and PDGFR-beta in angiogenesis and vessel stability. *Faseb J*, 23(1): 153-63.
- Zhang, L. et al., 2012. Lipopolysaccharide activated phosphatidylcholine-specific phospholipase C and induced IL-8 and MCP-1 production in vascular endothelial cells. *J Cell Physiol*, 226(6): 1694-701.
- Zhong, J. et al., 2012. ZIC1 modulates cell-cycle distributions and cell migration through regulation of Sonic hedgehog, PI3K and MAPK signaling pathways in gastric cancer. *BMC Cancer*, 12(1): 290.
- Zhou, W., Negash, S., Liu, J. and Raj, J.U., 2009. Modulation of pulmonary vascular smooth muscle cell phenotype in hypoxia: role of cGMP-dependent protein kinase and myocardin. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 296(5): L780-9.
- Zhu, P. et al., 2006. Transdifferentiation of pulmonary arteriolar endothelial cells into smooth muscle-like cells regulated by myocardin involved in hypoxia-induced pulmonary vascular remodelling. *Int J Exp Pathol*, 87(6): 463-74.
- Zigmond, S.H., Foxman, E.F. and Segall, J.E., 2001. Chemotaxis assays for eukaryotic cells. *Curr Protoc Cell Biol*, Chapter 12: Unit 12 1.
- Zymek, P. et al., 2006. The role of platelet-derived growth factor signaling in healing myocardial infarcts. *J Am Coll Cardiol*, 48(11): 2315-23.