université de BORDEAUX

THÈSE PRÉSENTÉE

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR DE

L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

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

SPÉCIALITÉ BIOLOGIE CELLULAIRE ET PHYSIOPATHOLOGIE

Par Léa PECHTIMALDJIAN

Études des télocytes cutanés dans l'hémangiome infantile : caractérisation, propriétés angiogéniques et approches thérapeutiques

Sous la direction de François MOISAN

Soutenue le 10 décembre 2025

Membres du jury :

Mme BAILLY Sabine, Directrice de recherche	CEA de Grenoble, France	Rapporteure, Présidente
M. VALCOURT Ulrich, Professeur des universités	Université de Lyon, France	Rapporteur
Mme BOCCARA Olivia, Praticienne hospitalière	Hôpital Necker de Paris, France	Examinatrice
Mme CHAPOULY Candice, Chargée de recherche	Université de Bordeaux, France	Examinatrice
M. WEHRLE-HALLER Bernhard, Professeur	Université de Genève, Suisse	Examinateur

Membres invités :

Mme LABREZE Christine, Praticienne hospitalière	CHU de Bordeaux, France	Invitée
Mme JULLIE Marie-Laure, Praticienne hospitalière	CHU de Bordeaux, France	Invitée

À mes parents,
À ma mamie, mon papi,
À Aurélien…

REMERCIEMENTS

Je souhaite exprimer ma profonde gratitude aux membres du jury qui me font l'honneur d'évaluer ce travail et de participer à ma soutenance. Merci d'avoir fait le déplacement depuis Pessac, Grenoble, Lyon, Paris et Genève.

J'adresse un remerciement particulier à **Madame Sabine Bailly**, rapporteure de mon manuscrit. C'est un grand privilège de pouvoir vous présenter le fruit de mes recherches et de bénéficier de votre regard scientifique. Je remercie également **Monsieur Ulrich Valcourt**, également rapporteur de ce travail, pour le temps consacré à la lecture et l'évaluation du manuscrit. J'ai eu la chance de suivre vos enseignements de biologie cellulaire à Lyon, et c'est un plaisir particulier de retrouver aujourd'hui votre regard passionné et rigoureux sur mes travaux.

Je remercie aussi les examinateurs, **Madame Olivia Boccara**, **Madame Candice Chapouly** et **Monsieur Bernhard Wehrle-Haller**, pour l'intérêt porté à mon projet et vos retours précieux qui contribueront à enrichir cette réflexion scientifique. Enfin, je suis reconnaissante envers **Madame Christine Leauté-Labrèze** et **Madame Marie-Laure Jullié**, invitées de ce jury, pour leur présence sans faille et l'éclairage clinique qu'elles ont apportés à mon travail tout au long de cette thèse.

Mes remerciements vont ensuite à mon directeur de thèse **François Moisan**, pour m'avoir accueillie sur ce projet passionnant. Merci pour votre soutien et vos conseils, pour l'équilibre entre exigence et bienveillance et pour la confiance accordée qui m'a permis d'apprendre, d'oser, de me tromper tout en progressant. Merci de m'avoir fait sentie légitime de donner mon avis et de construire ce projet. J'ai beaucoup grandi à vos côtés, scientifiquement mais aussi dans ma manière d'aborder la recherche avec rigueur, curiosité et humilité.

Je remercie aussi mes deux cheffes d'équipe **Marie Beylot-Barry** et **Laurence Bresson-Bepoldin**, pour m'avoir intégrée avec bienveillance. Votre disponibilité, vos conseils et vos partages d'expérience sur vos parcours respectifs m'ont guidée et aidée à prendre du recul sur l'avenir.

Je souhaite exprimer une gratitude particulière à **Thomas Mathivet**, biologiste vasculaire dont l'expertise, les échanges scientifiques et les suggestions ont été source d'inspiration. Nous avons eu ensemble la chance de co-encadrer notre stagiaire **Chloé Rousson**, que je remercie pour son enthousiasme, sa motivation et son investissement tout au long du stage.

Un remerciement tout particulier à **Yamina**, bien plus qu'une collègue mais une véritable « maman de laboratoire », toujours à l'écoute et présente dans les moments difficiles. Ta patience, tes conseils et ton soutien chaleureux m'ont porté tout au long de la thèse avec une énergie positive et motivante.
Merci également à tous mes collègues de l'équipe TRIO2, particulièrement **Muriel**, **Elodie, Walid, Sandrine F et Martina**, pour vos connaissances partagées, vos conseils avisés et vos idées stimulantes. J'ai eu beaucoup de chance de pouvoir apprendre et évoluer à vos côtés.

Un grand merci à mes collègues doctorants. Une pensée particulière pour **Antoine** (tu le vaux bien !), mon mentor. Merci pour la relecture du manuscrit et pour tous les conseils rassurants pour la thèse, les manips ainsi que pour mon projet professionnel. **Julie**, merci de partager la même obsession que moi pour les télocytes, merci pour ton soutien indéfectible notamment pendant la période d'écriture, nos repas, nos séances de pilâtes, et merci de m'avoir rassuré pendant les moments de doutes. **Chloé A**., merci pour avoir partagé les hauts et les bas de ces années. Merci à **Amandine**, **Rémi** et **Thomas** pour nos moments conviviaux. Merci aux filles du « bureau des lumières » pour leur bonne humeur et votre intégration quand je suis arrivée à Bordeaux. Merci à mes amis doctorants et docteurs chimistes, pour leur accueil chaleureux et nos souvenirs à Bordeaux (et plus loin !) : **Lucie**, **Alix**, **Valentin**, **Maxime** et **Marine**. Aussi, merci à **Mathias,** élu meilleur guide touristique de Paris pour tous nos moments partagés, notamment à la montagne, au spa et à Monein(g) ! Reconnaissante de vous avoir tous rencontrés, je pars de Bordeaux la tête remplie de souvenirs qui me font déjà sourire avec nostalgie !

Je souhaite également remercier mes collègues de bureau, **Audrey** et **Ludivine**, pour nos discussions scientifiques, mais aussi pour les conversations plus légères, les rires et les gourmandises qui ont égayé mon quotidien. Votre bonne humeur et vos encouragements ont été un véritable moteur qui ont donné à ces années une dimension humaine irremplaçable. Merci d'avoir fait de ce bureau un lieu où il faisait bon de venir chaque matin.

Je suis profondément reconnaissante envers mes **parents** pour leur soutien constant et leur amour indéfectible, ainsi qu'à mon **beau-père** pour sa curiosité toujours bienveillante. Merci de m'avoir transmis le gout de l'effort et de la persévérance. Merci d'avoir cru en moi, souvent plus que moi-même. Même lorsque la distance ou le manque de temps rendaient les choses difficiles, je savais que je pouvais compter sur vous sans conditions. Merci à ma petit sœur **Inès**, rayon de soleil inépuisable, et à toute ma famille élargie pour leur présence.
Un merci particulier à mes beaux-parents, **Nathalie** et **Didier**, qui m'ont accompagné jusqu'à l'autre bout de la France pour m'aider à passer mon concours d'école doctorale avec plus de sérénité.

Merci aussi à ma famille de cœur, mes amis d'adolescence qui m'accompagnent depuis tant d'années : **Stéphanie, Léna, Margaux, Arnaud, Clément, Pierre-Louis, Sébastien et Thibault**. Merci d'avoir fait l'effort de vous être déplacés pour partager ce moment important pour moi ou d'avoir essayé de le faire malgré les contraintes. Votre présence, votre humour et votre bienveillance ont traversé les années sans jamais faiblir et je mesure la chance immense que j'ai de vous avoir à mes côtés. Une mention spéciale à ma sœur de cœur **Mathilde**, pour son écoute infinie (même sur les prépuces !) et pour sa compréhension sans faille. Merci d'avoir trouvé les mots justes, même quand je ne savais pas moi-même ce que je voulais dire. Merci de m'avoir ramené les pieds sur terre quand j'étais submergée, me faire rire quand tout me semblait trop lourd et me rappeler qui j'étais quand le doute s'installait. Rien que pour ça, et pour tout le reste…

Enfin je souhaite adresser un remerciement particulier à mon compagnon **Aurélien**. Faire une thèse est une aventure intense mais nous avons eu la chance et peut être parfois le défi de traverser cette expérience ensemble. Merci pour ton soutien indéfectible, pour ta patience, ton aide précieuse en R et python, ton écoute des 18 000 répétitions avant chaque oral, et ta joie partagée dans mes petites victoires scientifiques, comme si elles étaient les tiennes. Partager nos joies, nos inquiétudes et nos longues journées de travail a créé entre nous une complicité unique. Sans toi ce parcours n'aurait pas eu la même saveur, ni la même force. Merci d'avoir été mon ancrage et mon moteur à la fois. Dans un mois, ce sera ton tour : courage futur Dr Mazet !

RÉSUMÉ FRANÇAIS

L'hémangiome infantile (HI) est une tumeur vasculaire bénigne, essentiellement cutanée. C'est la tumeur la plus fréquente du nouveau-né. Elle peut atteindre rapidement une taille importante et entraîner des complications fonctionnelles ou esthétiques. Elle se caractérise par une phase proliférative suivie d'une involution spontanée, ce qui en fait un modèle unique pour l'étude des mécanismes de régression vasculaire. Le traitement de référence, le propranolol, accélère cette régression, notamment en ciblant une population stromale récemment identifiée : les télocytes (TC). Ces cellules interstitielles jusque-là peu étudiées, se caractérisent par de longues extensions cytoplasmiques appelées télopodes et forment un réseau périvasculaire. Les TC sont présents dans de nombreux organes et sont impliqués dans l'homéostasie tissulaire et l'angiogenèse.

L'objectif de cette thèse a été de caractériser l'évolution du réseau vasculaire au cours de la régression de l'HI et d'évaluer la contribution des TC à ce processus. Nous avons d'abord développé un protocole innovant de transparisation des biopsies cutanées humaines, permettant pour la première fois l'imagerie 3D en « large-volume » de leur architecture vasculaire et de leur environnement cellulaire. L'analyse morphométrique a permis de décrire de manière qualitative et quantitative les vaisseaux d'HI prolifératifs, particulièrement longs, tortueux et volumineux. Durant la régression, nous avons observé un processus de normalisation vasculaire impliquant la probable maturation des vaisseaux persistants et le pruning progressif des structures immatures, sans vague apoptotique massive.

Parallèlement, les TC des HI prolifératifs évoluent d'une morphologie en feuillet (spindle-shape), similaire à celle observée dans la peau saine, vers une morphologie dendritique unique et spécifique à la phase de régression. Cette transition suggère un changement fonctionnel profond.

Afin d'évaluer leur rôle angiogénique, nous avons adapté le fibrin bead assay pour y incorporer des TC dérivés de patients. Nos résultats montrent que les TC en feuillet n'ont pas d'effet significatifs sur la biologie des cellules endothéliales. En revanche, les TC dendritiques, dérivés d'HI en régression, exercent un effet paracrine anti-angiogénique, en bloquant spécifiquement la prolifération et le bourgeonnement endothélial. Les analyses de screening ont montré la sécrétion de pièges à facteurs de croissance, dont la pentraxine-3 (PTX3), qui s'est imposée comme médiateur principal. PTX3 agit comme un piège pour le FGF-2, inhibant la prolifération, déstabilisant la VE-cadhérine et augmentant la motilité endothéliale, facilitant ainsi le remodelage vasculaire. Les TC favorisent également la migration endothéliale, par des mécanismes indépendants de PTX3, en faveur du recyclage cellulaire dans les vaisseaux persistants.

Ces résultats positionnent les TC comme des régulateurs centraux de la régression vasculaire de l'HI via un programme paracrine anti-angiogénique. Des approches de transcriptomique Single-cell en cours visent à caractériser l'hétérogénéité et la plasticité des TC au cours de cette transition. Comprendre comment induire cet état « normalisant » des TC pourrait ouvrir de nouvelles perspectives thérapeutiques en cancérologie. Contrairement aux agents anti-angiogéniques actuels souvent limités par des résistances adaptatives, nous suggérons que l'action cellulaire des TC offre un potentiel inédit pour rééquilibrer la balance angiogénique dans les tumeurs solides.

Mots clefs : Angiogenèse, microenvironnement, dermatologie, nouvelles cibles, imagerie 3D, tumeur.

RÉSUMÉ ANGLAIS

Infantile hemangioma (IH) is the most common tumor in newborns. This benign vascular tumor, mainly affecting the skin, can quickly grow to a large size and cause functional or aesthetic complications. It is characterized by a proliferative phase followed by spontaneous involution, making it a unique model for studying the mechanisms of vascular regression. The standard treatment, propranolol, accelerates this regression, in particular by targeting a recently identified stromal population: telocytes (TC). These interstitial cells, which have been little studied until now, are characterized by long cytoplasmic extensions called telopodes and form a perivascular network. TC are present in many organs and are involved in tissue homeostasis and angiogenesis.

The objective of this thesis was to characterize the evolution of the vascular network during IH regression and to evaluate the contribution of TC to this process. We first developed an innovative protocol for the tissue-clearing of human skin biopsies, enabling for the first time large-volume 3D imaging of their vascular architecture and cellular environment. Morphometric analysis showed that proliferative IH have long, tortuous, and voluminous vessels. During regression, we observed a process of vascular normalization involving the probable maturation of persistent vessels and the progressive pruning of immature structures, without massive apoptosis.

At the same time, proliferative IH TC evolve from a spindle-shaped morphology, similar to that observed in healthy skin, to a unique dendritic morphology specific to the regression phase. This transition suggests a profound functional change.

To evaluate their angiogenic role, we adapted the *fibrin bead assay* to incorporate TC derived from patients. Our results show that spindle-shaped TC have no significant effect on endothelial cell biology. In contrast, dendritic TC, derived from regressing IH, exert a paracrine anti-angiogenic effect by specifically blocking endothelial proliferation and sprouting. Screening analyses showed the secretion of growth factor traps, including pentraxin-3 (PTX3) that emerged as the main mediator. PTX3 binds FGF-2 and prevents the interaction with endothelial receptors, inhibiting proliferation, destabilizing VE-cadherin, and increasing endothelial motility, thereby facilitating vascular remodeling. TC also promote endothelial migration through mechanisms independent of PTX3, suggesting involvement in cell recycling in persistent vessels.

These results stage TC as central regulators of vascular regression in IH via a paracrine anti-angiogenic program. Furthermore, our preliminary data suggest that propranolol promotes the acquisition of this protective phenotype by activating the TNFα/NF-κB pathway. Ongoing single-cell transcriptomic approaches aim to characterize the heterogeneity and plasticity of TC during this transition. Understanding how to induce this “normalizing” state of TC could open new therapeutic perspectives in oncology. Unlike current anti-angiogenic agents, which are often limited by adaptive resistance, we suggest that the cellular action of TC offers unprecedented potential for restoring angiogenic balance in solid tumors.

Key words: Angiogenesis, microenvironment, dermatology, new therapeutic targets, 3D imaging, tumor.

UNITÉ DE RECHERCHE

Bordeaux Institute of Oncology (BRIC)

Université de Bordeaux

INSERM U1312 – Bâtiment Bordeaux Biologie Santé (BBS)

Campus Carreire, 4ème étage

2 rue du Dr Hoffmann Martinot

33076 Bordeaux Cedex

France

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES ABBRÉVIATIONS 19
TABLE DES FIGURES 23
TABLE DES TABLEAUX 27

INTRODUCTION 29

1. ARCHITECTURE ET IMAGERIE VASCULAIRE 32
1.1. Anatomie et histologie du système vasculaire sanguin 32
1.1.1. Les différents types de vaisseaux 32
1.1.2. La peau et la vascularisation cutanée 34
1.2. Imagerie gros volume du réseau vasculaire : la transparisation 38
1.2.1. Imagerie conventionnelle du réseau vasculaire : approches et limitations 38
1.2.2. Les méthodes de transparisation : les solvants organiques 42

2. MORPHOGENÈSE ET HOMÉOSTASIE VASCULAIRE 47
2.1. La vasculogenèse 48
2.2. L'angiogenèse 49
2.2.1. L'angiogenèse par intussusception 49
2.2.2. L'angiogenèse par bourgeonnement 50
2.3. La régression vasculaire 55
2.3.1. Le pruning 55
2.3.2. L'involution 57
2.4. Les voies moléculaires pro-angiogéniques 57
2.4.1. La voie des VEGF 57
2.4.2. La voie des FGF 59
2.4.3. La voie des IGF 63
2.5. Les voies moléculaires anti-angiogéniques 65
2.5.1. Les régulateurs négatifs de la voie des VEGF 65
2.5.2. Les régulateurs négatifs de la voie des FGF : la pentraxine-3 66
2.5.3. Les régulateurs négatifs de la voie des IGF : l'IGFBP-3 70
2.6. Les voies de guidance axonale : exemple de la nétrine-1 73
2.6.1. Généralités 73
2.6.2. Régulations et structure de la nétrine-1 74

2.6.3. Récepteurs de la nétrine-1 75
2.6.4. Effets anti-angiogéniques de la nétrine-1 76

3. ANGIOGÈNESE PATHOLOGIQUE 77
3.1. L'angiogenèse des tumeurs solides 77
3.1.1. Les mécanismes cellulaires de l'angiogenèse tumorale 78
3.1.2. Morphologie des vaisseaux tumoraux et conséquences 80
3.1.3. Dérégulations moléculaires 82
3.1.4. Thérapies ciblées anti-vasculaires : stratégies et résistances 87
3.1.5. La normalisation vasculaire 90
3.2. Les anomalies vasculaires 93
3.2.1. Les malformations vasculaires 93
3.2.2. Les tumeurs vasculaires 96

4. L'HÉMANGIOME INFANTILE 98
4.1. Présentation, caractéristiques et complications cliniques 98
4.1.1. Epidémiologie et facteurs de risques 98
4.1.2. Classification 98
4.1.3. Diagnostic 99
4.1.4. Cycle tumoral 100
4.1.5. Conséquences cliniques 101
4.2. Stratégies thérapeutiques 104
4.2.1. Traitements médicamenteux 104
4.2.2. Traitements non-médicamenteux : le laser et la chirurgie 107
4.3. Histologie et composants cellulaires 108
4.3.1. Les progéniteurs endothéliaux 109
4.3.2. Les cellules endothéliales 110
4.3.3. Les péricytes 110
4.3.4. Les macrophages 111
4.3.5. Les mastocytes 112
4.3.6. Les adipocytes 112
4.3.7. Les télocytes 113
4.4. Physiopathologie 113
4.4.1. Etiologie 113
4.4.2. Dérégulations cellulaires et moléculaires 116

5. LE TÉLOCYTE 119
5.1. Identification 119
5.2. Ultrastructure et morphologie 119
5.3. Immunophénotype 120
5.4. Distribution 122
5.5. Caractérisation transcriptomique 123
5.6. Communication cellulaire 124
5.6.1. Communication juxtacrine : les jonctions et contacts 124
5.6.2. Communication paracrine : les vésicules extra-cellulaires 125
5.6.3. Les synapses stromales 126
5.7. Fonctions biologiques 127
5.7.1. Morphogenèse et organisation tissulaire 127
5.7.2. Angiogenèse 130
5.7.3. Réparation et régénération tissulaire 130
5.7.4. Immunité 131
5.8. Dérégulations et pathologies 132
5.8.1. Processus tumoral bénin et cancéreux 132
5.8.2. Pathologies cutanées 133

RÉSULTATS 137

PARTIE 1 – Développement d'un protocole d'imagerie 3D compatible avec le tissu cutané humain 138

PARTIE 2 – Rôle critique des télocytes cutanés au cours de la régression de la vascularisation tumorale de l'hémangiome infantile 171

1. Les télocytes cutanés ont un rôle anti-angiogénique normalisant sur la vascularisation tumorale de l'hémangiome infantile 172

2. Effet anti-angiogénique de la nétrine-1 sécrétée par les télocytes au cours de la régression de l'hémangiome infantile 221

PARTIE 3 – Caractérisation par approche protéomique des télocytes cutanés sains et d'hémangiome infantile 237

DISCUSSION 271

CONCLUSION 291

PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS 293
1. Article publié 293
2. Article soumis 293
3. Articles en préparation 293
4. Communications et congrès 294
4.1. Communications orales 294
4.2. Communications affichées 295
5. Autres 296

RÉFÉRENCES 299

ANNEXES 321

LISTE DES ABBRÉVIATIONS

5-FU : 5- fluorouracile
µm : Micromètre (s)

A:

ACE: Angiotensin converting enzyme
ADAM: A disintegrin and metalloproteinase
ADN : Acide désoxyribonucléique
ADRB2 : β2- adrenergic receptor, Récepteur β2-adrénergique
Akt : Protein kinase B
ALDH : Aldehyde dehydrogenase 1
ALS : Acid Labil unit
AMPc : Adénosine monophosphate cyclique
AQP1: Aquaporin-1
ARID1A: AT-rich interactive domain-containing protein 1A
ARN: Acide ribonucléique
ATAC-seq: Assay for transposase-accessible chromatin using sequencing
ATCC: American type culture collection
ATP: Adénosine tri-phosphate
AP1: Activator protein 1

B:

BAF: BRG1/BRM-associated factor (complex SWI/SNF)
BMP: Bone morphogenic protein
BTN3A1: Butyrophilin

C:

C/EBPα: CCAAT/ enhancer-binding protein alpha
CAF: Cancer associated fibroblast, Fibroblaste associé au cancer
CAM: Chorioallantoic membrane
CBP: CREB-binding protein
CD: Cluster of differentiation
CDH: Cadherin
CML : Cellules musculaires lisses
COL : Collagen
CREB : cAMP response element-binding protein
CSC : Cellule souche cancéreuse
CXCL : C-X-C motif chemokines

D :

DAG : Diacyl-glycérol
DAMPs : Damage associated pattern
DAPI : 4'6'-Diamino-2-phénylindole
DBE : Dibenzyl-éther
DCC: Deleted in colorectal cancer
DCM: Dichloro-méthane
DISCO: 3D imaging of solvent cleared organs
DLL4: Delta-like ligand 4
DMEM: Dulbecco's modified Eagle medium
DPBS: Dulbecco's phosphate buffer saline
DSCAM: Down syndrome cell adhesion molecule

E:

EC: Endothelial cell, cellule endothéliale
ECGM2: Endothelial cell growth medium 2
ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay
End-MT: Transition endothélio-mésenchymateuse
EMT: Epithelial-to-mesenchymal transition, transition épithélio-mésenchymateuse
EPAC: Exchange protein directly by cAMP
EPC: Endothelial progenitor cell, cellule progénitrice endothéliale
ERG: ETS-related gene
ERK: Extracellular signal-regulated kinase

F:

FACT: Facilitated chromatin transcription complex
FAK: Focal adhesion kinase
FB: Fibroblast, fibroblaste
FDA: Food and drug administration
FDR: False discovery rate
FGF: Fibroblast growth factor
FGFR: Fibroblast growth factor receptor
FITC: Isothiocyanate de fluorescéine
Flt1/VEGFR1: Fms related receptor tyrosine kinase 1
FoxL1: Forkhead box L1
FRS2: Fibroblast growth factor receptor substrate 2
FSP1: Fibroblast specific protein

G:

GFP: Green fluorescent protein
GLI1: Glioma-associated oncogene 1
GLUT1: Glucose transporter 1
GNAQ: Guanine nucleotide-binding protein G
Grb2: Growth factor receptor-bound protein 2
GTP: Guanosine tri-phosphate
GUSβ: β-glucuronidase

H:

HemEPC: Hemangioma endothelial progenitor cell, Cellule progénitrice endothéliale d'hémangiome
HemMSC: Hemangioma mesenchymal cell, cellule souche mésenchymateuse d'hémangiome
HemSC: Hemangioma stem cell, cellule souche d'hémangiome
HI/IH: hémangiome infantile
HIF: Hypoxia-inducible factors
HRE: Hypoxia responsive element
HS6ST1: Heparan sulfate 6-O-sulfotransferase 1
HSPG: Heparan sulfate proteoglycan, Protéoglycane à héparane sulfate
HS6ST1: Heparan sulfate 6-O-sulfotransferase 1
HUVEC: Human Umbilical Vein Endothelial cells

I:

IB4: Isolectin B4
ICAM1: Intercellular adhesion molecule 1
IL: Interleukin
IGF: Insulin-like growth factor
IGFBP: Insulin-like growth factor binding protein
INSR-A: Insulin receptor 1
IPA: Ingenuity pathway analysis
IP3: Inositol tri-phosphate
ISSVA**:** International society for the study of vascular anomalies
IRM : Imagerie par résonance magnétique

J :

JNK: C-Jun N-terminal kinases

K:

KDR/VEGFR2: Kinase insert domain receptor

L:

L1CAM : L1 cell adhesion molecule
LC- MS/MS : Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse tandem
Lgr5: Leucin-rich repeat containing G-protein coupled receptor 5

M:

MAPK: Mitogen-activated protein kinase
MA-plot: Minus-average plot
MCAM (CD146): Melanoma cell adhesion molecule
MEC (ECM): Matrice extra-cellulaire
MEK: Mitogen-activated protein kinase kinase
MiR : Micro-ARN
MMP : Matrix metalloproteinase
MOI: Multiplicity of infection
mTOR: Mechanistic target of Rapamycin

N:

NCAM1: Neural cell adhesion molecules 1
NEMO: NF-kappa-B essential modulator
NFIX: Nuclear factor I X-type
NF-κB: Nuclear factor kappa-B
NG-2: Neuron-glial antigen 2
NICH: Non involuting congenital hemangioma
NLGN: Neurogilin
NLS: Nuclear localization signal
Nm: nanomètre(s)
NRP: Neuropillin
NRXN : Neurexin
NTN1 : Netrin-1

O :

Oct-4: Octamer-binding transcription factor 4

P:

PAEC: Porcine aortic endothelial cell
PAMPs: Pathogen associated molecular pattern
PCA: Principal component analysis
PCR: Polymerase chain reaction
PDGF: Platelet-derived growth factor
PDGFR: Platelet-derive growth factor receptor
PDL: Pulse dye laser

PECAM-1: Platelet endothelial cell adhesion molecule 1
PFA: Paraformaldehyde
PI3K: Phosphoinositide 3-kinase
PICH: Partially involuting congenital hemangioma
PKA: Protein kinase A
PKC: Protein kinase C
PLCγ: Phospho-lipase C gamma
PlGF: Placenta growth factor
PPARγ: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma
PTX3: Pentraxin-3

R:

RAS: Renin angiotensin system
RhoA: Ras homolog family member A
RICH: Rapidly involuting congenital hemangioma
ROBO: Roundabout guidance receptor
ROCK: Rho-associated protein kinase
ROS: Reactive oxygen species
RT: Rétrotranscription

S:

Sca-1: Stem cell antigen 1
SCD: Stearoyl-coA desaturase
SDF1: Stromal cell-derived factor 1
SEM: Standard error of the mean
Sema: Semaphorin
sFLT1: Soluble fms-like tyrosine kinase-1
SHP2: Src homology 2 domain-containing protein tyrosine phosphatase 2
Sos: Son of sevenless
SP1: Specificity protein 1
Src: Proto-oncogene c-Src
STAT: Signal transducer and activator of transcription
STX1A: Syntaxin-1A
SSRP1: Structure specific recognition protein 1
SWI/ SNF: Switch/ Sucrose non-fermentable
SYT11: Synaptotagmin XI

T:

TACE: Tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme
TAK1 (MAP3K7): Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7
TAZ: Transcriptional co-activator with PDZ-binding motif
TC: Telocyte, Télocyte
TGF: Transforming growth factor
Tie-2: Tyrosine kinase with immunoglobulin and EGF homology domains-2
TIMP: Tissue inhibitor of metalloproteinase
TKI: Tyrosine kinase inhibitor
TLR: Toll-like receptor
TNC: Tenascin C
TNF: Tumor necrosis factor
TRADD: Tumor necrosis factor receptor type 1 -associated death domain protein
TSP1/THBS1: Thrombospondin-1
TSR: Thrombospondin type-1 repeats

U:

UNC5B: Uncoordinated-5 homolog B

V:

VCAM: Vascular cell adhesion molecule
VDA: Vascular disrupting agent
VEGF: Vascular endothelial growth factor
VEGFR: Vascular endothelial growth factor receptor
VPF: Vascular permeability factor
vWF: von Willebrand Factor

W:

WB: Western-blot
WRN: Werner syndrome helicase

TABLE DES FIGURES

Figure 1: Approche expérimentale 31
Figure 2: Anatomie et histologie des vaisseaux 33
Figure 3: Les différents types de capillaires 34
Figure 4: Schéma de l'anatomie cutanée 35
Figure 5: Schéma des crêtes épidermiques et papilles dermiques 36
Figure 6: Schéma de la vascularisation cutanée 37
Figure 7: Spectre d'absorption des hémoglobines et des mélanines 39
Figure 8: Histologie du système vasculaire cutané 41
Figure 9: Grandes familles de méthodes de transparisation 43
Figure 10: Main humaine transparisée par Spalteholz en 1911 44
Figure 11: Etapes de la transparisation par solvants organiques 44
Figure 12: Exemple du réseau vasculaire d'organes de souris transparisés par solvants organiques.. 45
Figure 13: Processus de formation du réseau vasculaire 47
Figure 14: Les étapes de la vasculogenèse embryonnaire 48
Figure 15: Les étapes de l'angiogenèse par intussusception 50
Figure 16: Etapes de l'angiogenèse par bourgeonnement 51
Figure 17: Les cellules endothéliales de front (tip) ou de soutien (stalk) 52
Figure 18: Lumenisation par fusion de vacuoles 53
Figure 19: Interactions entre les cellules endothéliales et les péricytes 55
Figure 20: Mécanismes cellulaire du pruning vasculaire 56
Figure 21: Les récepteurs et ligands de la voie des VEGF 58
Figure 22: Voie de signalisation du VEGF 59
Figure 23: Classification des ligands FGF 60
Figure 24: Signalisation des FGF canoniques 61
Figure 25: Signalisation des IGFs et de leurs récepteurs 64
Figure 26: Structure du gène et de la protéine PTX3 67
Figure 27: Fonctions de la PTX3 69
Figure 28: Structure de la protéine IGFBP-3 71
Figure 29: Les quatre familles des molécules de guidage axonale et leur récepteurs associés. 73
Figure 30: Homologie structurale entre les nétrines et les laminines 74
Figure 31: La NTN1 et ses récepteurs canoniques 75
Figure 32: Stratégies principales de l'angiogenèse tumorale 78
Figure 33: Caractéristiques morphologiques du réseau vasculaire tumoral 81
Figure 34: Rôle ambivalent de PTX3 dans le cancer 85
Figure 35: Survie des patients atteints de cancer du sein selon leur profil PTX3 86
Figure 36: Différences des thérapies anti-angiogénique et agents de disruption vasculaire 88
Figure 37: Normalisation vasculaire, vascularisation physiologique, tumorale et traitée 91
Figure 38: Mécanismes cellulaires et conséquences de la normalisation vasculaire 92
Figure 39: Exemple de malformations vasculaires simples 94
Figure 40: Ciblage de la voie PI3K-Akt-mTOR en cas de mutation *PIK3CA* 94
Figure 41: Ciblage de la voie MAPK-ERK en cas de mutation *GNAQ* 95
Figure 42: Exemples de tumeurs vasculaires 96
Figure 43: Classification morphologique des HI 99
Figure 44: Les phases du cycle tumoral de l'HI 100
Figure 45: Histologie de l'HI pendant son cycle tumoral 101
Figure 46: Localisation récurrente des hémangiomes sévères 102

Figure 47: Exemples d'HI sévères 103
Figure 48: Exemple de séquelles esthétiques d'HI involués 104
Figure 49: Evolution du second enfant traité par propranolol 105
Figure 50: Evolution d'un HI péri-auriculaire traité par Nd:YAG 108
Figure 51: Immunohistochimie de CD133, révélant les cellules souches d'HI 109
Figure 52: Théorie de la différenciation des HemSC dans l'HI 109
Figure 53: Immunohistochimie de GLUT1, révélant les EC d'HI 110
Figure 54: Immunohistochimie de αSMA des péricyte dans un HI prolifératif 111
Figure 55: Immunofluorescence des macrophages dans les HI prolifératifs et involutifs 111
Figure 56: Mastocytes dans un HI en phase d'involution précoce 112
Figure 57: Immunohistochimie des adipocytes dans les HI prolifératifs, involutifs et involués 113
Figure 58: Lésion précurseur d'un HI sur un nouveau-né 114
Figure 59: Système rénine - angiotensine (RAS) 115
Figure 60: Mécanismes la physiopathologie de l'HI au cours de son cycle tumoral 118
Figure 61: Microscopie électronique à transmission d'un télocyte 120
Figure 62: Echafaudage cellulaire de TC 122
Figure 63: Distribution des TC cutanés 123
Figure 64: Microscopie électronique des contacts des TC 125
Figure 65: Différents types de vésicules sécrétées par les TC 125
Figure 66: Synapse stromale entre un TC et un mastocyte 127
Figure 67: Rôle des TC dans la morphogenèse intestinale et le maintien de l'homéostasie 129
Figure 68: Résumé des cellules immunitaires identifiées comme interagissant avec le TC 131
Figure 69: Couverture de l'édition spéciale 2024 de STAR protocols 139
Figure 70: Les IH-TC surexpriment la NTN1 et les EC cutanées expriment son récepteur UNC5B 228
Figure 71: La NTN1 dérivée d'IH-TC repoussent les EC 230
Figure 72: La NTN1 dérivée d'IH TC est anti-angiogénique 232
Figure 73: Potentiels mécanismes d'action de la NTN1 pendant la régression de l'HI 236
Figure 74: Contrôle qualité des données 244
Figure 75: Identification protéomique de marqueurs des TC sains cutanés 248
Figure 76: Pré-sélection des candidats 249
Figure 77: Validation histologiques des marqueurs des TC 251
Figure 78: Analyse différentielle des expression protéiques globale des TC et FB cutanés sains 253
Figure 79: Fonctions biologiques des TC comparées aux fibroblastes cutanés physiologiques 254
Figure 80: Principales pathologies (A) et upstream regulators (B) associés aux TC cutanés 255
Figure 81: Expression protéiques globale des TC cutanés sains ou d'HI 257
Figure 82: Propriétés fonctionnelles et régulation des TC d'HI en régression 259
Figure 83: Résumé des potentielles fonctions biologiques des TC cutanés physiologiques 264
Figure 84: Résumé des potentielles propriétés des TC d'HI en régression 267
Figure 85: Dynamique de la vascularisation d'hémangiome infantile 277
Figure 86: Fonctions des TC dendritiques au cours de la régression de l'HI 278
Figure 87: Signalisation du TNFα 282
Figure 88: Hypothèse du crosstalk de la voie β-adrénergique et NF-κB 284
Figure 89: Structure du complexe SWI/SNF[532] 285
Figure 90: Hypothèse du crosstalk de la reprogrammation inflammatoire et épigénétique 286
Figure 91: Protocole de préparation des cellules pour l'analyse Single-Cell transcriptomique 288
Figure 92: Annexe 1 -Contrôle qualité par vérification des marqueurs connus des EC (A) et FB (B). 322
Figure 93: Annexe 2- Expression des marqueurs des TC de la littérature dans les TC cutanés 323
Figure 94: Annexe 3 – Cellules cutanées positives pour le marqueur NFIX 324

Figure 95: Annexe 4 - Immunohistochimie anti-CD10 d'un hémangiome congénital (NICH)..... 325
Figure 96: Annexe 5 - Expression membranaire de ICAM1/CD54 325
Figure 97: Annexe 6 - Expression différentielles de protéines individuelles des FB vs TC..... 326
Figure 98: Annexe 7 - Expression différentielles de protéines individuelles des TC 327
Figure 99: Annexe 8 - Expression de NRXN1 et NRXN2 par les cellules immunitaires 328
Figure 100: Annexe 9 - Neurexines et récepteurs aux facteurs de guidance cutanés..... 329
Figure 101: Annexe 10 - Marqueurs de cellules souches mésenchymateuses..... 330
Figure 102: Annexe 11 - Fibres de collagène dans la peau saine ou d'HI 330
Figure 103: Annexe 12 - Principaux upstream regulators des TC HI et de leurs cibles. 331
Figure 104: Annexe 13 : Reprogrammation inflammatoire des TC cutanés 332
Figure 105: Annexe 10 - Panel d'images non publiées ou présentées dans le manuscrit de thèse ... 334
Figure 106: Annexe 15 - Poster présenté au CARD en juin 2025 335

TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1: Indices de réfraction des molécules biologiques 39
Tableau 2: Marqueurs moléculaires des cellules ou structures vasculaires 41
Tableau 3: Marqueurs des télocytes 121
Tableau 4: Séquences des primers du screening personnalisé de qPCR 224
Tableau 5: Références des anticorps d'immunohistofluorescence 226
Tableau 6: Références des anticorps 245
Tableau 7: Expression par les TC cutanés des marqueurs recensés dans la littérature 246

INTRODUCTION

Contexte de l'étude

L'angiogenèse correspond à l'un des deux processus de formation des vaisseaux sanguins. Elle est essentielle au cours du développement embryonnaire, période durant laquelle elle est extrêmement active et permet la constitution du réseau vasculaire nécessaire à la croissance des tissus. Après la naissance, cette activité s'interrompt et les cellules endothéliales deviennent majoritairement quiescentes, à l'exception de quelques situations physiologiques bien définies, comme la cicatrisation ou le cycle menstruel. Cependant, ce processus peut être dérégulé dans plusieurs contextes pathologiques. C'est notamment le cas dans les anomalies vasculaires, qui regroupent les malformations et les tumeurs vasculaires, mais également dans toutes les tumeurs solides.

Dans le contexte des tumeurs solides, J. Folkman a démontré dès les années 1970 que la croissance tumorale est strictement dépendante de la néo-angiogenèse. Les tumeurs ne peuvent pas excéder $1mm^3$ sans apport sanguin. Les cellules cancéreuses, sous la pression de l'hypoxie, détournent alors les mécanismes physiologiques de l'angiogenèse, ou adoptent des stratégies atypiques pour former un réseau vasculaire tumoral aberrant et abondant. Ce réseau anarchique favorise la croissance, la dissémination métastatique et la résistance aux traitements. Le ciblage de l'angiogenèse tumorale a donc suscité un fort intérêt. Néanmoins, malgré les avancées thérapeutiques notables, les stratégies anti-angiogéniques demeurent limitées par l'émergence de résistances adaptatives.

Les anomalies vasculaires constituent un autre cadre de dérégulation de l'angiogenèse. Les malformations vasculaires résultent souvent de mutations post-zygotiques affectant le contrôle de la croissance, de la maturation et de la différenciation des vaisseaux, entraînant des structures dysfonctionnelles persistantes. Elles sont généralement traitées par sclérothérapie, embolisation et chirurgie, parfois associées à des thérapies ciblées médicamenteuses. Cependant, ces approches ne permettent qu'un contrôle partiel de la lésion, car les malformations tendent souvent à récidiver.

Enfin, les tumeurs vasculaires sont un groupe d'anomalies caractérisées par une prolifération endothéliale marquée. Parmi elles, les hémangiomes sont les plus représentés. Les hémangiomes congénitaux se développent *in utero* et nécessitent une résection chirurgicale comme seule option thérapeutique. À l'inverse, l'hémangiome infantile, tumeur la plus courante chez le nourrisson, apparait après la naissance et se caractérise par un cycle biologique singulier : une phase de prolifération intense des cellules endothéliales, suivie d'une phase de régression spontanée. Cette régression peut être induite et accélérée par le propranolol, un bêtabloquant dont l'efficacité a été découverte de manière fortuite par C. Leauté-Labrèze.

L'hémangiome infantile est ainsi un modèle vasculaire tumoral unique présentant une régression et maturation vasculaire spontanée, phénomène encore mal compris. L'étude des mécanismes qui gouvernent la phase de régression revêt un intérêt majeur, car elle pourrait permettre d'identifier de nouveaux leviers thérapeutiques transposables à d'autres contextes d'angiogenèse pathologique, comme justement dans les cancers solides, les malformations et les autres tumeurs vasculaires.

Des travaux précédents de l'équipe ont mis en évidence que le propranolol cible un nouveau type cellulaire périvasculaire : le télocyte. Malgré un intérêt grandissant pour son étude, cette cellule stromale demeure encore peu caractérisée. Ceci soulève la question d'un rôle pro-angiogénique inhibé par le propranolol ou au contraire de l'activation d'un phénotype anti-angiogénique. Ses propriétés, sa plasticité, ses sous-populations et ses fonctions restent également mal définies. En effet la recherche sur les télocytes est émergeante et le développement de modèles et d'approches permettant leur étude n'est apparu qu'à partir de 2020. Il devient donc nécessaire de mieux les caractériser, d'évaluer leur rôle physiologique et leur implication dans l'angiogenèse pathologique. En résumé, pour participer à ce large objectif nous avons choisi l'hémangiome infantile en tant que pathologie modèle, source de matériel et d'informations biologiques. Une telle compréhension pourrait à terme, permettre de positionner les télocytes comme une nouvelle cible thérapeutique dans les pathologies à angiogenèse dérégulée, encore à ce jour traitées avec difficultés.

Objectifs des travaux et approches expérimentales

L'objectif principal de ce travail de thèse est d'élucider les mécanismes impliqués dans la régression des vaisseaux tumoraux d'HI, pour plus tard, les transposer dans d'autres contextes de vascularisation pathologique. Notre hypothèse est que les TC périvasculaires contribueraient activement au remodelage et à la réorganisation du réseau vasculaire. Afin de tester cette hypothèse, ce travail s'est structuré autour de plusieurs objectifs complémentaires (Figure **1**) :

1. **Décrire l'évolution du réseau vasculaire et des TC au cours du cycle de l'HI** (*in situ*) : l'objectif est de visualiser de manière exhaustive le réseau vasculaire ainsi que l'organisation périvasculaire des TC dans des HI de différentes phases de croissance, afin d'identifier et de caractériser un mécanisme de remodelage (pruning, involution). Nous avons adapté une approche d'imagerie 3D quantitative de transparisation.
2. **Déchiffrer le potentiel angiogénique des TC d'HI en cours de régression** (*in vitro*) : l'objectif est d'évaluer l'impact des TC issus d'HI en régression sur les EC et sur l'organisation vasculaire. Nous avons mis au point un modèle d'angiogenèse 3D incluant la co-culture de TC, afin d'analyser leur influence sur le bourgeonnement, la prolifération et la survie des EC. Une stratégie de screening intégrative et multi-approche a permis d'établir la signature moléculaire angiogénique des TC et de proposer un mécanisme d'action.

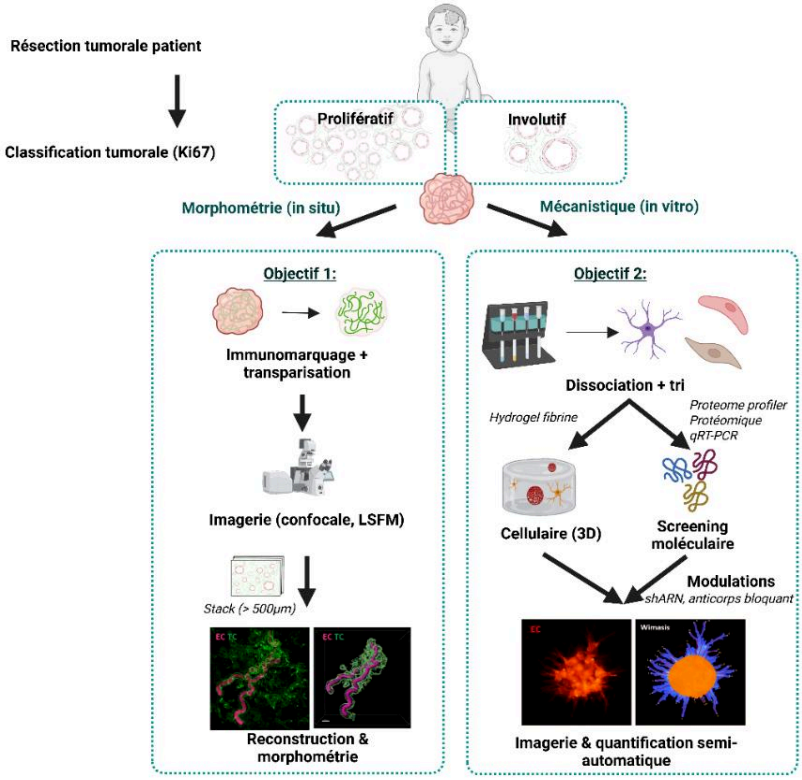


Figure 1: Approche expérimentale

1. ARCHITECTURE ET IMAGERIE VASCULAIRE

La régression de l'HI s'accompagne de profonds changements dans la structure et l'organisation des vaisseaux. Pour interpréter ces modifications et identifier les mécanismes, il est donc essentiel de revenir sur la manière dont un réseau vasculaire normal est organisé, maintenu et visualisable.

1.1. Anatomie et histologie du système vasculaire sanguin

Le système vasculaire sanguin est un réseau tubulaire qui permet la circulation du sang. Chez un Homme adulte, il représente jusqu'à 100 000 km, soit deux fois le tour de la Terre[1]. Il permet des échanges avec les tissus qui sont essentiels au maintien de leurs fonctions physiologiques et à l'adaptation des besoins métaboliques locaux. La vascularisation s'organise en un réseau hiérarchisé composé d'artères, de veines et de capillaires, chacun présentant des caractéristiques anatomiques et histologiques adaptées à des fonctions spécifiques.

1.1.1. Les différents types de vaisseaux

Le sang oxygéné, expulsé par le cœur est d'abord propulsé dans les artères, vaisseaux de gros calibre aux parois épaisses et élastiques, capables de supporter la pression élevée du débit sanguin. Ces artères se ramifient en artérioles, plus petites, qui régulent le débit sanguin local. Les artérioles conduisent le sang vers les capillaires, réseau de vaisseaux très fins. Ils effectuent les échanges gazeux et nutritifs avec les tissus. Le sang rejoint ensuite les veinules, plus larges et moins pressurisées, puis les veines dont les parois plus fines comportent des valvules pour faciliter le retour du sang vers le cœur (**Figure 2**).

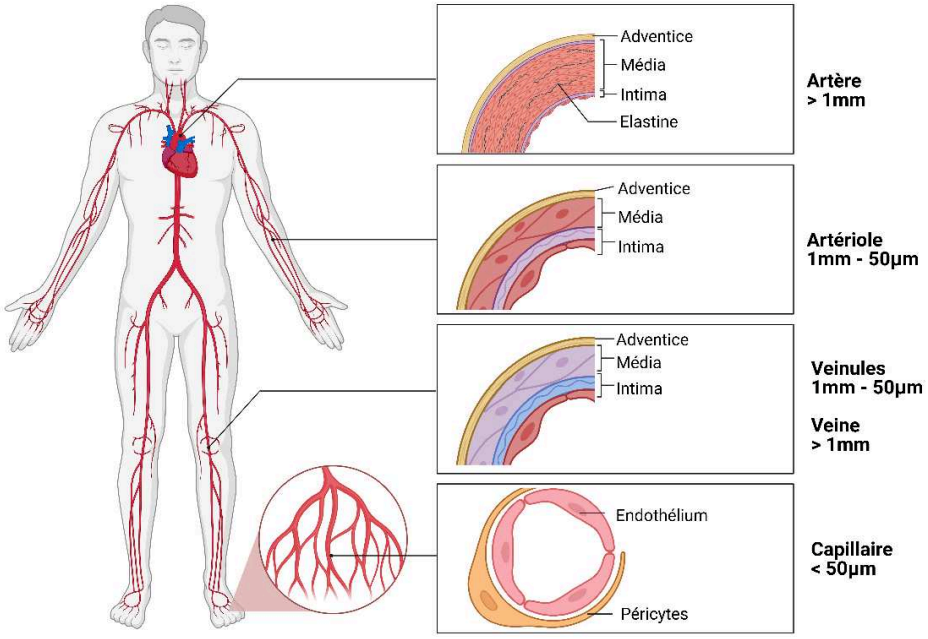


Figure 2: Anatomie et histologie des vaisseaux

Les vaisseaux de gros calibre comprenant les artères, artérioles, veines et veinules sont composés de trois couches cellulaires concentriques. Les capillaires, de petit calibre, sont composés d'un endothélium recouvert de péricytes. Créé sur Biorender

Du point de vue histologique, les artères, artérioles, veinules et veines présentent une organisation en trois couches distinctes, adaptées aux caractéristiques du flux sanguin. L'intima, la couche la plus interne est formée d'un endothélium continu reposant sur une lame basale. La média, couche intermédiaire, est constituée principalement de cellules musculaires lisses et de fibres élastiques dont l'épaisseur et la composition varient selon le type de vaisseaux. Par exemple, les artères ont une média très épaisse et élastique, adaptée à la gestion du débit sanguin élevé, tandis que les veines ont une média plus fine. La couche la plus externe, l'adventice est un tissu conjonctif dense qui confère une résistance mécanique. Il protège les vaisseaux et les ancre aux tissus environnants.

Les capillaires, quant à eux sont composés uniquement d'une fine couche endothéliale, recouverte de péricytes, optimisés pour les échanges avec les tissus. Cette organisation se décline en plusieurs types d'endothélium, dont la structure et la perméabilité varient selon les fonctions spécifiques des tissus qu'ils irriguent (**Figure 3**). Par exemple, les capillaires continus possèdent un endothélium de cellules endothéliales (EC) jointives avec une lame basale continue, les échanges s'effectuent par diffusion ou transcytose, comme c'est le cas dans le cœur ou la peau. L'endothélium de barrière appartient à cette catégorie avec des jonctions serrées plus fortes et une quasi-absence de transcytose afin d'assurer une

barrière sélective protégeant des tissus tels que le cerveau, la rétine ou le thymus. À l'inverse, les capillaires fenestrés eux présentent des pores, appelés fenestrations, entre les EC qui facilitent les échanges, ce qui est typique de la vascularisation d'organes impliqués dans la filtration ou l'absorption comme l'intestin ou les reins. Les capillaires sinusoïdes eux, sont caractérisés par un endothélium discontinu et une lame basale fragmentée. Ils sont spécialisés dans l'échange de macromolécules et de cellules et ils se retrouvent dans les organes à activité métabolique ou hématopoïétique intense comme le foie, la rate et la moelle osseuse.

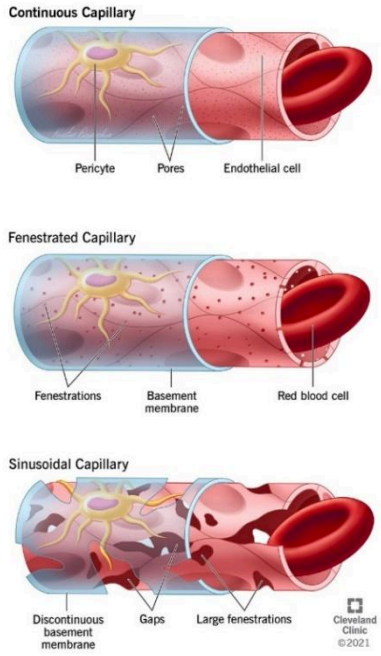


Figure 3: Les différents types de capillaires[2]

Les capillaires continus sont composés d'EC jointives et d'une lame basale continue. Les capillaires fenestrés sont composés d'EC avec des fenestrations et une lame basale continue. Les capillaires sinusoïdes sont composées d'un endothélium et d'une lame basale discontinue.

1.1.2. La peau et la vascularisation cutanée

La peau constitue l'organe le plus grand du corps représentant en moyenne 6% du poids total et pas moins de 2m^2. Du fait de sa souplesse et de son imperméabilité, elle constitue la barrière principale contre les traumatismes extérieurs. En plus, elle est aussi une actrice centrale de la thermorégulation, la sensorialité et la synthèse de vitamine D [3].

- **<u>Anatomie générale de la peau : un organe constitué de trois couches</u>**

La peau est un organe stratifié constitué de plusieurs couches distinctes, de la plus superficielle à profonde : l'épiderme, le derme et l'hypoderme (**Figure 4**).

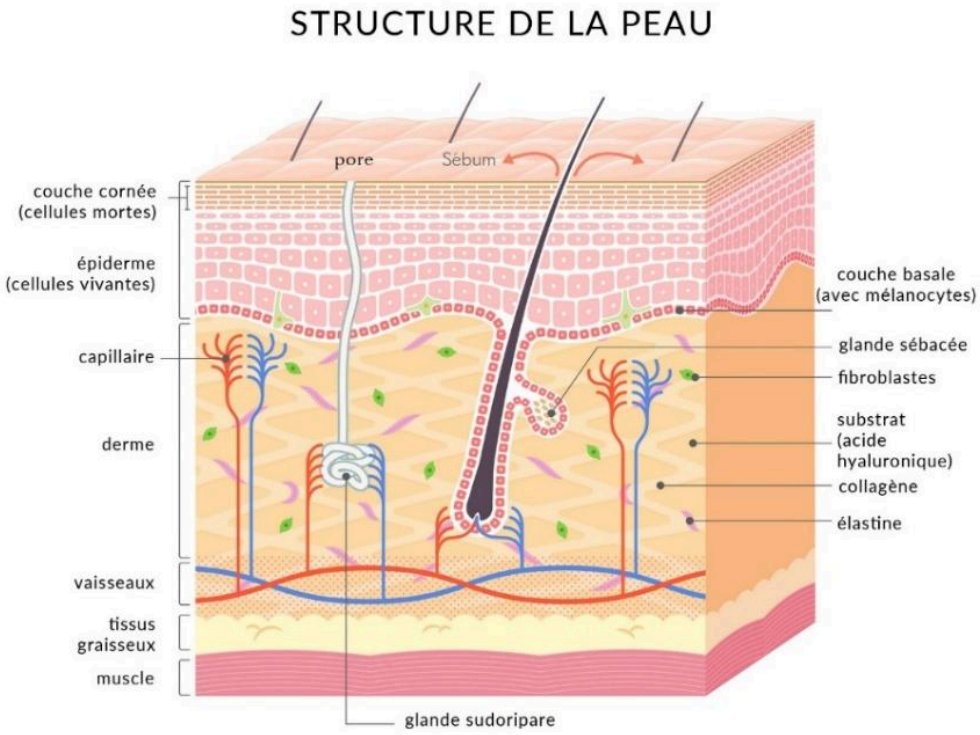


Figure 4: Schéma de l'anatomie cutanée[4]

La peau se compose de trois couches. La plus superficielle, l'épiderme est un épithélium qui se compose de kératinocytes et de mélanocytes jointifs. Le derme, la couche intermédiaire est du tissu conjonctif qui se compose de matrice extra-cellulaire et de fibroblastes. Il contient les annexes cutanées, la vascularisation et l'innervation. La couche la plus profonde, l'hypoderme est un tissu conjonctivo-adipeux, principalement composé de lobules d'adipocytes.

L'épiderme est un épithélium de revêtement pavimenteux, pluristratifié et kératinisé. Il se compose à 80% de kératinocytes, qui lui confèrent sa force physique. La deuxième population la plus importante correspond aux mélanocytes, responsables de la pigmentation et de la photoprotection par la production des mélanines.

La portion basale de l'épiderme s'invagine pour former les crêtes épidermiques (**Figure 5**). Ces régions reposent sur une lame basale cutanée : la jonction dermo- épidermique. Elle est acellulaire et se compose en majorité de collagène de type IV et de laminines. Elle sépare physiquement l'épiderme du derme.

Le derme est la couche intermédiaire de la peau. Cette couche de 2-3 mm d'épaisseur est un tissu conjonctif de soutien. La région apicale du derme s'évagine pour former les papilles dermiques, entre les crêtes épidermiques (**Figure 5**). Le derme se divise en deux régions : (i) le derme papillaire qui se loge directement dans les papilles dermiques, c'est un tissu conjonctif lâche avec de fines fibres orientées perpendiculairement à l'épiderme ; (ii) le derme réticulaire qui est plus profond, dense et fibreux avec des faisceaux épais de fibres élastiques et de collagène. À l'inverse de l'épiderme, il est peu riche en cellules mais dense en matrice extracellulaire (MEC). Il se compose de fibroblastes et surtout de fibres de collagène de type I et de type III. Il héberge les annexes cutanées tels que les glandes sébacées, les glandes sudoripares et les follicules pileux. Il accueille aussi l'innervation et la vascularisation sanguine et lymphatique cutanée.

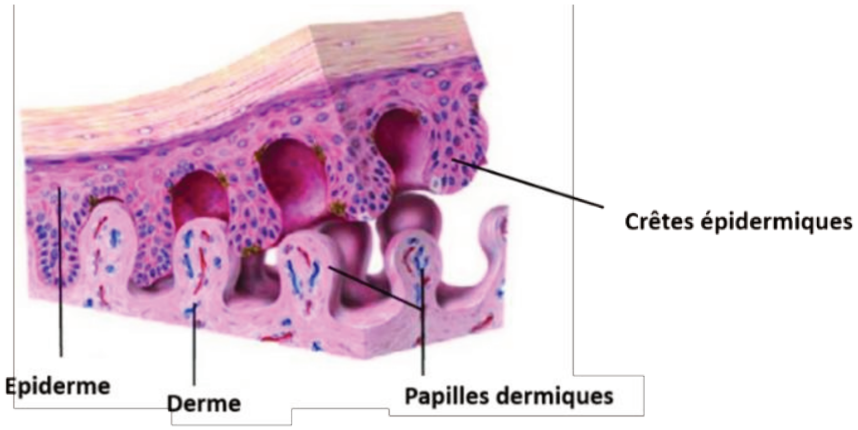


Figure 5: Schéma des crêtes épidermiques et papilles dermiques

L'épiderme forme des invaginations nommées crêtes épidermiques, entres lesquelles viennent le loger des évaginations dermiques normées papilles dermiques. Schéma adapté de la thèse de X. Janvier [5]

L'hypoderme est la couche la plus interne de la peau. C'est un tissu conjonctivo-adipeux qui connecte directement la peau aux organes sous-jacents. Il se compose en majorité de fibres de collagène de type I et III et de lobules d'adipocytes.

- **La vascularisation cutanée :**

La peau possède une organisation vasculaire unique qui illustre l'adaptation du système vasculaire aux fonctions propres de chaque organe. Dans la peau, seuls le derme et l'hypoderme sont vascularisés. À l'inverse, l'épiderme est dépourvu de vaisseaux sanguins et dépend exclusivement de la diffusion des nutriments et de l'oxygène depuis les réseaux capillaires situés dans les couches sous-jacentes. Le réseau vasculaire cutané est finement hiérarchisé et organisé. Il se compose d'artérioles de moyen et

petit calibre, de capillaires et de veinules, formant un système en plusieurs niveaux. Le diamètre des vaisseaux est croissant selon leur profondeur au sein de la peau (**Figure 6**)[6].

L'irrigation de la peau débute par les **artères sous-cutanées**, situées sous l'hypoderme et disposées parallèlement à la surface cutanée. Ces vaisseaux de gros calibres constituent la principale source nourricière de la peau. De ce réseau émergent des artérioles ascendantes, de calibre moyen, qui cheminent dans les septas de l'hypoderme pour atteindre le derme réticulaire. Elles y forment **le plexus vasculaire dermique profond**, qui irrigue la partie profonde du derme ainsi que les annexes cutanées profondes. Depuis ce plexus profond partent des artérioles de plus petit calibre, qui remontent vers la partie plus superficielle du derme. Elles y forment **le plexus vasculaire dermique superficiel**, localisé à la jonction entre le derme réticulaire et papillaire. Ce plexus irrigue la partie supérieure du derme et donne naissance à un réseau de capillaires qui pénètrent jusqu'aux papilles dermiques. Dans chaque papille dermique, ces capillaires forment des **anses capillaires**. Ces structures en boucle caractéristiques sont constituées d'une branche ascendante et d'une branche descendante rejoignant la circulation veineuse. L'endothélium des capillaires est continu. Ces anses jouent un rôle fondamental dans la nutrition et l'oxygénation de l'épiderme dépourvu de vascularisation directe[7,8].

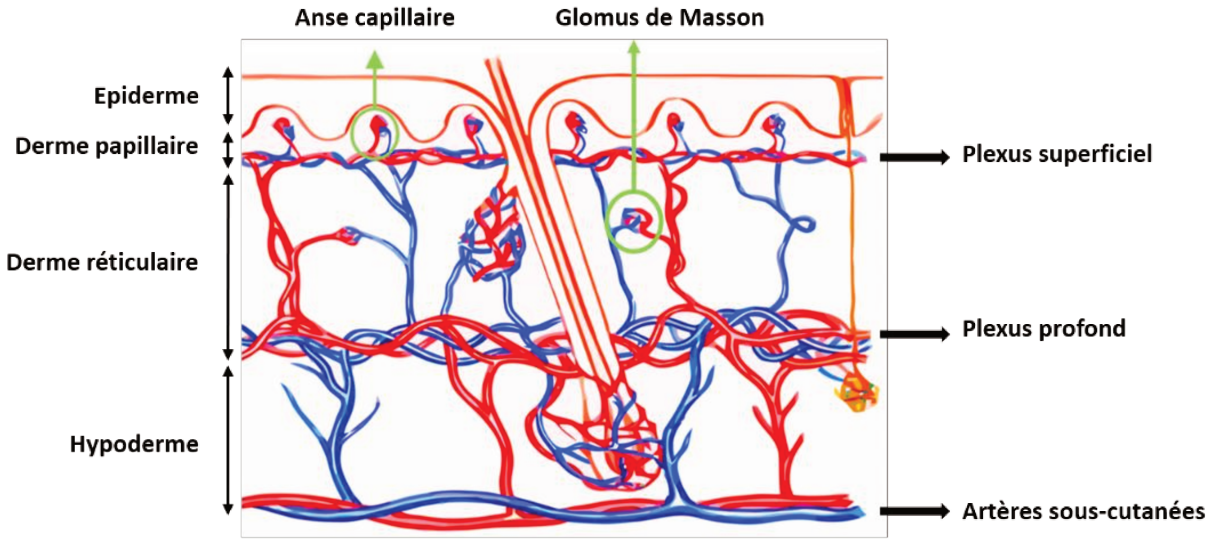


Figure 6: Schéma de la vascularisation cutanée

La vascularisation artérielle est représentée en rouge et la vascularisation veineuse en bleu. La vascularisation prend naissance à partir des artérioles de gros calibre localisées dans l'hypoderme, puis se rétrécit progressivement en direction des couches superficielles du derme. Schéma adapté de Yàñez et al [9].

1.2. Imagerie gros volume du réseau vasculaire : la transparisation

L'imagerie constitue une approche de prédilection pour l'étude du système vasculaire, car l'architecture et la morphologie des vaisseaux traduisent directement leurs fonctions physiologiques et pathologiques. Si l'histologie classique n'offre qu'une vision fragmentée, les techniques de transparisation permettent aujourd'hui d'explorer cette organisation de façon tridimensionnelle (3D).

1.2.1. Imagerie conventionnelle du réseau vasculaire : approches et limitations

L'imagerie conventionnelle du système vasculaire repose essentiellement sur la microscopie optique de coupes histologiques fines, permettant au faisceau lumineux de traverser l'échantillon. Cette étape de sectionnement est rendue indispensable à cause de l'opacité naturelle des tissus biologiques.

- **<u>Principes optiques de l'opacité d'un tissu :</u>**

Un faisceau lumineux est un ensemble de photons se propageant dans la même direction, formant une zone de lumière concentrée, directionnelle et énergétique. Lorsqu'il traverse un tissu biologique, il subit de l'absorption et de la diffusion, qui altèrent sa propagation et réduisent la quantité de lumière transmise. C'est cette combinaison qui confère aux tissus leur **opacité**, limitant la profondeur d'observation en imagerie optique et histologie.

L'**absorption** d'un tissu biologique correspond au processus physique par lequel des protéines captent l'énergie des photons. Elle est principalement déterminée par la présence et la nature de pigments endogènes. Par exemple dans la peau, l'épiderme contient une forte concentration de mélanines, synthétisées par les mélanocytes. Les mélanines possèdent un spectre d'absorption particulièrement large et intense, qui s'étend de l'ultraviolet jusqu'au rouge visible (**Figure 7**). Cette absorption étendue confère d'ailleurs aux mélanines leurs remarquables propriétés photoprotectrices, mais contribue également à rendre les tissus pigmentés et plus opaque en imagerie[10].
Dans le système vasculaire, l'absorption est dominée par l'hémoglobine, la protéine porteuse d'oxygène dans les globules rouges. L'hémoglobine absorbe fortement la lumière dans le visible et le proche infrarouge. Elle existe sous deux formes principales : l'oxyhémoglobine quand elle est liée à l'oxygène et la désoxyhémoglobine lorsqu'elle ne l'est pas. Ces deux formes présentent des spectres d'absorption légèrement différents. Elles partagent un pic intense autour de 415nm. En plus,

l'oxyhémoglobine présente deux pics secondaires à 540 et 575nm, tandis que la désoxyhémoglobine en montre un à 555nm (**Figure 7**). Dans les tissus, ces deux formes coexistent[11].

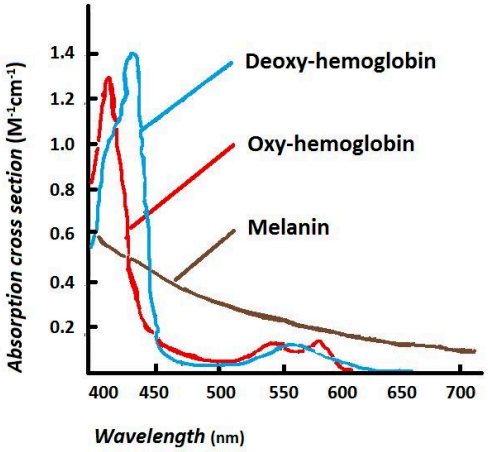


Figure 7: Spectre d'absorption des hémoglobines et des mélanines[12]

La **diffusion** de la lumière dans les tissus biologiques s'explique principalement par leur composition hétérogène et les variations locales d'indices de réfraction. Dans un tissu, le faisceau lumineux traverse de multiples structures biochimiquement différentes : eau, protéines, lipides, chacune présentant un indice de réfraction spécifique compris entre 1.33 et 1.56 (**Tableau 1**). L'indice de réfraction traduit de la capacité d'un milieu à dévier les photons. Selon la loi de Snell-Descartes, plus la différence d'indices de réfraction entre deux milieux successifs est forte, plus la lumière sera déviée et diffusée. Dans le tissu, ces différences créent de nombreuses interfaces optiques, responsables de la dispersion du faisceau initial. Il devient alors progressivement un ensemble de photons diffus, avec une énergie locale atténuée, alors non détecté par les microscopes[13].

Composant biologique	Indice de réfraction (n)
Air	1.00
Eau	1.33
Glucides	1.35
Lipides	1.46
Protéines	1.56
Acides nucléiques	1.55

Tableau 1: Indices de réfraction des molécules biologiques

- **Histologie conventionnelle et limitations :**

La transmission de la lumière à travers un tissu biologique dépend de son épaisseur, en lien avec son absorption et sa diffusion. Conformément à la loi de Beer-Lambert, l'absorption augmente proportionnellement à la longueur du trajet optique : plus le tissu est épais, plus la lumière est absorbée. De même, un tissu plus épais comporte davantage de changements d'indices de réfraction, responsable de la diffusion du faisceau lumineux. Sur la base de ces principes, le sectionnement des échantillons en histologie (3 à 5µm), constitue une étape cruciale. La finesse des coupes diminue les contraintes optiques facilitant l'observation microscopique.

L'étude histologique du réseau vasculaire repose notamment sur l'utilisation de colorations classiques, comme l'hématoxyline-éosine-safran, qui permettent de visualiser l'architecture générale des vaisseaux (**Figure 8**). L'identification des structures vasculaire s'appuie à la fois sur la morphologie des différentes couches constituant leur paroi, leur diamètre et aussi sur l'observation attentive des cellules qui les composent, en particulier la forme de leur corps cellulaire et de leur noyau. Ainsi, l'endothélium, constitué d'un épithélium simple pavimenteux, se caractérise par une seule couche d'EC dont le corps cellulaire et les noyaux sont aplatis. Cette morphologie contraste par exemple nettement avec celle des canaux excréteurs des glandes cutanées, formées de cellules cubiques avec des noyaux arrondis et centrés. Sur le plan organisationnel, la vascularisation cutanée apparaît sous forme de structures tubulaires de calibres variés. Les artères et artérioles présentent une paroi épaisse, riche en cellules musculaires lisses, et une lumière régulière et circulaire. À l'inverse, les veines et veinules possèdent une paroi plus mince, moins riche en cellules musculaires lisses et une lumière plus large et irrégulière. Enfin, les capillaires, de plus petit diamètre se composent essentiellement d'une couche d'EC et de péricytes[14].

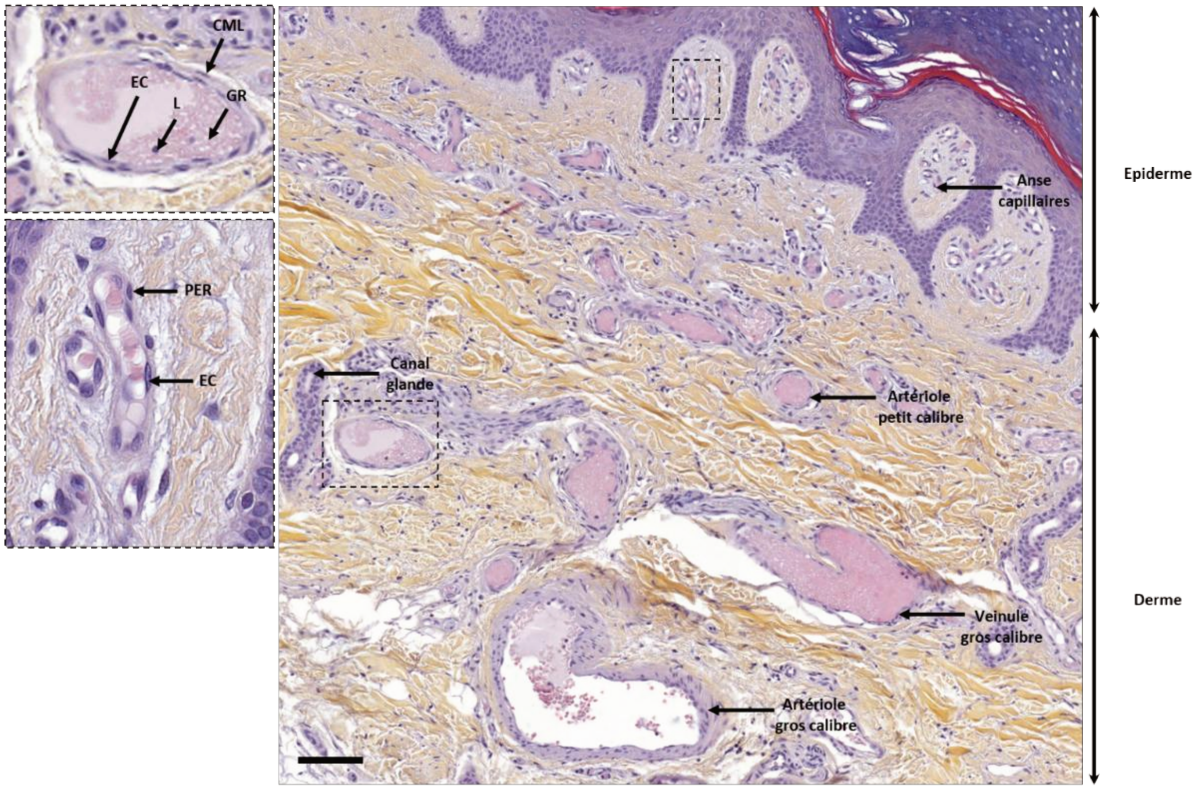


Figure 8: Histologie du système vasculaire cutané[14]

Coloration hématoxyline-éosine-safran d'une peau épaisse. Barre d'échelle = 100µm. EC = Cellules endothéliales, CML = Cellules musculaires lisses, GR= Globules rouges, L = Leucocytes, PER = Péricytes.

Pour une analyse plus spécifique, l'immunohistochimie ou l'immunofluorescence permettent de marquer sélectivement les types cellulaires des vaisseaux (**Tableau 2**).

Marqueur	Type cellulaire/ structure
CD31	EC
Facteur de von Willebrand (vWF)	EC
CD34	EC
VE-Cadhérine	EC
ERG	EC
NG2	Péricytes/ cellules musculaires lisses
PDGFR-β	Péricytes/ cellules musculaires lisses
α-SMA	Péricytes/ cellules musculaires lisses
Desmine	Péricytes/ cellules musculaires lisses

Tableau 2: Marqueurs moléculaires courants des cellules vasculaires

Ces méthodes d'histologie reposent sur l'observation de coupes fines en deux dimensions, ce qui impose une limite majeure : la restriction à un plan d'observation unique. Cette contrainte empêche la visualisation de l'organisation 3D des structures biologiques. Le réseau vasculaire est un système complexe, composé de longues structures biologiques. En ne voyant qu'une mince tranche de tissu, certaines connexions ou continuités peuvent être occultées, rendant difficile l'analyse complète de l'architecture et des interactions cellulaires.
Bien que l'histologie conventionnelle fournisse des informations précieuses, sa capacité à restituer une structure volumique est limitée, ce qui motive le recours à des techniques complémentaires d'imagerie 3D.

1.2.2. Les méthodes de transparisation : les solvants organiques

La transparisation est une méthode de préparation tissulaire visant à réduire l'absorption et la diffusion de la lumière afin de rendre les tissus transparents, ce qui permet leur imagerie 3D en profondeur sans sectionnement préalable. Elle repose sur la réduction de l'absorption et de la diffusion de la lumière, obtenue par dépigmentation et homogénéisation des indices de réfraction.

Les méthodes de transparisation se divisent en trois grandes catégories : **les méthodes aqueuses, les approches hydrogel et les méthodes par solvants**. Nous comptons à ce jour plus d'une cinquantaine de protocoles publiés, incluant de nombreuses variantes et dérivés (**Figure 9**). Ici, nous nous concentrerons sur les méthodes par solvants, qui sont particulièrement efficaces pour les tissus denses.

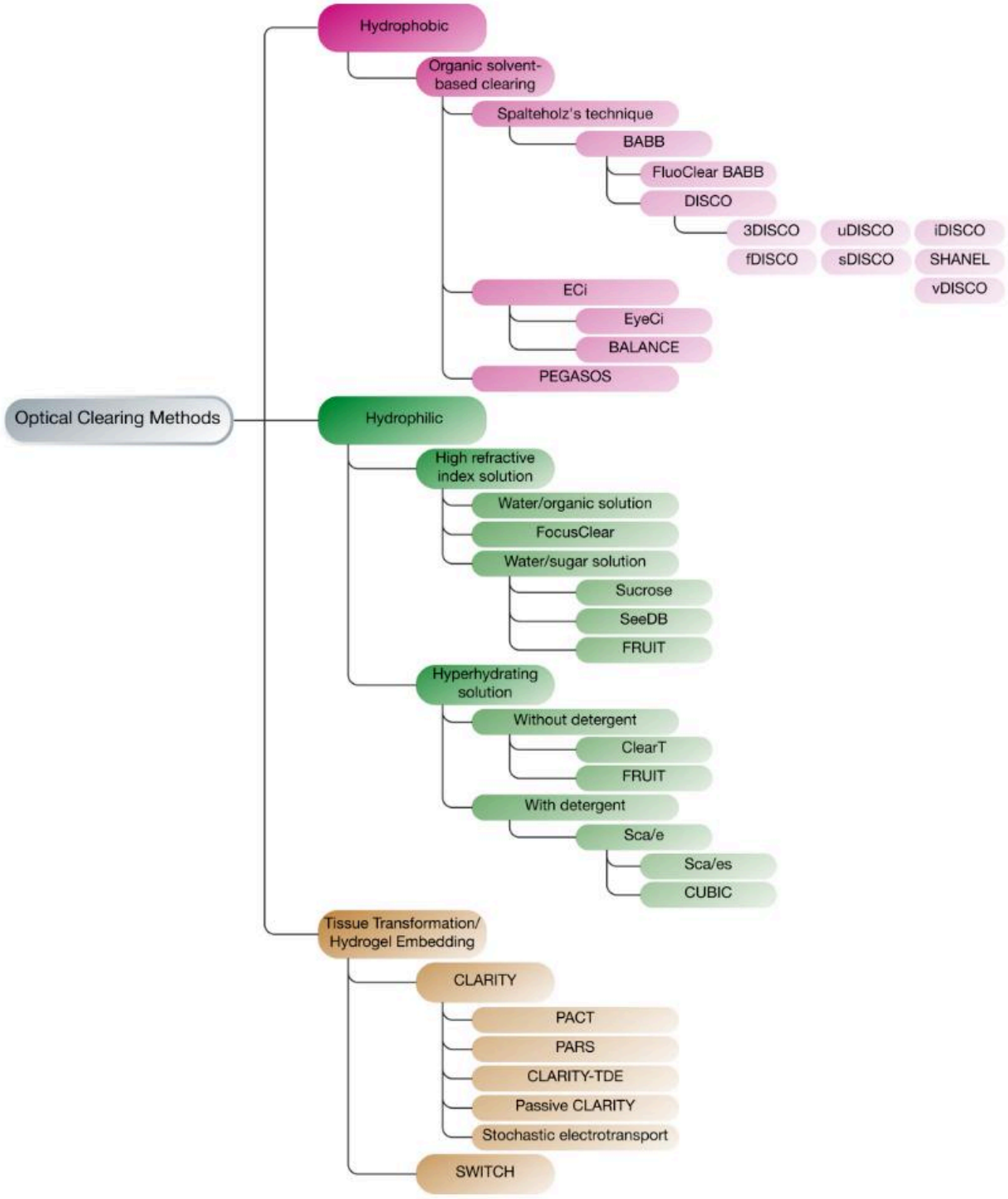


Figure 9: Grandes familles de méthodes de transparisation[15]

Les méthodes hydrophobes/ à solvants organiques dépigmentent, déshydratent, délipident et égalisent les indices de réfraction à celui des protéines (1.56). Elles sont adaptées pour les organes et les tissus denses. Les méthodes hydrophiles remplacent l'eau par des solutions à plus haut indice de réfraction (1.45), comme l'urée, les aminoalcools et les sucres. Elles sont bien adaptées pour les modèles de culture 3D. Les méthodes à base d'hydrogel stabilisent les structures tissulaires avant l'extraction des lipides (1.48).

- **Historique de la transparisation par solvants organiques :**

Historiquement, la première approche de transparisation a été développée au début du XXème siècle par l'anatomiste allemand Werner Spalteholz. Il a mis au point une technique d'immersion des organes dans un mélange de solvants dont l'indice de réfraction est proche de celui des protéines tissulaires. Cette approche a permis de rendre les organes quasi-transparents. L'une des démonstrations des plus impressionnantes fut la transparisation d'une main humaine. Cette prouesse permit pour la première fois de visualiser en 3D le réseau vasculaire sans avoir recours à la dissection classique. Elle est à ce jour conservée à *l'Institut d'Anatomie de l'Université de Leipzig* en Allemagne (**Figure 10**).

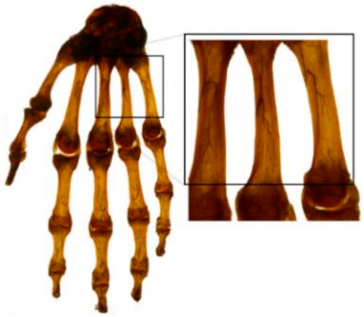


Figure 10: Main humaine transparisée par Spalteholz en 1911[15]

Injection d'encre de Chine dans l'artère de la main, décalcification et incubation en solvants organiques. Cette image montre les branchements artériels dans les métacarpes humains. Tous les autres échantillons préparés par Spalteholz ont été perdus lors des incendies de Leipzig durant la Seconde Guerre mondiale.

- **Principes physico-chimiques :**

La transparisation par solvants organiques repose sur 4 étapes principales : la dépigmentation, la déshydratation, la délipidation et l'immersion finale dans un milieu d'indice de réfraction élevé, proche de celui des protéines tissulaires (**Tableau 1**).

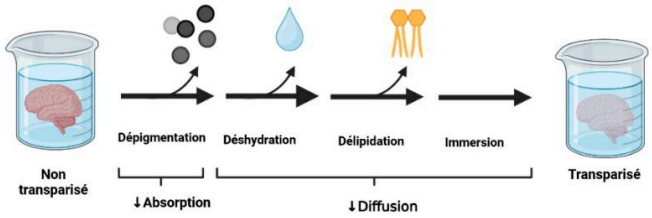


Figure 11: Etapes de la transparisation par solvants organiques

Créé sur Biorender

La **dépigmentation** vise à réduire l'absorption due aux pigments endogènes. Cette étape requiert l'utilisation d'agents oxydants et blanchissants comme le peroxyde d'hydrogène, l'acétone ou les bases fortes. Par exemple, le peroxyde d'hydrogène libère des radicaux hydroxyles qui fragmentent ou modifient chimiquement les cycles aromatiques des pigments, les transformant en composés incolores[16]. La **déshydratation** et la **délipidation** ont pour objectif de retirer les composants responsables de la diffusion de la lumière. L'eau est retirée dans des bains successifs d'alcools, et les lipides sont dissous dans des solvants organiques lipophiles comme le dichlorométhane. Enfin, le tissu est immergé dans un solvant organique comme le Dibenzyl ether (DBE), dont l'indice de réfraction avoisine celui des protéines (**Tableau 1**). Ce processus homogénéise optiquement l'échantillon et permet l'observation en profondeur des marquages endogènes ou immunomarquages des protéines[17].

- **<u>Protocoles et applications au système vasculaire :</u>**

Depuis les travaux pionniers de Spalteholz, les méthodes de transparisation par solvants organiques ont beaucoup évolué et se sont modernisées. Parmi ces techniques, les protocoles regroupés sous l'appellation DISCO (3DISCO, iDISCO, uDISCO, etc…), sont devenus des références incontournables pour l'imagerie 3D des tissus denses. L'optimisation de la nature des solvants et de leur temps d'incubation a permis de les rendre compatibles avec la fluorescence. C'est l'adaptation iDISCO, du français Nicolas Renier, qui a permis de visualiser en 3D des réseaux neuronaux par immunomarquages[18]. Initialement développés pour les neurosciences et l'étude des réseaux d'axones, ces protocoles ont largement été étendus, et tout particulièrement dans la biologie vasculaire (**Figure 12**)[18–23].

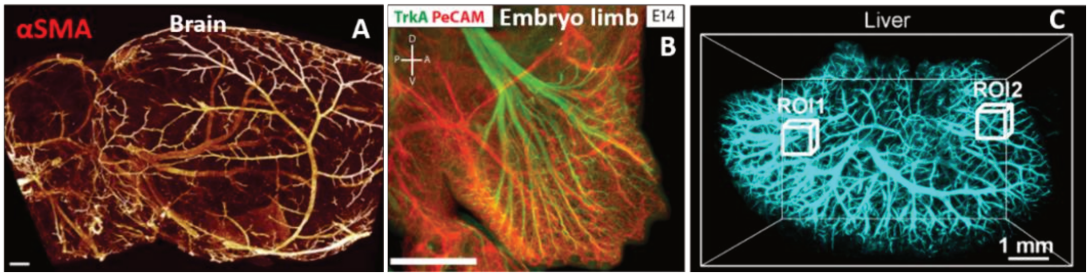


Figure 12: Exemple du réseau vasculaire d'organes de souris transparisés par solvants organiques

***A**)Marquage des cellules musculaires lisses (αSMA) d'un cerveau de souris[19]. **B**) Marquage des nerfs (TrkA, vert) et des vaisseaux (CD31, rouge) d'un membre en formation chez un embryon de souris[18]. **C**) Marquage de la vascularisation (CD31, cyan) d'un foie de souris[20].*

Dans leur globalité, les méthodes d'imagerie ont permis d'avancer significativement dans la compréhension du développement vasculaire notamment en cartographiant la formation et l'organisation fine des micro-vaisseaux dans divers tissus comme le cerveau, le foie ou l'épididyme[20,23–25]. Elles ont aussi offert de nouvelles perspectives dans l'étude des pathologies vasculaires en observant en 3D la morphologie des vaisseaux lors des lésions vasculaires, le remodelage vasculaire dans l'athérosclérose ou les altérations neurovasculaires dans les maladies neurodégénératives[26,27]. En combinant immunomarquage ciblé et clearing, ces protocoles ont ouvert la voie à des analyses fonctionnelles approfondies telles que le suivi de la perméabilité vasculaire, le recrutement immunitaire[28,29] ou encore l'évaluation de la distribution de particules thérapeutiques via la circulation sanguine[30].

- **Limitations :**

Malgré les avancées, ces approches présentent plusieurs limitations importantes. La plupart des protocoles, et particulièrement ceux des solvants organiques, reposent sur des produits toxiques ce qui rend leur manipulation délicate. Ensuite, l'imagerie de tissus entiers par microscopie confocale ou feuillet de lumière est longue et génère des volumes de données extrêmement lourds (plusieurs dizaines à centaine de giga-octets). Les étapes d'analyses sont aussi particulièrement chronophages et sont exigeantes en ressources informatiques.

Par ailleurs, tous les tissus ne se transparisent pas avec la même efficacité. Les tissus très pigmentés comme la peau restent encore relativement opaques. Les protocoles actuels retirent mécaniquement l'épiderme mais ceci peut altérer la structure tissulaire et compromettre l'étude des couches cutanées superficielles[31].

Ces contraintes montrent que malgré leur puissance, les méthodes de transparisation doivent encore évoluer pour être pleinement adaptées à une utilisation large et standardisée, particulièrement en recherche translationnelle et clinique.

2. MORPHOGENÈSE ET HOMÉOSTASIE VASCULAIRE

Comprendre comment le réseau vasculaire de l'HI se met en place, se transforme puis régresse suppose d'abord de s'intéresser aux mécanismes fondamentaux qui régissent la formation et la stabilité des vaisseaux. Pour interpréter ces changements, il est donc essentiel de rappeler les principes de morphogenèse et de l'homéostasie vasculaire, qui déterminent les grandes dynamiques de croissance et de maturation des vaisseaux.

La morphogenèse vasculaire englobe l'ensemble des mécanismes par lesquels les vaisseaux se forment et se structurent pour former un réseau fonctionnel et stable. La vasculogenèse initie la création des vaisseaux à partir des progéniteurs endothéliaux tandis que l'angiogenèse assure l'expansion et le remodelage du réseau existant (**Figure 13**). Ces processus dynamiques reposent sur des interactions complexes entre les EC, les cellules stromales et la MEC, permettant d'établir et de maintenir l'homéostasie vasculaire, essentielle au développement et au fonctionnement des tissus. Souvent actifs pendant le développement, ces mécanismes deviennent rares à l'âge adulte, à l'exception de quelques contextes physiologiques. Les EC demeurent en effet majoritairement dans un état quiescent. L'engagement ou non de l'endothélium dans la formation d'un nouveau vaisseau résulte d'une fine balance entre facteurs pro- et anti-angiogéniques. En situation d'homéostasie, un équilibre est maintenu, tandis qu'en cas de besoin angiogénique, les signaux pro-angiogéniques prennent le dessus, déclenchant la croissance et la structuration vasculaire.

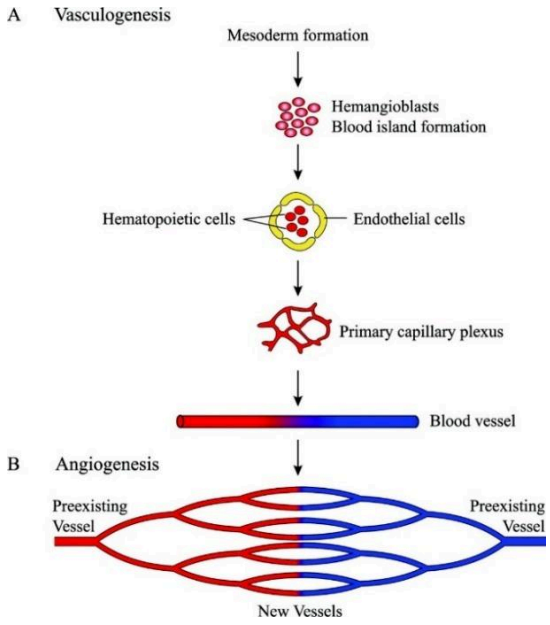


Figure 13: Processus de formation du réseau vasculaire[32]

La vasculogenèse est le premier processus à se mettre en place. Elle correspond à la différenciation progressive des hémangioblastes mésodermiques en cellules endothéliales. Ces dernières s'assemblent en plexus vasculaire primitif qui se réorganise et mature en vaisseaux. Le réseau s'étend et se complexifie secondairement par angiogenèse.

2.1. La vasculogenèse

La vasculogenèse est le processus de formation *de novo* de vaisseaux sanguins à partir de la différenciation des cellules mésodermiques. Elle a lieu principalement pendant la période embryonnaire dès la gastrulation (3ème semaine de développement chez l'Homme). Il s'agit d'un processus multi-étape.

Une partie des cellules mésodermiques se différencie en hémangioblastes, des cellules souches multipotentes. Elles se regroupent pour former les ilots sanguins (**Figure 14A-B**), qui fournissent les précurseurs des cellules hématopoïétiques, situés au centre de l'îlot et les angioblastes, précurseurs des cellules endothéliales, situés en périphérie (**Figure 14C**). Les angioblastes sont caractérisés par l'expression de marqueurs souches comme CD34 et des marqueurs endothéliaux comme CD31, VE-cadhérine, VEGFR1 et VEGFR2 [33].

Sous l'action du VEGF produit par l'endoderme, les angioblastes se regroupent et se différencient en EC qui s'agencent en cordes vasculaires (**Figure 14D**). Pour finir, ces structures pseudovasculaires maturent, forment une lumière interne et recrutent les cellules périvasculaires (**Figure 14E**).

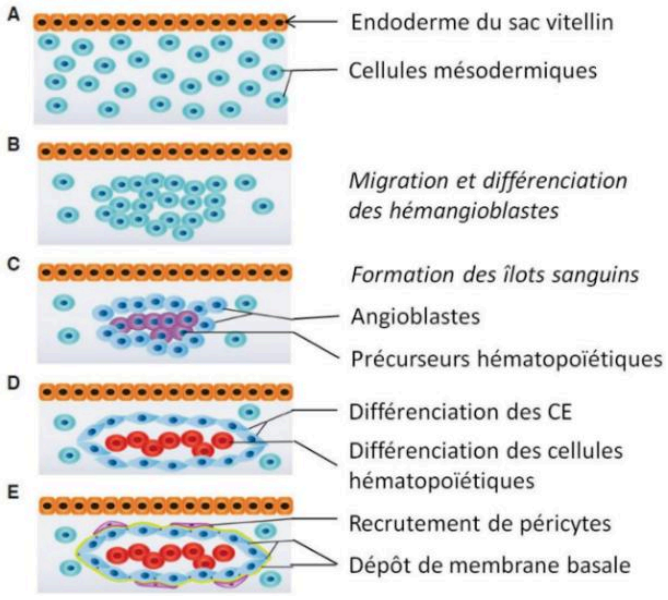


Figure 14: Les étapes de la vasculogenèse embryonnaire [33]

A)*À la suite de la gastrulation, le mésoderme se forme entre l'endoderme et l'ectoderme.* ***B)*** *Les cellules du mésoderme se différencient en hémangioblastes qui migrent pour former les îlots sanguins.* ***C)*** *Les cellules des îlots sanguins se différencient. Les cellules internes fournissent les cellules précurseurs hématopoïétiques et les cellules en périphéries les angioblastes.* ***D)*** *Les angioblastes se différencient en cellules endothéliales qui s'agencent en cordes vasculaires.* ***E)*** *Les cordes vasculaires maturent en s'anastomosant, formant des lumières internes et recrutant les cellules périvasculaires comme les péricytes.*

Plusieurs études ont mis en évidence l'existence, à l'âge adulte, d'un processus similaire impliquant des cellules apparentées aux angioblastes : les cellules progénitrices endothéliales (*Endothelial Progenitor Cells*, EPC) [34]. Ces cellules sont définies par l'expression de plusieurs marqueurs endothéliaux tels que VEGFR2, CD31, CD34 ou encore la VE-cadhérine [35–37]. Initialement résidentes de la moelle osseuse, les EPC peuvent être mobilisées dans la circulation sanguine, migrer vers le site lésé et s'y différencier en EC matures. Ce mécanisme de recrutement *de novo* participerait ainsi activement à la revascularisation et à la perfusion des tissus endommagés.

2.2. L'angiogenèse

L'angiogenèse est le processus de développement de l'arbre vasculaire à partir d'un réseau déjà existant. Elle repose sur l'expansion et le remodelage du réseau vasculaire. Elle débute immédiatement après la vasculogenèse. Chez l'Homme, elle commence surtout à partir de la 4ème semaine de développement embryonnaire. Elle se produit tout au long du développement de manière active, puis devient quiescente, à l'exception de quelques situations physiologiques bien définies.

2.2.1. L'angiogenèse par intussusception

L'angiogenèse par intussusception est l'un des deux mécanismes d'angiogenèse. Elle a été identifiée pour la première fois à la fin des années 1980 par *Caduff et al* dans l'endothélium pulmonaire [38]. C'est une forme rare mais rapide de l'angiogenèse qui implique la scission d'un vaisseau mère en deux vaisseaux fils (**Figure 15**). Elle intervient dans l'angiogenèse de la micro-vascularisation. Elle semblerait être initiée par des contraintes biomécaniques telles que les forces hémodynamiques perçues par les EC. Elle ne repose pas sur la prolifération intense des EC mais plutôt sur leur changement morphologique et leur migration.



Figure 15: Les étapes de l'angiogenèse par intussusception [39]

L'intussusception correspond à la division d'un capillaire par formation de piliers transluminaux, résultant de l'invagination et de la fusion des parois endothéliales opposées. Elle conduit à la séparation progressive de la lumière en deux vaisseaux distincts.

La division du vaisseau mère repose sur la formation de deux piliers transluminaux symétriques de part et d'autre de la paroi du capillaire. Sa formation débute par l'invagination de l'endothélium dans la lumière vasculaire des parois opposées. Le rapprochement progressif des deux murs endothéliaux est médié par le bourgeonnement intraluminal des EC jusqu'à leur rencontre et leur fusion[40,41]. Les complexes jonctionnels se réorganisent afin de séparer physiquement et progressivement les deux lumières en deux vaisseaux distincts. La maturation implique le recrutement et la différenciation des cellules murales de type péricytes ou cellules musculaires lisses pour stabiliser les nouvelles parois vasculaires.

2.2.2. L'angiogenèse par bourgeonnement

L'angiogenèse par bourgeonnement (dite « *sprouting* » en anglais) est un processus complexe et finement régulé, qui joue un rôle crucial dans le développement vasculaire, la morphogenèse, ou encore la cicatrisation. Ce mécanisme se déroule en cinq étapes distinctes, chacune orchestrée par une cascade de signaux moléculaires et cellulaires :

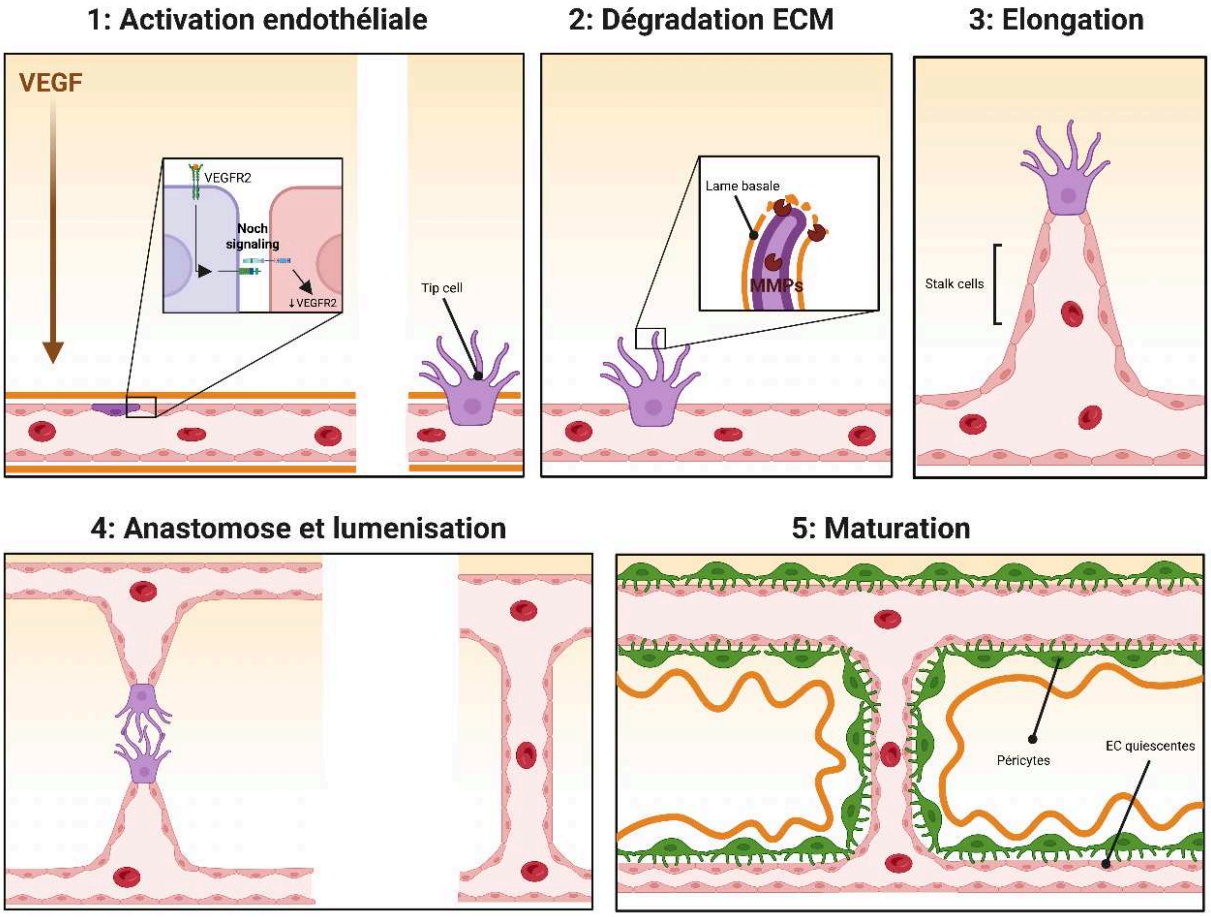


Figure 16: Etapes de l'angiogenèse par bourgeonnement

*(**1**)L'angiogenèse débute par l'activation des EC en réponse à un signal angiogénique, tel que l'hypoxie, induisant la production de VEGF. Les EC se spécialisent en tip cells et stalk cells, sous le contrôle des voies VEGF et Notch. (**2**) Les tip cells dégradent la lame basale et la MEC, facilitant leur migration. (**3**) L'élongation du bourgeon vasculaire résulte de la coordination entre la migration directionnelle des tip cell suivant le gradient de VEGF et la prolifération synchronisée des stalk cells. (**4**) La progression de deux tip cells issues de bourgeons opposés conduit à leur rencontre, anastomose et lumenisation, formant un nouveau segment vasculaire. (**5**) Les EC recrutent des cellules murales (péricytes, cellules musculaires lisses), dont les interactions stabilisent les parois, induisent la synthèse de la lame basale et assurent la quiescence endothéliale. Créé sur Biorender.*

- **Étape 1** : l'activation et la sélection endothéliale (**Figure 16.1**)

Bien que plus de 99% des EC soient quiescentes, elles restent extrêmement sensibles aux signaux pro- et anti-angiogéniques de leur environnement, dont l'équilibre détermine leur destin[42]. L'activation et la sélection des EC sont initiées par la perception de facteurs pro-angiogéniques tels que les VEGF, préalablement libérés en réponse à un stimulus hypoxique ou inflammatoire[43]. Lors de cette activation, les EC perdent transitoirement leurs jonctions inter-endothéliales, ce qui leur confère une plus grande plasticité[44]. Elles acquièrent transitoirement deux propriétés : la prolifération ou la migration. Ces deux

comportements les distinguent en deux phénotypes. Le premier phénotype est constitué des cellules de front, dites « *tip cells* ».[45] Ces cellules, uniques et situées à l'extrémité de chaque bourgeon endothélial (**Figure 17A**) sont caractérisées par une forte expression de VEGFR2, DLL4, PDGFRβ ou CD34[45–47]. Elles ne prolifèrent pas mais ont une activité migratoire accrue, et présentent un réseau de filopodes dense (**Figure 17B**). Le second phénotype est constitué des cellules de soutien, dites « *stalk cells* », situées à l'arrière des *tip cells* (**Figure 17A**). Elles sont caractérisées par la présence de marqueurs de prolifération tels que Ki67 ou les phospho-histones, ainsi que le VEGFR1 ou Notch1 (**Figure 17C**). Elles ne migrent pas mais prolifèrent[45].

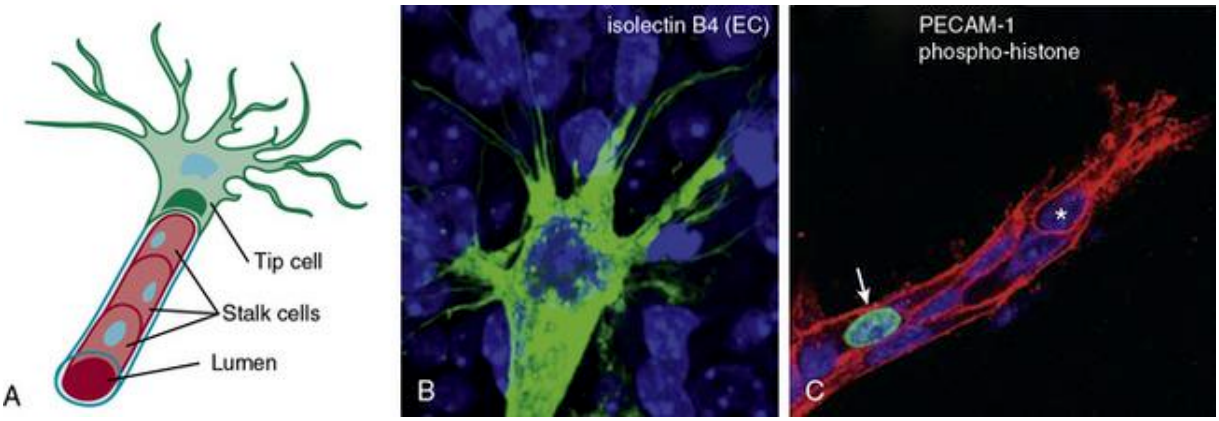


Figure 17: Les cellules endothéliales de front (tip) ou de soutien (stalk)[45]

A) *Schématisation des deux phénotypes d'EC. La cellule de front (tip cell) est en vert à l'extrémité du bourgeon. Les cellules de soutien (stalk cells) en rouge sont à l'arrière de la tip cell.* ***B)*** *Immunofluorescence d'une tip cell et de son réseau de filopodes par marquage à l'Isolectine B4 (vert) sur rétine de souris. Les noyaux sont en bleu (DAPI)* ***C)*** *Immunofluorescence des EC par CD31/PECAM-1 (rouge). La flèche blanche montre une cellule en division, positive pour le marquage phospho-histone (vert). L'étoile montre le noyau d'une tip cell. Les autres EC sont les stalk cells.*

- **Étape 2** : la dégradation de la matrice (**Figure 16.2**)

À la suite de leur activation et en réponse aux facteurs pro-angiogéniques, les *tip cells* sécrètent des métalloprotéinases matricielles (MMP), responsables de la dégradation de la MEC. Cette étape est essentielle pour la migration et la prolifération des EC. Parmi elles, MMP-2 et MMP-9 participent activement à la dégradation locale de la lame basale[48]. MMP-14, une protéase membranaire participe plutôt à la dégradation focale des fibres de collagène de type I pour favoriser la progression des *tip cells* dans le tissu conjonctif avoisinant[49].

- **<u>Étape 3</u>** : l'élongation et le guidage cellulaire (**Figure 16.3**)

L'étape d'élongation du bourgeon endothélial implique une coordination précise entre les *tip* et *stalk cells*, chacune jouant un rôle distinct mais complémentaire. Les *tip cells* détectent les gradients de VEGF grâce à leurs longs filopodes riches en VEGFR2[45]. Aussi enrichis en molécules d'adhérence telles que les intégrines, ces protrusions membranaires participent à l'établissement d'adhérences focales transitoires pour générer des forces de traction nécessaires à la migration[50,51].

Les *stalk cells* jouent quant à elles un rôle crucial dans l'allongement du bourgeon, en réponse à la concentration de VEGF [45]. Elles prolifèrent activement pour allonger le néovaisseau.

- **<u>Étape 4</u>** : l'anastomose et la formation de la lumière (**Figure 16.4**)

Sous l'action coordonnée de la prolifération des *stalk cells* et de la guidance des *tip cells*, le bourgeon endothélial s'allonge et progresse dans la MEC. Lorsque les filopodes de deux tip cells opposées se rencontrent, ils fusionnent pour former une connexion vasculaire. Les macrophages jouent un rôle de chaperons, guidant et soutenant les *tip cells* jusqu'à leur point de contact. En leur absence, l'anastomose est altérée et le réseau devient fragmenté. La rencontre des *tip cells* met fin à leur migration et initie la stabilisation vasculaire [52].

La formation de la lumière vasculaire, ou *lumenisation*, reste encore un processus mal élucidé. Trois mécanismes ont été proposés : la fusion de vacuoles intra-cellulaires formant une lumière transcellulaire (**Figure 18**), la répulsion électrostatique entre les surfaces apicales des EC créant un espace transluminal et l'enroulement d'une cellule unique sur elle-même pour former un tube creux [53].

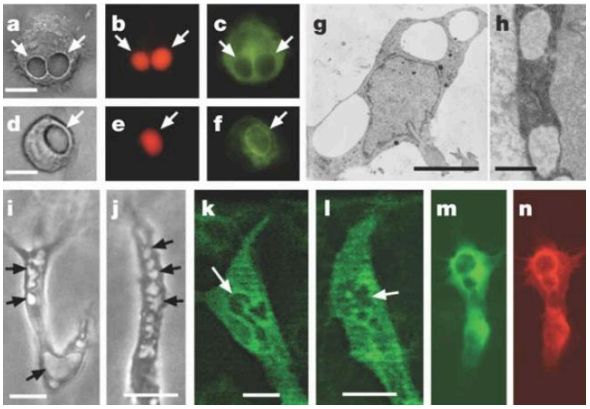


Figure 18: Lumenisation par fusion de vacuoles[53]

A-f ; i-j) *Vacuoles dans des HUVEC cultivées en hydrogel de collagène.* ***G-h)*** *Microscopie électronique à transmission de l'aorte d'un poisson zèbre en développement* ***k-n)*** *Microscopie bi-photons de l'aorte d'un poisson zèbre*

- **Étape 5** : la maturation vasculaire (**Figure 16.5**)

L'étape de lumenisation aboutit à la formation d'un canal continu permettant la perfusion des vaisseaux. L'apport du flux sanguin participe à la réoxygénation des tissus. Par conséquent, l'hypoxie diminue, réduisant drastiquement la concentration environnementale en VEGF, ce qui conduit progressivement les EC en quiescence.
Afin d'être fonctionnels, les néovaisseaux doivent subir une phase de maturation qui fait intervenir la synthèse de la lame basale, la reformation des jonctions inter-endothéliales et le recrutement des péricytes.

Les péricytes sont des cellules périvasculaires localisées à la surface externe des capillaires (**Figure 19**). Leur recrutement repose principalement sur l'activation de la voie PDGF-B-PDGFR-β. Les EC sécrètent le *Platelet-Derived Growth Factor B* (PDGF-B), qui agit comme un signal chimiotactique et mitogène pour les péricytes qui expriment PDGFR-β[54]. L'importance de cette signalisation est démontrée par les phénotypes vasculaires observés chez les souris knock-out pour PDGF-B ou PDGFR-β, qui présentent de sévères hémorragies, des anévrismes ainsi que des anomalies de structure vasculaire, en lien avec une couverture péricytaire déficiente[55,56]. Une fois recrutés, les péricytes s'enroulent autour du tube endothélial et établissent des contacts étroits avec les EC. Ces interactions peuvent être directes via des contacts composés d'homodimères de N-Cadhérine qui assurent l'ancrage physique entre les deux types cellulaires[57]. D'autres interactions sont indirectes, médiées par les intégrines qui relient les péricytes et les EC à leur MEC commune [58].

La couverture péricytaire contribue à la stabilisation des néovaisseaux, en renforçant la barrière endothéliale. Ils diminuent la perméabilité vasculaire en consolidant les jonctions inter-endothéliales et favorisent le maintien des EC en quiescence. Ces fonctions stabilisatrices dépendent notamment de l'activation des voies Notch et Angiopoïétines-1/Tie2 [57,59].

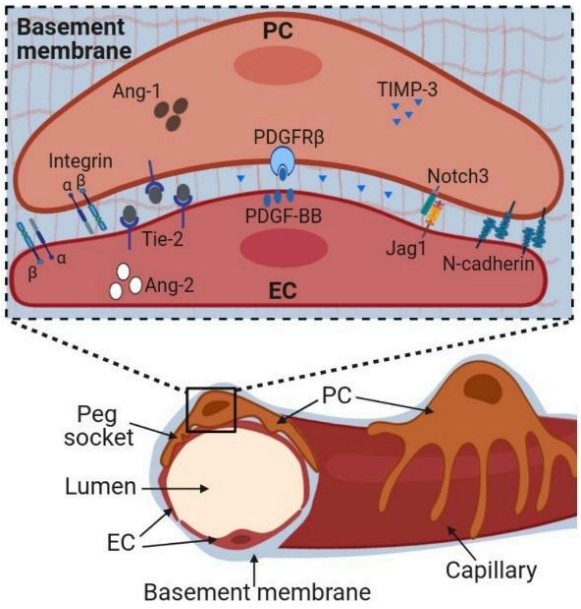


Figure 19: Interactions entre les cellules endothéliales et les péricytes[57]

Les EC sécrètent du PDGF-BB, qui agit comme chimioattractant pour les péricytes qui expriment PDGFR-β. L'interaction des deux types cellulaires est stabilisée par des molécules d'adhérence. Les péricytes stabilisent les EC via les voies Notch et angiopoiétines.

2.3. La régression vasculaire

Dans le cadre de ce travail, l'intérêt porté à la morphogenèse vasculaire réside particulièrement dans la compréhension de la phase de régression de l'HI. La régression vasculaire est un processus essentiel de l'angiogenèse physiologique, qui consiste en l'élimination sélective des vaisseaux sanguins surnuméraires ou inefficaces. Deux modes de régression sont à ce jour recensés : le pruning ou l'involution.

2.3.1. Le pruning

Le « *pruning* » ou l'élagage vasculaire est un mode de régression au cours duquel les cellules vasculaires des vaisseaux à éliminer sont recyclées et redistribuées au sein des vaisseaux conformes. Ce processus n'inclut pas de fortes vagues d'apoptose. Il correspond plutôt à un mécanisme de remodelage fin de certaines portions vasculaires. Le *pruning* intervient dans plusieurs contextes physiologiques notamment lors du développement rétinien. Chez de nombreux mammifères, la vascularisation de la rétine se forme après la naissance : un réseau dense et immature est d'abord établi, puis remodelé par élimination des capillaires excédentaires afin de constituer un réseau stable et fonctionnel [60,61]. Ce processus, crucial pour une bonne oxygénation sans perturber la vision, est

altéré dans certaines pathologies oculaires comme la rétinopathie du prématuré [62,63]. C. Franco a étudié les mécanismes cellulaires de *pruning* dans la rétine de souris[64]. Plus tard, ce processus a été confirmé chez le poisson zèbre par Lenard el al., et il se déroulerait en quatre étapes [65] :

- **Étape 1 -** Sélection de la branche vasculaire à éliminer : qui est généralement peu perfusée (**Figure 20A**). Elle serait guidée par des signaux biomécaniques comme les forces hémodynamiques et chimiques tels que les gradients de VEGF, Notch, TNF-α ou IL-1β.
- **Étape 2 -** Sténose de la lumière : qui réduit progressivement le diamètre du vaisseau sanguin. Elle implique la réorganisation du cytosquelette et des jonctions des EC entrainant l'obstruction progressive du vaisseau (**Figure 20B-C**).
- **Étape 3** - Rétraction des EC : elles migrent latéralement hors du segment en régression et se recyclent dans les branches adjacentes toujours perfusées (**Figure 20D**).
- **Étape 4** - Résolution : elle est marquée par la disparition complète de la branche, parfois accompagnée de la résorption de la MEC et du nettoyage des débris par les macrophages (**Figure 20E**).

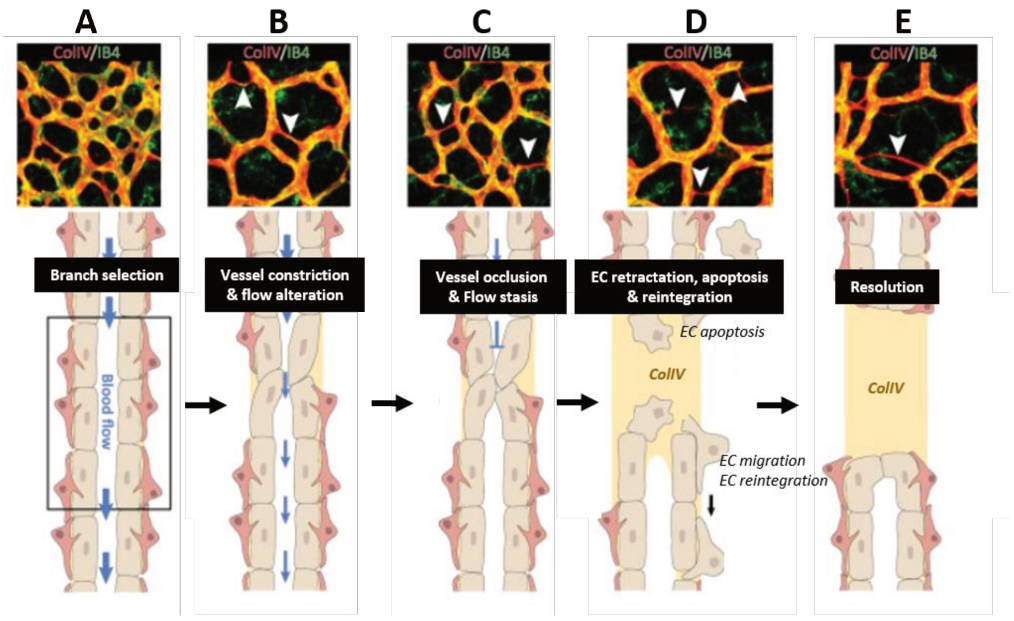


Figure 20: Mécanismes cellulaire du pruning vasculaire[66]

A)*Sélection de la branche vasculaire qui va régresser* ***B-C)*** *Sténose de la lumière. Une EC se déforme pour migrer dans la lumière vasculaire ce qui altère puis bloque le flux sanguin.* ***D)*** *Les EC du vaisseau migrent pour mourir par apoptose ou se réintégrer dans d'autres vaisseaux. ColIV (rouge) marque la lame basale, l'isolectine B4 dit IB4 (vert) marque les EC.*

2.3.2. L'involution

Contrairement au pruning, l'involution fait intervenir de l'apoptose massive afin de détruire de grosses portions du réseau vasculaire[67]. Elle intervient dans des processus physiologiques pendant le développement. Par exemple, elle participe à la suppression totale de l'artère hyaloïde et de son réseau de capillaire présent pendant le développement fœtal. Ce réseau traverse le corps vitré de l'œil pour fournir les nutriments au cristallin en développement. Une fois formé, l'involution assure la transparence du corps vitré, essentielle pour que la lumière atteigne la rétine[68–70]. Après la naissance, elle intervient aussi dans le cycle menstruel au niveau du *corpus luteum* des ovaires[71], ou pendant la lactation au niveau de la glande mammaire[72]. L'involution s'organise en deux étapes :

- **Étape 1 -** Sténose de la lumière : le rétrécissement de la lumière est initié par l'apoptose localisée des EC[73]. Ce processus est notamment contrôlé par la sécrétion de Wnt-7b par les macrophages résidents qui réduit l'inhibition d'Akt et la sécrétion de VEGF-A[74].
- **Étape 2** - Apoptose endothéliale : l'arrêt de la circulation sanguine imposé par la sténose induit l'apoptose synchrone des EC. Les macrophages phagocytent les débris cellulaires[75].

2.4. Les voies moléculaires pro-angiogéniques

L'engagement des EC dans le processus d'angiogenèse résulte d'un déséquilibre en faveur des facteurs pro-angiogéniques. Parmi ces facteurs les voies du VEGF, et FGF sont centrales dans l'élaboration et dans la régulation de ce processus multi-étape.

2.4.1. La voie des VEGF

La voie de signalisation du VEGF est un régulateur fondamental de l'angiogenèse des vaisseaux sanguins ou lymphatiques. Chez les mammifères, la famille des ligands VEGF comprend 5 glycoprotéines structurellement proches : le VEGF-A (souvent désigné simplement comme VEGF), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D et le Placental Growth Factor (PlGF). Sécrétés sous forme dimérique, ces facteurs interagissent de manière spécifique avec trois récepteurs tyrosine kinase :
VEGFR-1 (Flt1), VEGFR-2 (KDR ou Flk-1) et le VEGFR-3 (Flt-4), majoritairement exprimés à la surface des EC (**Figure 21**)[76]. En complément, certains ligands utilisent des corécepteurs tels que les neuropilines (NRP-1 et NRP-2), modulant la force et la spécificité des signaux transmis [75,77].

Bien que VEGFR-1 se lie au VEGF-A avec la plus forte affinité, son rôle dans l'angiogenèse est complexe, agissant parfois comme un récepteur leurre. Il lie les ligands sans transduire de signal, limitant leur biodisponibilité aux autres VEGFR. C'est le VEGFR-2 qui est connu comme le principal médiateur des réponses angiogéniques médié par le VEGF-A. Quant au VEGFR-3, son expression est principalement restreinte aux EC des vaisseaux lymphatiques, où il relaie les signaux du VEGF-C et du VEGF-D pour initier la lymphangiogenèse [78].

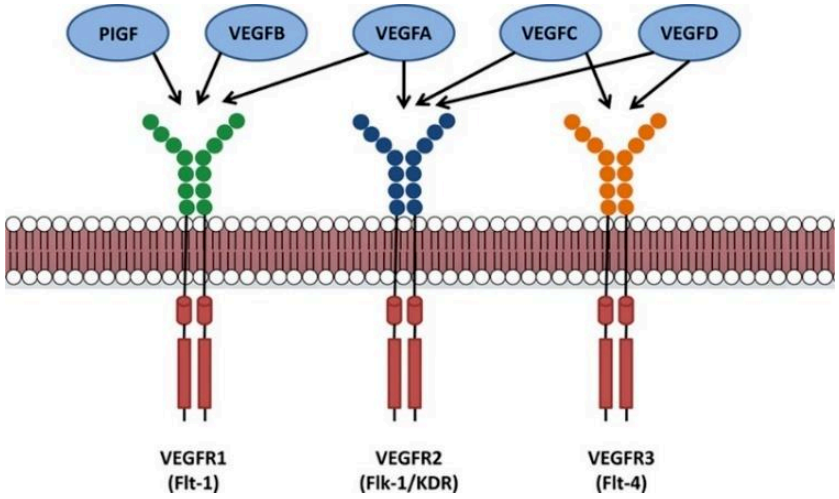


Figure 21: Les récepteurs et ligands de la voie des VEGF[79]

Dans le processus d'angiogenèse, l'axe VEGF-A/ VEGFR-2 joue un rôle central en activant plusieurs voies de signalisation intracellulaires. Le VEGF-A a été initialement identifié dans les années 1980 par Senger et al., sous le nom de *Vascular Permeability Factor* (VFP), en raison de son effet sur l'augmentation de la perméabilité vasculaire[80]. Il a rapidement été reconnu aussi comme régulateur majeur de la prolifération, de la survie et de la migration des EC par l'équipe de Napoleone Ferrara [81].

Dans un organisme, l'apport en oxygène et en nutriments est essentiel pour le maintien des fonctions cellulaires. En cas d'insuffisance du réseau vasculaire, une hypoxie tissulaire s'installe, ce qui constitue un puissant signal inducteur de l'expression et de la sécrétion du VEGF-A. En effet, le promoteur du gène *VEGFA* contient un élément de réponse à l'hypoxie (HRE), reconnu par le facteur HIF (*Hypoxia Inducible Factor*), qui active sa transcription[82]. La fixation du VEGF-A sur VEGFR-2, induit la dimérisation du récepteur et l'autophosphorylation de ses résidus tyrosine intracellulaires. Cela déclenche une cascade de signalisation intracellulaire complexe et finement coordonnée. Parmi les voies activées, la signalisation via PLCγ et MAPK favorise la prolifération des EC, tandis que la voie PI3K/Akt soutient leur survie. Par ailleurs, le VEGF-A active la kinase Src, qui joue un rôle central dans le remodelage des jonctions intercellulaires (**Figure 22**). En phosphorylant la VE-Cadhérine, Src induit son endocytose

entraînant une augmentation de la perméabilité vasculaire[83]. En parallèle, Src participe à la formation des adhérences focales et à l'activation de la *Focal Adhesion Kinase* (FAK), facilitant la migration des EC au cours du bourgeonnement vasculaire[84,85].

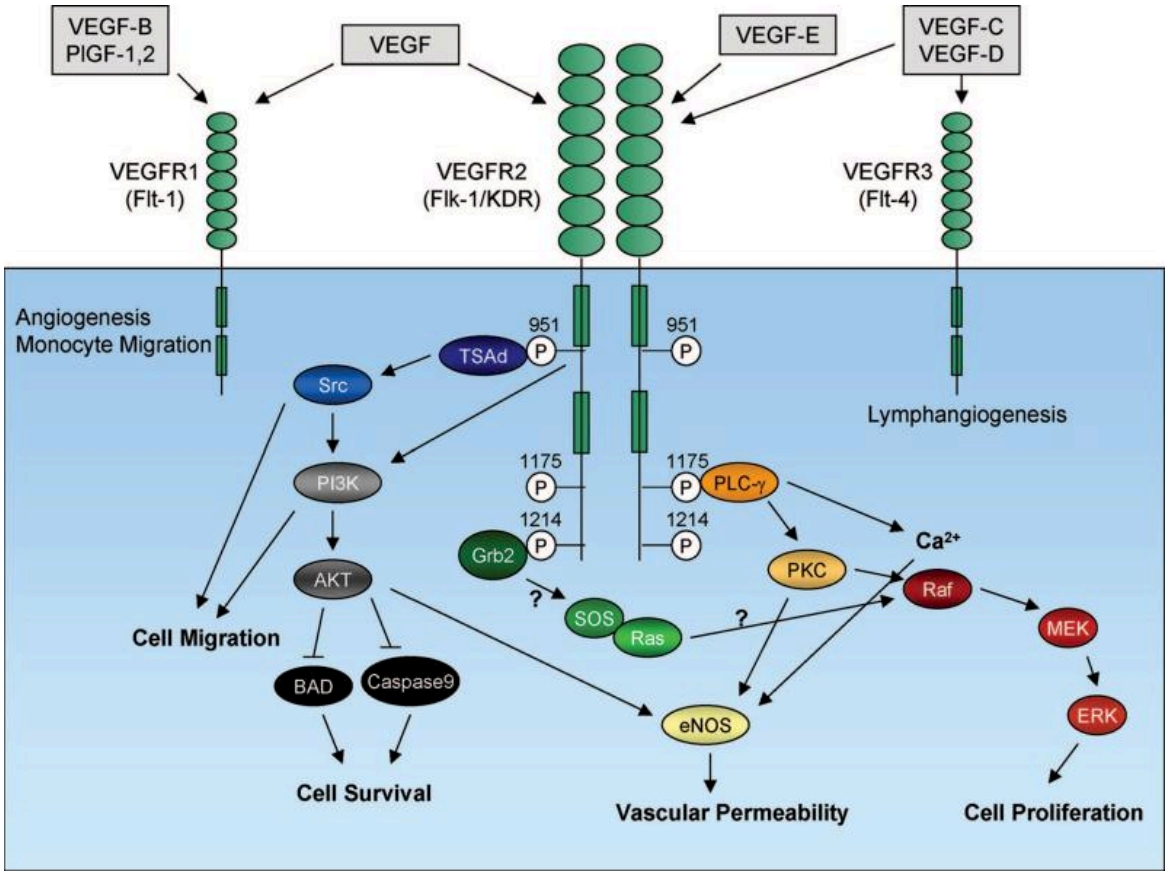


Figure 22: Voie de signalisation du VEGF[86]

La voie canonique médiée par l'axe VEGF-A/VEGFR-2 participe à la survie cellulaire via PI3K/Akt, la perméabilité vasculaire via eNOS et Src ainsi que la prolifération endothéliale via MAPK/ERK.

2.4.2. La voie des FGF

La voie des FGF joue un rôle central dans l'angiogenèse, en particulier lors du développement vasculaire ou la régénération tissulaire[87,88]. La famille des ligands FGF comprend 22 membres chez les vertébrés, nommés de FGF-1 à FGF-23. Chaque ligand possède un domaine central conservé de 120 acides aminés. De précédentes études phylogéniques suggèrent qu'ils se répartissent en 3 groupes (**Figure 23**) : les FGF canoniques, les FGF endocrines et les FGF intracellulaires[88].

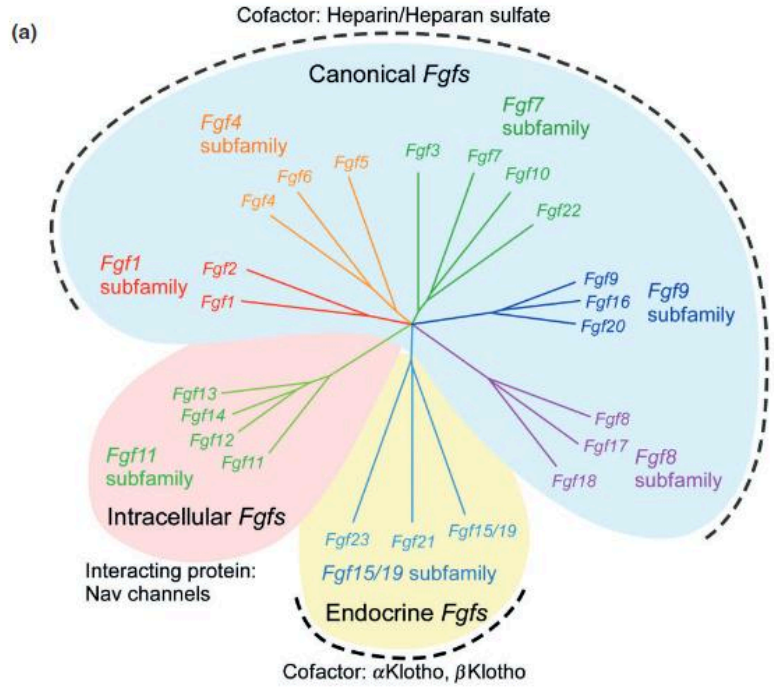


Figure 23: Classification des ligands FGF [89]

Les FGF se répartissent en trois familles. Les FGF canoniques sont composés de 15 membres qui se lient aux FGFR et aux héparanes sulfate protéoglycanes et transduisent des signaux pro-angiogéniques. Ils agissent localement. Les FGF endocrines, composés de 3 membres agissent à distance via les FGFR. Ils ont une faible affinité pour les héparanes sulfates protéoglycanes afin de rentrer dans la circulation sanguine. Les FGF intracellulaires, comprenant 4 membres ne sont pas sécrétés.

- **<u>Nature et signalisation des FGF canoniques :</u>**

Les FGF canoniques sont des protéines sécrétées à activité paracrine. Parmi eux, FGF-1 (ou FGF acide, aFGF) et FGF-2 (ou FGF basique, bFGF) sont les plus étudiés pour leurs effets pro-angiogéniques directs. Les FGF canoniques exercent leur activité grâce à leur liaison sur les FGFR, notés de FGFR-1 à FGFR-4. Ces récepteurs sont constitués d'un domaine intracellulaire à activité tyrosine kinase, d'une portion transmembranaire ainsi que d'une région extracellulaire composée de trois domaines immunoglobulin-like conférant leur spécificité pour leur ligand[90].

C'est surtout FGFR-1 qui est décrit dans les contextes d'angiogenèse. L'interaction avec un ligand induit la dimérisation et l'autophosphorylation successive de six résidus tyrosine du FGFR, ce qui permet le recrutement et la phosphorylation de la protéine adaptatrice FRS2 et l'activation des voies de signalisation sous-jacentes. La voie la plus directement associée à l'angiogenèse médiée par le FGF est la voie MAPK/ERK, via l'activation successive de Grb2, Sos, puis RAS-RAF-MEK-ERK. Elle contrôle l'entrée en cycle cellulaire et la prolifération[91]. Parallèlement, la voie PI3K/Akt est également activée,

promouvant la survie cellulaire en inhibant la protéine pro-apoptotique Bad. La PLCγ est également mobilisée, conduisant à l'activation d'IP3 (inositol tri-phosphate) et de DAG (diacyl glycérol). Ceci conduit à une augmentation de calcium intracellulaire et à l'activation de la PKC (protéine kinase C), activant la migration et la différenciation cellulaire (**Figure 24**). Contrairement au VEGF-A, qui induit une forte augmentation de la perméabilité vasculaire, le FGF apparaît de plus en plus comme un stabilisateur de la barrière endothéliale[92]. Des études récentes ont montré que le FGF-2 ne désorganise pas les jonctions d'adhérence, mais au contraire favorise la stabilisation de la VE-Cadhérine à la membrane plasmique. Ce phénomène semblerait associé à l'activation des voies PI3K/Akt et Rac1, qui favorisent la stabilité du cytosquelette d'actine cortical de manière à soutenir les contacts cellules-cellules[90].

Aussi, le FGF-2 peut induire l'expression d'autres facteurs pro-angiogéniques, tel que le VEGF-A, et le VEGFR-2 et participe au remodelage de la MEC, ce qui renforce son impact dans l'angiogenèse[93].

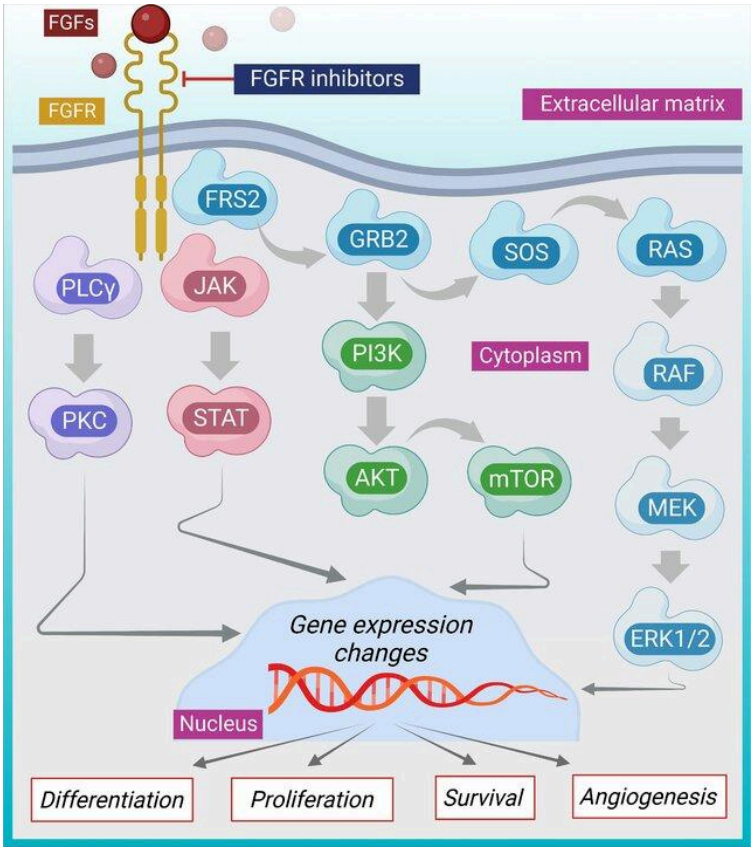


Figure 24: Signalisation des FGF canoniques[94]

La voie canonique de l'axe FGF-2/FGFR-1 favorise la survie cellulaire via PI3K/Akt, la prolifération endothéliale via MAPK/ERK et la stabilité endothéliale.

Une caractéristique majeure des FGF canoniques réside dans leur forte affinité pour les protéoglycanes à héparane sulfate (HSPG). Ils sont constitués d'un cœur protéique associé à des chaînes glycosaminoglycanes sulfatés. Ils se localisent dans la MEC ou à la surface cellulaire. La structure fine de leurs chaînes détermine leur capacité à interagir avec les différents membres de la famille des FGF. Le FGF-2 présente une affinité particulièrement élevée pour les HSPG matriciels, ce qui entraîne sa séquestration dans la MEC. Sa libération nécessite un remodelage matriciel local.
Outre leur rôle de réservoir, les HSPG transmembranaires stabilisent les FGF et facilitent leur présentation aux FGFR, tout en modulant l'intensité, la durée et la distribution spatiale du signal [95].

- **Les FGF endocrines :**

Les FGF endocrines, comme FGF-19, FGF-21 ou FGF-23, font référence aux FGF sécrétés dans la circulation sanguine. À l'inverse des FGF canoniques, ils présentent une très faible affinité pour les HSPG car ils ne possèdent pas la région riche en glycine, qui est nécessaire à cette interaction. Ainsi, après sécrétion, ils ne sont pas retenus dans la MEC et peuvent facilement rejoindre la circulation systémique pour agir à distance[90]. Leur signalisation est médiée par les FGFR. Ils interviennent dans la régulation du métabolisme. Leur rôle dans l'angiogenèse est peu caractérisé mais des effets indirects sur le métabolisme et l'inflammation vasculaire ont été décrits, notamment FGF-21 dans des contextes métaboliques pathologiques comme le diabète de type 2[96].

- **Les FGF intracellulaires :**

Les FGF intracellulaires incluent le FGF-11, FGF-12, FGF-13 et FGF-14. Contrairement aux autres familles, ils ne sont pas sécrétés dans la MEC et n'agissent pas via les FGFR. Ils exercent leurs fonctions exclusivement dans le cytoplasme et le noyau. Ils sont particulièrement exprimés dans le système nerveux, où ils modulent des processus tels que la plasticité neuronale ou la signalisation calcique. Par exemple, FGF-13 favorise la régénération des nerfs périphériques en stabilisant le réseau de microtubules[97]. Aucun rôle n'a été démontré dans l'angiogenèse.

2.4.3. La voie des IGF

Les *Insulin-like Growth Factors* (IGF) constituent une famille de peptides apparentés à l'insuline, comprenant l'IGF-1 et l'IGF-2, avec laquelle ils partagent environ 50% d'homologie de séquence. Ils possèdent une fonction centrale dans la régulation de la croissance, la survie et la différenciation cellulaire[98].

L'IGF-1 est un polypeptide synthétisé sous forme de précurseur comprenant le peptide signal et un domaine mature de 70 acides aminés. L'expression d'IGF-1 débute précocement au cours du développement et est maintenue après la naissance. Sa synthèse est majoritairement assurée par le foie en réponse à l'hormone de croissance, mais il peut aussi être synthétisé localement par de nombreuses cellules comme les fibroblastes, les kératinocytes ou les EC. Dans la peau, il contribue à la prolifération et à la migration des kératinocytes ainsi qu'à la synthèse de MEC par les fibroblastes, ce qui en fait un médiateur important dans la cicatrisation. Dans le compartiment vasculaire, il stimule directement la survie, la migration et la prolifération des EC.

L'IGF-2 est un polypeptide de 67 acides aminés qui présente une organisation structurelle similaire à celle de l'IGF-1. Contrairement à l'IGF-1 qui est fortement produit après la naissance, l'IGF-2 joue un rôle essentiel presque exclusivement durant le développement embryonnaire et fœtal. Son expression se maintient néanmoins, à faible niveau, dans certains organes adultes comme le cerveau où il participe à la régulation métabolique et à la neurogenèse.

Les effets biologiques des IGF sont principalement médiés par le récepteur de type 1 de l'IGF (IGF1R), une glycoprotéine transmembranaire de la famille des récepteurs à activité tyrosine kinase. L'IGF1R est un hétérotétramère composé de deux sous-unités α extracellulaires, qui assurent la fixation des ligands et de deux sous-unités β, qui traversent la membrane plasmique et portent l'activité kinase intracellulaire. La liaison d'IGF-1 ou d'IGF-2 à IGF1R induit un changement conformationnel qui favorise l'autophosphorylation des résidus tyrosine intracellulaires, initiant l'activation de cascades de signalisation majeures comme PI3K/Akt/mTOR et RAS/RAF/MEK/ERK. Ces voies contrôlent la prolifération, la survie, la migration et la différenciation cellulaire, notamment des EC. Parallèlement, l'IGF-2 peut également interagir avec l'isoforme A du récepteur à l'insuline (INSR-A) qui est principalement exprimé au cours du développement fœtal. L'activation d'INSR-A par IGF-2 induit des signaux pro-prolifératifs et pro-angiogéniques. Enfin, l'IGF2R se distingue par l'absence d'une activité kinase. Il agit principalement comme un récepteur leurre, en internalisant et dégradant l'IGF-2, ce qui limite son interaction avec IGF1R et INSR-A (**Figure 25**)[99].

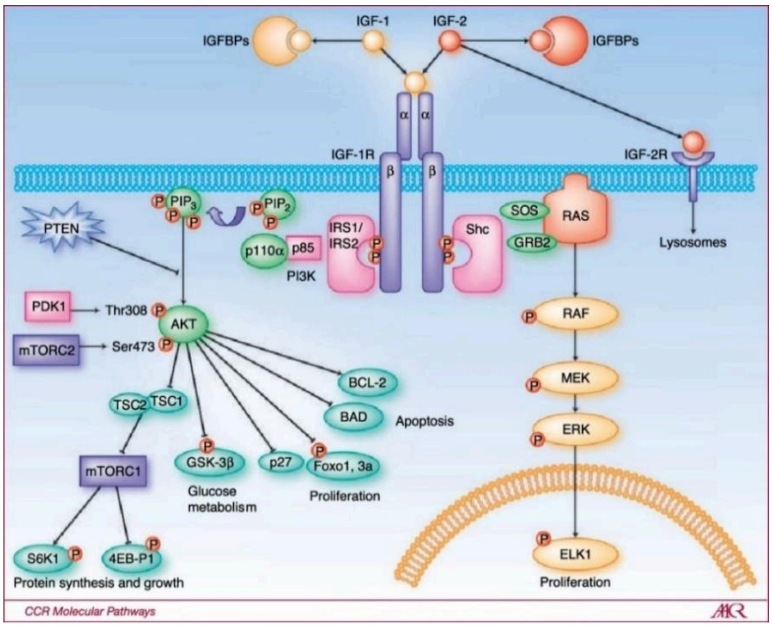


Figure 25: Signalisation des IGFs et de leurs récepteurs[100]

La liaison des IGF sur IGF1R induit un changement conformationnel favorable à la transphosphorylation des résidus tyrosines intracellulaires critiques. Les tyrosines phosphorylées sont le site de recrutement de protéines adaptatrices (IRS1, IRS2, Shc). Elles activent la voie des MAPK impliquée dans la prolifération cellulaire, ainsi que la voie PI3K/Akt/mTOR impliquée dans la croissance cellulaire, la prolifération, la survie et la régulation du métabolisme. La liaison d'IGF-2 sur IGF2R induit l'internalisation du récepteur, ainsi que sa dégradation par les lysosomes.

L'activité des IGF est finement contrôlée par une famille de six protéines de liaison, les *Insulin-like Growth Factor Binding Proteins* (IGFBP-1 à IGFBP-6), qui régulent leur transport, leur stabilité et leur distribution[101].

Dans la circulation, plus de 95% des IGF sont associés aux IGFBP, ce qui prolonge leur demi-vie plasmatique de 10 minutes pour un IGF libre à près de 90 minutes lorsqu'ils sont complexés[102]. Dans le plasma, l'association d'IGFBP-3 et de l'*Acid Labile Unit* (ALS) avec un IGF génère un complexe de grande taille qui ne franchit pas l'endothélium et limite les IGF à la circulation sanguine. Ce système assure une distribution systémique et un rôle principalement endocrine. À l'inverse, les complexes binaires formés par un IGF et un IGFBP-3 (sans ALS) sont plus petits et diffusent dans les tissus[103,104]. Au-delà du transport plasmatique, les IGFBP interagissent avec la MEC, ce qui influence la distribution et peut orienter un tropisme tissulaire particulier. Par exemple, IGFBP-2 est enrichi particulièrement dans le cœur et contribue à la régulation locale de l'activité des IGF dans ce tissu. De plus, les IGFBP possèdent une affinité pour les glycosaminoglycanes membranaires, favorisant leur accumulation à la surface des cellules et créant ainsi des microréservoirs d'IGF. Cette accumulation locale augmente la concentration péri-cellulaire des ligands et optimise l'activation des récepteurs. Enfin, la libération des

IGF n'est pas spontanée mais repose sur des mécanismes de clivage protéique par des protéases spécialisées, assurant aussi une signalisation spatio-temporelle finement régulée[99].

2.5. Les voies moléculaires anti-angiogéniques

Les voies moléculaires anti-angiogéniques peuvent être classées en deux grandes catégories : d'une part, les facteurs qui inhibent directement les voies pro-angiogéniques en les bloquant et neutralisant ; d'autre part, ceux qui favorisent la stabilisation et la maturation du réseau vasculaire, limitant ainsi la formation de nouveaux vaisseaux.

2.5.1. Les régulateurs négatifs de la voie des VEGF

Le VEGF est l'une des voies pro-angiogéniques majoritaires, et contient par conséquent une forte variété de molécules inhibitrices. Parmi elles le FLT1 soluble et la thrombospondine-1 participent à la régulation négative de sa signalisation.

- **Le FLT1 soluble :**

Le sFLT1 aussi appelé sVEGFR-1 est une forme soluble et tronquée du récepteur VEGFR-1, générée par épissage alternatif du transcrit du gène FLT1[105]. Il est principalement produit par les EC, les cellules stromales et les macrophages[106,107]. Sur le plan structural, sFLT1 conserve uniquement les domaines extracellulaires responsables de la fixation aux ligands, mais il est dépourvu des domaines transmembranaires et intracellulaires nécessaires à la transduction du signal. Une fois sécrété dans le milieu extracellulaire, il agit comme un récepteur leurre en captant le VEGF, ce qui empêche celui-ci de se lier aux VEGFR membranaires des EC.
Physiologiquement, sFLT1 participe au maintien de l'homéostasie vasculaire en modulant la disponibilité du VEGF en contribuant ainsi à l'équilibre entre perméabilité vasculaire, survie cellulaire et stabilisation des vaisseaux. Par exemple, dans le rein il joue un rôle clé dans la régulation de la filtration glomérulaire. En contrôlant localement la quantité de VEGF, il maintient l'intégrité et les fenestrations de l'endothélium, essentielles à une filtration efficace et sélective du sang[108]. Enfin, pendant la grossesse, le sFLT1 est fortement produit par le placenta pour limiter une angiogenèse excessive de l'utérus.

- **La thrombospondine-1 :**

La thrombospondine-1 (TSP-1) est une glycoprotéine matricielle de 450kDa, sécrétée principalement par les fibroblastes et les cellules musculaires lisses[109,110]. Elle s'assemble en homopentamère et présente plusieurs domaines fonctionnels, parmi lesquels les répétitions de type 1 (TSR) jouent un rôle fondamental dans son activité anti-angiogénique. La TSP-1 constitue d'ailleurs le premier facteur anti-angiogénique endogène identifié [111] . *In vivo*, les souris déficientes en TSP-1 développent spontanément une angiogenèse rétinienne exacerbée[112]. Parmi ses diverses stratégies d'inhibition de l'angiogenèse, TSP-1 séquestre directement le VEGF via ses domaines TSR. Cette interaction réduit la concentration effective du VEGF libre dans l'environnement extracellulaire, diminuant ainsi l'activation des récepteurs VEGFR exprimés à la surface des EC [113]. Par ailleurs, la TSP-1 module également l'angiogenèse VEGF-dépendante de façon indirecte, par l'intermédiaire de son récepteur CD36. La liaison de la TSP-1 aux CD36 endothéliaux déclenche une cascade intracellulaire inhibitrice, impliquant l'activation de la tyrosine phosphatase SHP-1. Ce signal aboutit à la déphosphorylation des récepteurs VEGFR[114,115].

2.5.2. Les régulateurs négatifs de la voie des FGF : la pentraxine-3

La régulation négative de la voie des FGF implique plusieurs mécanismes, notamment des modifications post-traductionnelles des HSPG ou la séquestration des FGF par des protéines spécifiques qui modifient leur biodisponibilité pour les récepteurs. SULF1, une sulfatase extracellulaire, désulfate les groupements héparane-sulfate portés par les HSPG membranaires, limitant leur capacité à stabiliser le complexe FGF-FGFR [116,117]. Parmi les protéines pièges, la pentraxine-3 (PTX3), aussi appelée *TNF-stimulated gene 14* (TSG-14) constitue l'un des régulateurs majeurs.

La PTX3 est une protéine membre de la famille des pentraxines, une famille qui se caractérise par la présence d'un domaine protéique de 8 acides aminés conservés en région C-terminale. Cette famille se compose de deux groupes :

- **Pentraxines courtes** : incluant la protéine C-réactive et le composant sérique amyloïde P. Elles forment des pentamères symétriques en anneau. Elles sont impliquées dans l'immunité innée et dans l'inflammation.

- **Pentraxines longues** : incluant notamment la PTX3. Elles sont organisées en octamère et leurs fonctions sont diverses.

- **<u>Structure génique et protéique de PTX3 :</u>**

PTX3 est un gène de 6,2kb localisé sur le chromosome 3 humain. Il est organisé en 3 exons et en 2 introns. Les deux premiers exons codent pour le peptide signal et le domaine N-terminal de la protéine, le troisième exon code la région C-terminale[118]. Le promoteur du gène *PTX3* contient plusieurs sites de fixation pour des facteurs de transcription clés comme le NF-kB, PU-1, SP-1 ou AP-1 (**Figure 26**)[119].

Le gène *PTX3* code pour la PTX3, une glycoprotéine multimérique de 381 acides aminés d'environ 45 kDa. 92% de sa séquence en acides aminés est conservée entre la souris et l'Homme, soulignant son rôle critique. La structure comprend deux régions principales. La portion N-terminale, de 178 acides aminés, n'est pas conservée entre les membres de la famille pentraxine. Elle est peu caractérisée en cristallographie mais semble essentielle pour la liaison de certains de ses ligands. La portion C-terminale, de 203 acides aminés, contient la signature pentraxine conservée, homologue aux pentraxines courtes (**Figure 26**). Riche en cystéines, cette séquence permet l'homo-oligomérisation de 8 protomères de PTX3 par ponts disulfures [120]. C'est sous cette forme octamérique que la PTX3 est sécrétée et active [121].

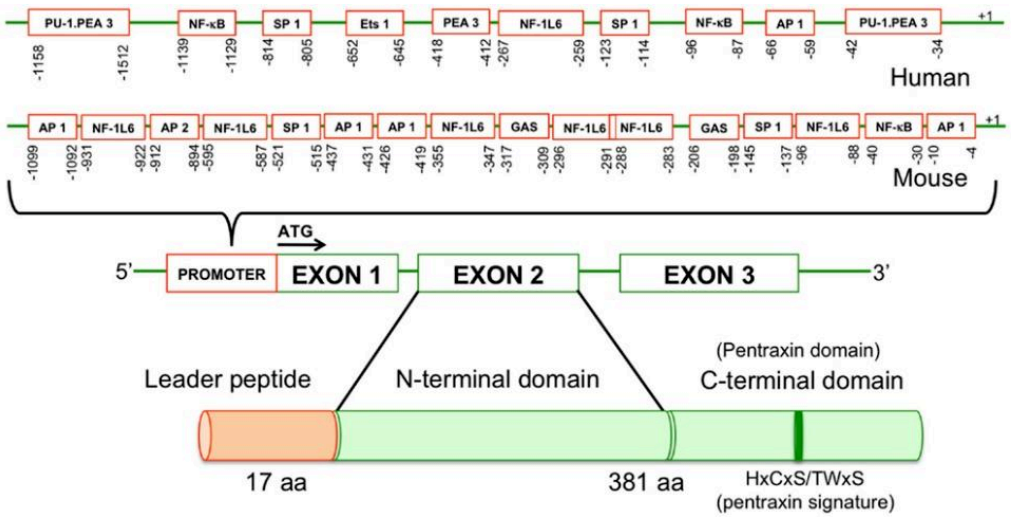


Figure 26: Structure du gène et de la protéine PTX3[122]

Le promoteur de PTX3 est sous le contrôle de plusieurs facteurs de transcription comme NF-κB, AP-1 et SP-1. La protéine possède un domaine N-ter qui contient son site de liaison pour les FGF, sa région C-ter contient le domaine conservé de PTX3.

- **Fonctions de la PTX3 :**

Initialement identifiée comme molécule clé de **l'immunité innée**, la PTX3 a rapidement été reconnue pour son rôle central dans la réponse inflammatoire immédiate. Contrairement aux pentraxines courtes majoritairement produites par le foie et relâchées dans la circulation systémique, la PTX3 est synthétisée localement par un large éventail de cellules stromales et immunitaires, telles que les EC, les fibroblastes, les cellules dendritiques, les neutrophiles ou encore les macrophages[123–125]. Elle agit comme un médiateur précoce facilitant l'opsonisation (marquage d'un pathogène pour faciliter sa phagocytose), la modulation de l'activation du complément et la régulation du recrutement des leucocytes[126] (**Figure 27A-B-C**). Plusieurs études chez la souris ont montré que la déplétion de PTX3 sensibilise les souris aux infections par divers pathogènes à cause d'un défaut de phagocytose et de recrutement des cellules immunitaires[127,128]. À l'inverse, les souris surexprimant PTX3 sont protégées contre plusieurs infections microbiennes sévères[129].

En plus de ses rôles extra-immunitaires, PTX3 agit comme un piège **(trap) naturel pour plusieurs membres de la famille des FGF**, notamment FGF-2 et FGF-8, mais également FGF-6, FGF-10 et FGF-17. Cette interaction empêche leur liaison aux FGFR et aux corécepteurs HSPG (**Figure 27D**). Dans le contexte de l'angiogenèse, c'est l'inhibition du FGF-2 par PTX3 qui a été étudiée. Plus précisément, la région [97-110] du domaine N-terminal de PTX3 se lie au FGF-2. Un complexe PTX3, sous forme octamérique peut fixer deux molécules de FGF-2 avec une forte affinité (K_D de 30-300nM) [121,130]. Cette fixation neutralise l'activité angiogénique du FGF-2. *In vivo*, l'injection locale ou systémique de PTX3 entraîne une diminution significative des concentrations de FGF-2 libre tissulaire[131]. Aussi, ces effets anti-angiogéniques ont été démontrés dans le modèle de membrane chorioallantoïdienne d'embryon de poulet (CAM). L'implantation de plugs de Matrigel complémenté en FGF-2 augmente le développement du réseau vasculaire, mais l'ajout de PTX3 réduit fortement la densité des néovaisseaux et le nombre d'EC[132].
Bien que PTX3 n'altère pas directement la structure du FGF-2, elle favoriserait sa clairance selon plusieurs mécanismes indirects. En masquant les sites de liaisons aux FGFR et aux HSPG, essentiels pour sa stabilité, PTX3 réduit sa demi-vie extracellulaire. De plus, grâce à ses propriétés d'opsonine, PTX3 facilite la reconnaissance et la phagocytose des complexes PTX3 – FGF-2, par les macrophages.

Ces mécanismes combinés illustrent le rôle régulateur de PTX3 au sein du système vasculaire. Par exemple, PTX3 exerce un contrôle précis de l'angiogenèse physiologique lors de la formation du corps jaune, une formation temporaire, à l'intérieur de l'ovaire, nécessitant une vascularisation rapide et dynamique pour assurer la production de progestérone. En piégeant le FGF-2, elle limite la

stimulation excessive des EC, favorisant ainsi un équilibre entre la formation de nouveaux vaisseaux et la stabilité du réseau vasculaire[133]. Des études menées sur modèles murins, ont démontré qu'une déficience en PTX3 provoque une angiogenèse désorganisée, entraînant une altération du corps jaune et une réduction de la fertilité. Par ailleurs, d'autres travaux ont mis en évidence son rôle protecteur dans le maintien de l'intégrité vasculaire face à différentes pathologies, notamment en réponse aux accidents vasculaires cérébraux ou dans la prévention de l'angiogenèse pathologique observée dans les rétinopathies diabétiques[134,135].

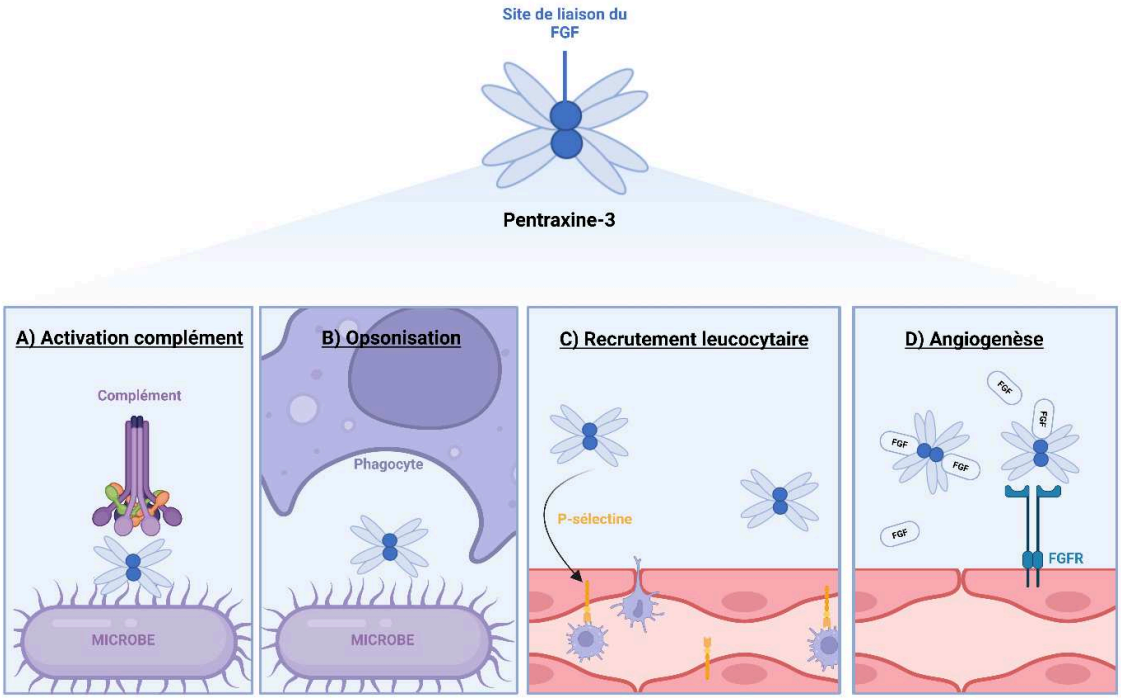


Figure 27: Fonctions de la PTX3

A) *PTX3 reconnait les PAMPs ou les DAMPs via sa région Nter, ce qui permet de recruter et d'activer la protéine C1q, initiant la voie classique du complément.* ***B)*** *En recouvrant la surface des pathogènes grâce à sa région N-ter, PTX3 marque ces derniers pour une reconnaissance facilitée par les récepteurs Fc, présents sur les macrophages et les neutrophiles. Ceci facilite la phagocytose du complexe PTX3-pathogène.* ***C)*** *PTX3 module le recrutement des leucocytes en stimulant l'expression par les EC des molécules d'adhérence telles que la P-sélectine, favorisant ainsi le roulement des leucocytes circulants avant leur diapédèse.* ***D)*** *PTX3 se lie au FGF-2, empêchant sa fixation aux récepteurs FGFR des EC, ce qui neutralise leurs effets pro-angiogéniques. Créé sur Biorender.*

- **Régulations de la PTX3 :**

La régulation de PTX3 s'opère à plusieurs niveaux : transcriptionnel et sécrétoire.

La **transcription** de *PTX3* n'est pas constitutive mais fortement induite par des signaux inflammatoires comme l'IL-1β et TNF-α. Ces cytokines pro-inflammatoires permettent d'une part d'activer ses facteurs de transcription comme NF-κB et AP-1, et d'autre part, participent à l'ouverture de la chromatine sous l'effet de modifications épigénétiques. En conditions basales, le promoteur de *PTX3* se trouve généralement dans un état fermé, à cause de la méthylation de ses îlots CpG et des marques répressives de ses histones, notamment H3K27me3 [136]. En réponse à l'IL-1β et TNF-α, les histones du promoteur sont acétylées et déméthylées en faveur de la fixation des complexes de transcription sur le promoteur [136]. L'induction cytokinique de PTX3 est rapide et transitoire, avec un pic d'expression observé entre 4 et 6 heures après stimulation. D'autres signaux, tels que le TGF-β, les PAMPs et DAMPs régulent aussi la transcription de *PTX3*.

Pour finir, la **régulation sécrétoire** de la forme octamérique fonctionnelle contribue également à ajuster sa disponibilité. Par exemple, dans les neutrophiles, la PTX3 est directement produite pendant la granulopoïèse et stockée dans les granules secondaires[137]. Elle est libérée par exocytose après stimulation, permettant une réponse rapide, conséquente et indépendante de la transcription et de la traduction[137,138]. Ce mécanisme n'a toutefois pas encore été clairement démontré dans les EC ou les macrophages et reste à mieux caractériser.

2.5.3. Les régulateurs négatifs de la voie des IGF : l'IGFBP-3

L'activité des IGF est finement modulée par plusieurs mécanismes inhibiteurs destinés à restreindre une signalisation excessive. Le récepteur IGF2R agit comme un récepteur leurre de l'IGF-2 pour le diriger vers la dégradation lysosomale sans transduire de signal.
Aussi, les IGFBP représentent un autre niveau majeur de régulation négative. En se liant aux IGF avec une forte affinité, ils réduisent leur biodisponibilité pour limiter l'activation d'IGF1R. Parmi elles, IGFBP-3 est la plus abondante et constitue un acteur central de cette régulation.

- **Structure génique et protéique de IGFBP-3 :**

Le gène *IGFBP3*, localisé sur le chromosome 7, s'étend sur environ 10kb et est composé de cinq exons. Il possède plusieurs promoteurs alternatifs [139].

La protéine IGFBP-3 se compose de 264 acides aminés et présente une organisation en trois domaines. Le domaine N-terminal, riche en cystéine et hautement conservé, contient des motifs structuraux stabilisés par des ponts disulfures. La région centrale ou « linker », plus flexible et moins conservée, est la cible de protéases qui réduisent son affinité pour les IGF, permettant leur relargage. Ce domaine comporte aussi des sites de glycosylation et de phosphorylation, qui modulent sa stabilité, sa conformation et ses interactions. La région C-terminale contribue à la fixation des IGF et contient aussi des éléments fonctionnels indépendants, notamment des sites de liaisons à la MEC, aux intégrines ainsi qu'une séquence de localisation nucléaire (NLS), qui permet son import dans le noyau. L'association des domaines N- et C-terminal confère à IGFBP-3 une forte affinité pour l'IGF-1 et l'IGF-2, tandis que sa région centrale confère un clivage contrôlé (**Figure 28**)[140].

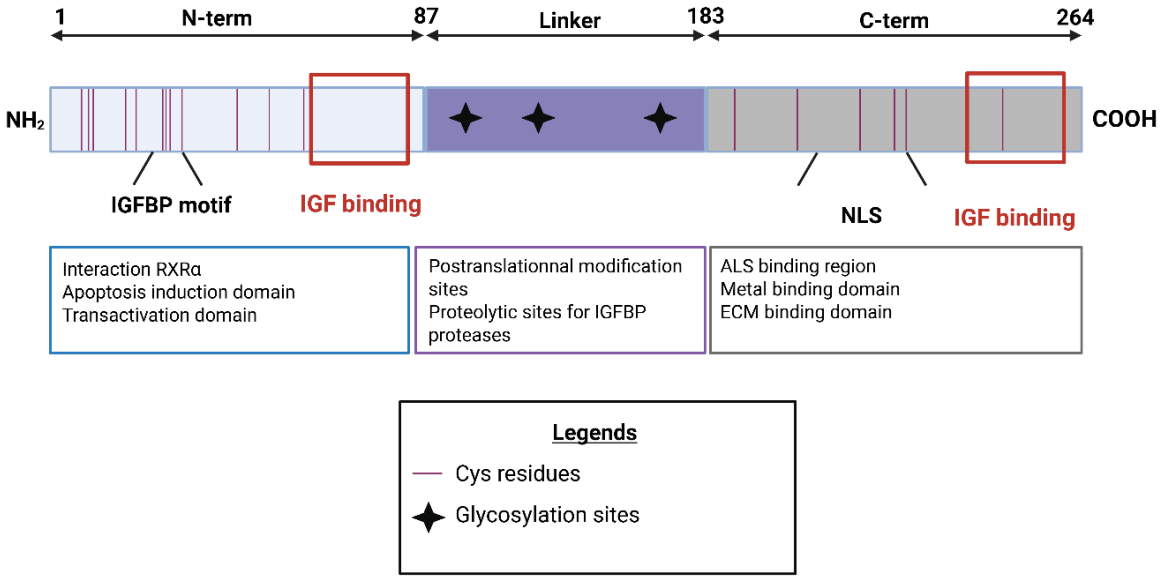


Figure 28: Structure de la protéine IGFBP-3

Adapté sur Biorender de Jogie-Brahim et al, Yamada el al et Shrivastav et al [104,140,141].

- **Fonctions anti-angiogéniques d'IGFBP-3 :**

IGFBP-3 exerce des effets anti-angiogéniques par des mécanismes à la fois dépendants et indépendants des IGF. D'une part, par un mode d'action dépendant des IGF, IGFBP-3 séquestre l'IGF-1 et l'IGF-2 avec une forte affinité, limitant leur disponibilité pour le récepteur IGF1R, exprimé à la surface des EC. Cette régulation négative réduit la prolifération, la survie et la formation de structures tubulaires des EC[142]. Indépendamment de l'IGF, il agit directement avec les EC et leur microenvironnement. Il peut induire l'apoptose endothéliale via des partenaires membranaires, mais aussi après internalisation et translocation dans le noyau grâce à son signal NLS [143,144]. Une fois dans le noyau, IGFBP-3 interagit avec p53 pour moduler la transcription de gènes pro-apoptotiques et anti-angiogéniques[145]. Il limite aussi la prolifération endothéliale en inhibant l'activation de la voie MAPK et la production autocrine de facteurs de croissance pro-angiogéniques. En parallèle, il inhibe l'expression de VEGF et renforce les jonctions endothéliales[146]. Les souris *IGFBP3*$^{-/-}$ présentent une angiogenèse exacerbée et une perméabilité vasculaire accrue[147]. Par ailleurs, IGFBP-3 accroît la migration des progéniteurs vasculaires CD34^{+} et des EC en favorisant l'assemblage du cytosquelette d'actine, la formation de lamellipodes et l'activation de la Rho GTPase Cdc42.

- **Régulations de l'IGFBP-3 :**

La régulation de l'expression d'IGFBP-3 dépend de signaux hormonaux et cytokiniques. Au niveau **transcriptionnel**, IGFBP-3 est induit par l'hormone de croissance, qui stimule directement sa transcription via l'action de STAT5[148]. D'autres signaux hormonaux stimulent aussi son expression, notamment les hormones stéroïdiennes (glucocorticoïdes, progestérone), de même que certaines cytokines comme le TGF-β et le TNF-α. À l'inverse, les voies mitogènes comme l'EGF peuvent moduler négativement son expression[149–153].

Enfin, la régulation **post-traductionnelle** joue un rôle déterminant. IGFBP-3 est sensible à la protéolyse par diverses enzymes, ce qui réduit sa capacité à lier les IGF[154]. De plus, la phosphorylation et la glycosylation influencent sa stabilité, sa localisation subcellulaire et ses interactions avec ses partenaires protéiques[140,155].

2.6. Les voies de guidance axonale : exemple de la nétrine-1

2.6.1. Généralités

Le développement du système vasculaire partage de nombreux points communs avec celui du système nerveux, en particulier l'utilisation de molécules de guidage initialement décrites dans la neurogenèse. Tout comme les cônes de croissance axonaux, les EC, et notamment les *tip cells* s'orientent en réponse à des signaux attractifs ou répulsifs qui organisent le remodelage et la structuration des réseaux. Ce parallèle est renforcé par l'observation que les nerfs et les vaisseaux se développent souvent de manière concomitante et selon des trajectoires proches.

Ces molécules de signalisation sont regroupées en quatre grandes familles et elles exercent un rôle majeur dans le contrôle de l'angiogenèse (**Figure 29**). Les nétrines constituent la première famille décrite. Initialement identifiées comme des signaux attractifs pour les axones commissuraux, elles exercent également un rôle crucial dans l'endothélium, où elles peuvent promouvoir ou inhiber la migration et la survie des EC en fonction des récepteurs exprimés. Les Slits, via leurs récepteurs Robo, assurent des fonctions essentiellement répulsives, permettant de limiter l'envahissement endothélial et de contrôler l'organisation des réseaux vasculaires. Les éphrines et leurs récepteurs Eph jouent un rôle fondamental dans la hiérarchie du réseau vasculaire. Enfin, les sémaphorines, via leurs récepteurs plexines et neuropilines, sont des régulateurs puissants de l'angiogenèse, capables de freiner la croissance vasculaire ou de coopérer avec le VEGF dans certaines conditions[156,157].

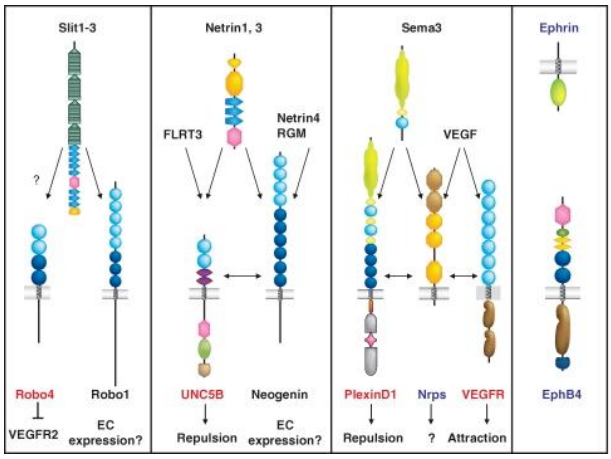


Figure 29: Les quatre familles des molécules de guidage axonale et leur récepteurs associés[158].

Les Slit agissant via Robo4 et Robo1 (endothélium) atténuent la signalisation VEGF et régulent la migration/stabilisation des EC. Les nétrines via UNC5B et la néogénine contrôlent la survie et le guidage des EC. Les Sema de classe 3, par la plexine D1 et les NRP sont majoritairement répulsives et anti-angiogéniques, mais peuvent devenir pro-angiogénique avec la coopération avec VEGFR/NRP. Les éphrines orchestrent l'identité et l'organisation artério-veineuse.

2.6.2. Régulations et structure de la nétrine-1

La nétrine-1 (NTN1) appartient à une famille de protéines sécrétées. Elle a été découverte dans les années 1990 et tient son nom du mot « *netr* », qui signifie « guide » en grec. C'est une famille de protéines très conservée, de la drosophile à l'Homme[159]. Dans le système nerveux, NTN1 agit comme signal directionnel pour les axones commissuraux, contrôlant leur attraction ou répulsion selon les récepteurs exprimés.

La régulation de l'expression de *NTN1* est contrôlée par les signaux hypoxiques via HIF-1α, l'inflammation via le TNFα et l'IL-1β ainsi que par les facteurs de croissance via le TGF-β ou l'EGF. À l'inverse, p53 peut réprimer son expression, tout comme les cytokines anti-inflammatoires telle que l'IL-10.

Sur le plan structural, la NTN1 est une glycoprotéine extracellulaire de 70kDa, apparentée aux laminines. Elle s'organise en trois domaines principaux. Son domaine N-terminal de type laminine VI est impliqué dans les interactions protéines-protéines[160]. Ses trois domaines EGF-like de type laminine V (V1-V3) lui confèrent ses propriétés de liaisons spécifiques aux récepteurs membranaires et contribuent à sa stabilité. Enfin, son domaine C-terminal (C), riche en acides aminés basiques, favorise les interactions avec la MEC, notamment les protéoglycanes sulfatés et module la diffusion de la protéine dans les tissus (**Figure 30**).

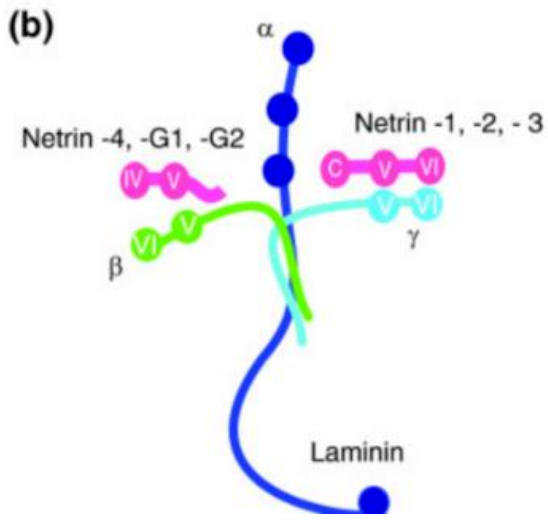


Figure 30: Homologie structurale entre les nétrines et les laminines[160]

Les mammifères expriment la nétrine-1, -3, -4, -G1 et -G2. Seules la nétrine-1 et la nétrine-4 sont sécrétées, les autres formes sont liées à la membrane plasmique par une ancre glycosylphosphatidylinositol (GPI).

2.6.3. Récepteurs de la nétrine-1

Cette organisation confère à la NTN1 la capacité d'interagir à la fois avec ses récepteurs spécifiques et avec l'environnement extracellulaire, conditionnant son gradient et sa fonction. NTN1 se fixe à plusieurs classes de récepteurs (**Figure 31**) : DCC (*Deleted in Colorectal Cancer*) et la néogénine qui transmettent des signaux attractifs, ainsi que la famille UNC5 (*Uncoordinated*), qui induit des signaux répulsifs. Plus récemment, d'autres partenaires membranaires ont été identifiés. DSCAM (*Down Syndrome Cell Adhesion Molecule)* participe au guidage neuronal et CD146 (*M-CAM*), un corécepteur du VEGFR, est directement impliqué dans la transmission de signaux pro-angiogéniques[161].

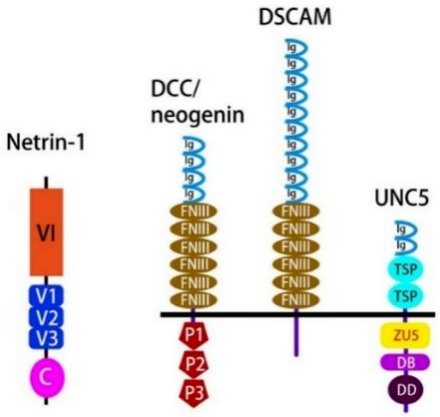


Figure 31: La NTN1 et ses récepteurs canoniques[158]

La NTN1 peut se lier à 3 récepteurs canoniques, DCC/ néogénine, DSCAM et la famille des récepteurs UNC5.

UNC5B (*Uncoordinated-5 homolog B*) est le principal récepteur canonique de la nétrine, exprimé par les EC. Son expression est particulièrement marquée dans les endothéliums activés, au cours de la croissance et de l'extension vasculaire, et est enrichie dans les *tip cells*[162]. UNC5B est une glycoprotéine transmembranaire composée de 945 acides aminés[163]. Sa région N-terminale extracellulaire comprend deux domaines immunoglobuline-like (Ig-like) impliqués dans la reconnaissance des ligands ainsi que de deux répétitions TSP-1 (TSP repeats) qui participent à la régulation de l'adhérence. Elle possède une seule traversée membranaire. Sa région C-terminale intracellulaire contient plusieurs domaines critiques pour la transmission du signal et la régulation de la survie cellulaire : (i) ZU5 (*ZO-1 and UNC5 domain*) qui est un domaine impliqué dans la stabilité du récepteur et il recrute des protéines régulatrices du cytosquelette. Il a un rôle dans la migration et l'organisation cellulaire ; (ii) DB (*Death Box*, ou domaine de dépendance) qui contrôle l'activité apoptotique. En présence de ligand, le DB inhibe l'activation de la signalisation pro-apoptotique. En l'absence, il libère l'accès au 3ème domaine, domaine de mort, et favorise l'induction d'apoptose ; (iii) DD (*Death Domain*) qui est un domaine

classique des récepteurs de mort, capable de recruter des protéines adaptatrices et d'initier l'apoptose en l'absence de ligand.

2.6.4. Effets anti-angiogéniques de la nétrine-1

- **Effets anti-angiogéniques et stabilisateurs de l'axe NTN1/UNC5B :**

L'un des premiers rôles attribués à l'axe NTN1/UNC5B dans l'endothélium concerne son activité anti-angiogénique et stabilisatrice. La fixation de la NTN1 sur UNC5B permet le recrutement des protéines adaptatrices sur le domaine ZU5, impliquées dans le remodelage du cytosquelette. Ces interactions déclenchent l'activation de RhoA et sa kinase ROCK, favorisant la contractilité des fibres de stress, tandis que l'inhibition concomitante de Rac1 et Cdc42 limite la formation des lamellipodes et des filopodes, ce qui réduit l'exploration directionnelle de la *tip cell.* Parallèlement, la signalisation pro-répulsive entraîne l'inhibition de FAK, compromettant la dynamique des adhérences focales nécessaires à la migration. L'ensemble de ces mécanismes provoque une perte de polarité des EC en direction du gradient de NTN1, ce qui induit leur rétractation et les redirige vers des zones dépourvues de signal répulsif. Au-delà de cet effet anti-angiogénique, l'interaction de la NTN1 avec UNC5B participe également à la maturation et à la stabilisation de la barrière hémato-encéphalique, notamment en modulant la signalisation Wnt/β-caténine[164]. Cette régulation assure l'expression et la stabilisation des protéines des jonctions serrées ainsi que des transporteurs spécifiques, éléments indispensables à l'acquisition des propriétés de barrière de l'endothélium cérébral. Elle favorise aussi le recrutement et la différenciation des progéniteurs des cellules périvasculaires[165].

- **Effets pro-angiogéniques de l'axe NTN1/CD146 :**

La NTN1 exerce aussi des effets pro-angiogéniques en se liant à d'autres récepteurs comme CD146. La liaison de NTN1 à CD146 induit la formation d'un dimère stable, qui mène à l'amplification de la voie du VEGF, visible par une phosphorylation accrue de VEGFR-2, ERK1/2 et p38. Ces voies convergent vers une augmentation de la prolifération, de la migration et de la tubulogenèse endothéliale[161].

3. ANGIOGÈNESE PATHOLOGIQUE

Si l'angiogenèse physiologique est finement régulée pour assurer un développement vasculaire harmonieux, de nombreuses situations pathologiques se caractérisent par une dérégulation de ces mécanismes, conduisant à la formation de réseaux vasculaires anormaux. C'est le cas dans l'angiogenèse des tumeurs solides, des tumeurs et des malformations vasculaires Ces anomalies partagent souvent plusieurs traits communs : une activation excessive des voies pro-angiogéniques, un déséquilibre des signaux régulateurs, une désorganisation architecturale des vaisseaux et une altération de leur stabilité fonctionnelle. Elles diffèrent cependant par leur origine et les mécanismes impliqués. Dans les tumeurs solides, la néovascularisation est induite par les cellules cancéreuses et leur microenvironnement, sans mutation intrinsèque aux EC. Les malformations vasculaires quant à elles, apparaissent au cours du développement et résultent principalement de mutations somatiques perturbant la formation et la maturation des vaisseaux. Enfin, les tumeurs vasculaires se caractérisent par une hyperprolifération des EC, survenant *in utero* ou après la naissance, sous l'effet de mutations, de signaux environnementaux ou de leur combinaison.

3.1. L'angiogenèse des tumeurs solides

Dès les années 1970, Judah Folkman a proposé que la croissance tumorale dépendait du développement d'un réseau vasculaire, posant ainsi les bases du concept d'angiogenèse tumorale[166]. Lors des premières phases de son développement, une tumeur peut subsister sans vascularisation car sa petite taille lui permet encore de facilement satisfaire ses besoins métaboliques par diffusion. Cependant, au-delà d'un diamètre de 2 -3 millimètres, l'apport en oxygène devient insuffisant. Du fait de cette l'hypoxie, les cellules tumorales et les cellules du microenvironnement déclenchent la production massive et variée de facteurs pro-angiogéniques. À ce moment-là, l'équilibre se rompt : c'est le switch angiogénique [167]. Ce mécanisme stimule l'angiogenèse et entraîne la formation d'un réseau vasculaire désorganisé, immature et peu fonctionnel. Ce nouveau réseau permet non seulement à la tumeur de poursuivre sa croissance en assurant l'apport d'oxygène et de nutriments, mais facilite également sa dissémination métastatique via les vaisseaux anormaux, souvent fenestrés et perméables, du fait de régulations défaillantes. Ce rôle central de l'angiogenèse dans le développement tumoral est désormais reconnu comme l'un des piliers fondamentaux du cancer[168].

3.1.1. Les mécanismes cellulaires de l'angiogenèse tumorale

Pour assurer leur vascularisation, les cellules cancéreuses détournent les programmes de morphogenèse vasculaire normalement actifs au cours du développement, tels que la vasculogenèse, l'angiogenèse par bourgeonnement et par intussusception. En parallèle, certaines tumeurs exploitent des stratégies atypiques via le mimétisme vasculaire, la co-option et la transdifférenciation endothéliale (**Figure 32**).

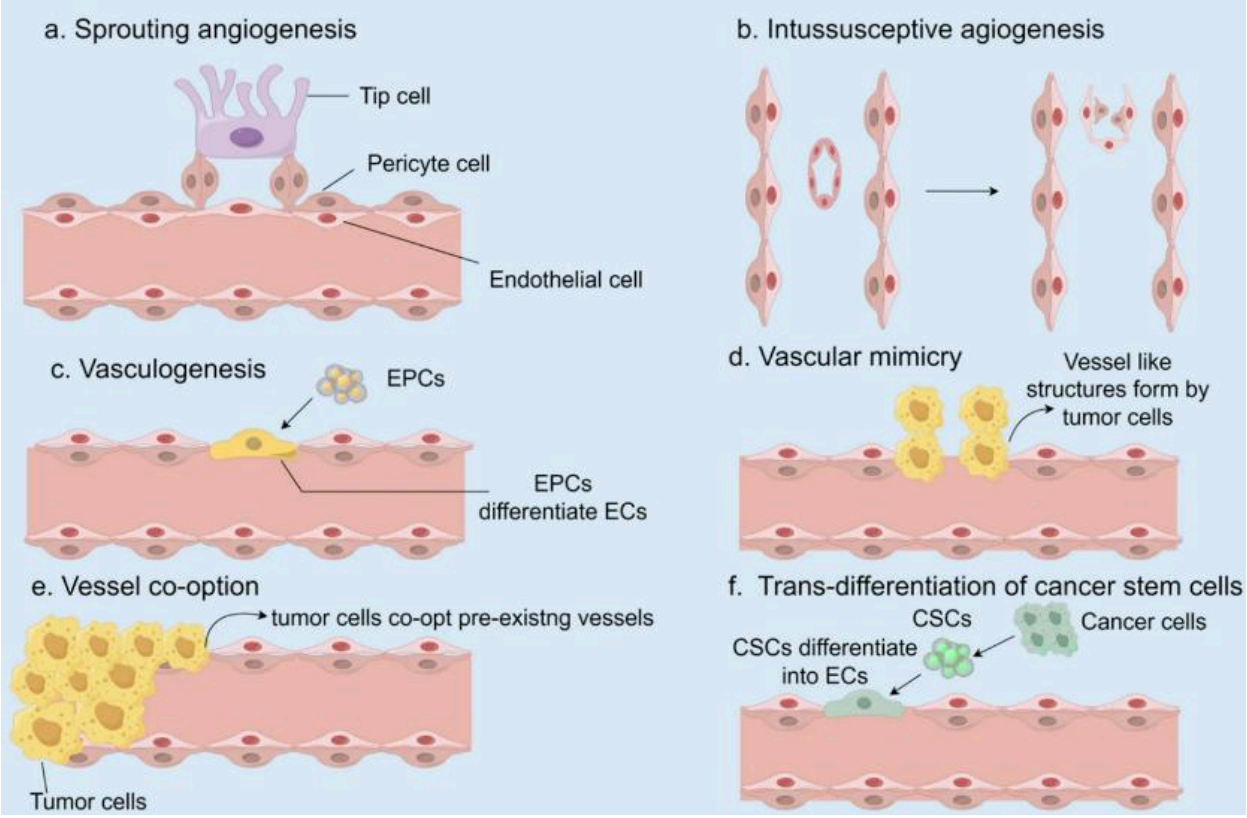


Figure 32: Stratégies principales de l'angiogenèse tumorale[169]

La vascularisation tumorale détourne des mécanismes physiologiques du développement comme la vasculogenèse, ainsi que l'angiogenèse par intussusception ou par bourgeonnement. Les cellules tumorales mettent aussi en place des stratégies pour remplacer les EC, comme lors du mimétisme ou de la transdifférenciation vasculaire. Elles peuvent aussi se développer le long des vaisseaux physiologiques, comme lors de la co-option.

L'**angiogenèse par bourgeonnement** (**Figure 32.A**) est la stratégie vasculaire la plus observée dans les tumeurs solides. Elle repose sur le détournement des processus classiques réalisés lors de l'angiogenèse par bourgeonnement physiologique (**cf.2.2.2**). Dans le contexte tumoral, les *tip cells* et *stalk cells* conservent leurs rôles respectifs de migration et de prolifération mais leur comportement est modifié. Les *tip cells* sont souvent en surnombre et présentent une activité migratoire exacerbée.

Les *stalk cells*, quant à elles, prolifèrent de façon accrue et peinent à retrouver leur quiescence. Les interactions avec les péricytes et le microenvironnement sont altérés, ce qui affecte la maturation et la stabilité des néovaisseaux[170].

L'**angiogenèse par intussusception** (**Figure 32.B**) est moins étudiée que le bourgeonnement à cause du manque de modèles, mais elle apparaît comme une stratégie complémentaire ou alternative, notamment dans des tumeurs à croissance rapide et soumises à un stress métabolique important. Dans le contexte tumoral, les mécanismes physiologiques sont détournés (**cf. 2.2.1**). Ne dépendant pas de la prolifération endothéliale, ce mécanisme est peu énergétique et rapide, il permet en une dizaine de minutes de former un nouveau segment vasculaire. La tumeur peut alors s'adapter rapidement à son microenvironnement. L'intussusception est particulièrement observée dans certains gliomes, le cancer colorectal et le mélanome primitif[171–173].

La **vasculogenèse tumorale** (**Figure 32.C**) fait appel aux mécanismes physiologiques utilisés au cours du développement (**cf. 2.1**). Ce processus implique le recrutement des EPC de la moelle osseuse, qui migrent vers la tumeur sous l'influence de signaux chimiotactiques massifs comme le VEGF ou SDF-1[169]. Dans la tumeur, elles se différencient et forment des vaisseaux sans suivre un plan morphogénique structuré. Elles s'agglutinent autour des foyers hypoxiques. Elle compléterait et relayerait les processus d'angiogenèse, notamment dans le glioblastome[174]. Le blocage du recrutement des EPC par un inhibiteur de SDF-1 réduit significativement le développement du réseau vasculaire et la croissance tumorale dans le glioblastome[175].

Le **mimétisme vasculaire** (**Figure 32.D**) a été décrit pour la première fois en 1999 par M.J.C. Hendrix dans le mélanome cutané[176]. Il désigne la capacité de certaines cellules tumorales à former directement des structures en forme de vaisseaux sanguins, indépendamment des EC. Ce processus débute par la transition phénotypique des cellules cancéreuses, qui modifient leur cytosquelette pour adopter une morphologie allongée et tubulaire[177]. Elles expriment la VE-cadhérine, conférant des caractéristiques jointives proches de celles des EC[177]. Ces cellules s'organisent en réseaux canaliculaires et connectés à la vascularisation systémique, s'alignant longitudinalement pour former des conduits capables de transporter des fluides. Le mimétisme vasculaire est observé principalement dans des cancers à phénotypes agressifs et hautement plastiques, tels que les mélanomes, les carcinomes mammaires et les glioblastomes[178–180]. Sa présence est fréquemment associée à un pronostic défavorable en raison d'une dissémination métastatique facilitée, car les cellules tumorales sont en contact direct avec la circulation sanguine.

La **co-option vasculaire** (**Figure 32.E**) est un mécanisme par lequel les cellules tumorales n'induisent pas la formation de nouveaux vaisseaux. Plutôt que de stimuler la formation des vaisseaux, les cellules cancéreuses migrent et s'organisent autour des capillaires déjà formés dans le tissu. Sur le plan cellulaire, la co-option demande une forte capacité invasive et migratoire des cellules tumorales[181]. Celles-ci adoptent une disposition périvasculaire en manchon, maintenue par des protéines d'adhérence comme L1CAM ou l'intégrine β1[182]. C'est un phénomène particulièrement fréquent dans les tissus très vascularisés, comme le cerveau, le foie ou la moelle osseuse[183]. Elle est très bien décrite dans les métastases cérébrales de cancer du poumon, du sein ou provenant de mélanome.

Pour finir, la **transdifférenciation** (**Figure 32.F**) des cellules souches cancéreuses (CSC) en EC représente un mécanisme alternatif. Cette capacité repose sur la plasticité extrême des CSC, particulièrement en contexte d'hypoxie ou d'exposition à des signaux pro-angiogéniques. Contrairement au mimétisme vasculaire où les cellules imitent les fonctions des EC sans réelle conversion épigénétique et fonctionnelle, la transdifférenciation implique une reprogrammation stable du devenir des CSC[169]. Ce phénomène a été particulièrement documenté dans le glioblastome, où les CSC $CD133^+$/$Nestine^+$ contribuent directement à la génération d'une population endothéliale intratumorale[184].

3.1.2. Morphologie des vaisseaux tumoraux et conséquences

Dans les tumeurs, la vascularisation présente des caractéristiques architecturales et histologiques profondément altérées par rapport aux tissus physiologiques. Contrairement aux vaisseaux normaux qui suivent une architecture hiérarchisée et bien segmentée (**cf. 1.1**), les vaisseaux tumoraux forment un réseau anarchique, caractérisé par des ramifications excessives, des boucles irrégulières, des shunts artérioveineux et une absence de hiérarchie fonctionnelle. Ces vaisseaux sont souvent tortueux et présentent un diamètre hétérogène (**Figure 33A-D**)[185]. Les EC ont une morphologie irrégulière et dentelée, elles perdent leur polarité et leurs jonctions intercellulaires (**Figure 33E-H**). Cette angiogenèse est rapide mais non dirigée en l'absence de signaux de guidance adéquats et de cellules péricytaires stabilisatrices (**Figure 33I, J**). La lame basale est discontinue ou épaissie selon les régions. La pression interstitielle élevée et les forces mécaniques majeures exercées par la masse tumorale contribuent aussi à ces anomalies morphologiques. De plus, l'absence de remodelage adaptatif normalement régulé par les besoins tissulaires en nutriments conduit à une mauvaise répartition du flux sanguin, avec des segments vasculaires dilatés, comprimés ou fusionnés de façon anormale. Une

étude récente a montré que la morphologie des vaisseaux pouvait avoir directement un impact sur le pronostic des patientes atteintes de cancer du sein[186].

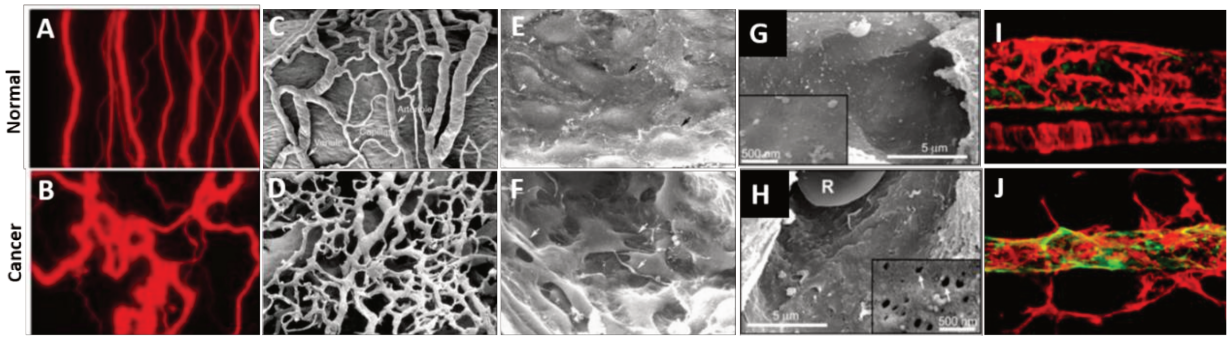


Figure 33: Caractéristiques morphologiques du réseau vasculaire tumoral

Comparaison du réseau vasculaire physiologique (haut) et tumoral (bas). ***A-B****) Organisation générale de l'architecture du réseau vasculaire marqué à l'isolectine B4[187].* ***C-D****) Organisation générale du réseau vasculaire en microscopie électronique à balayage. D) Représente le cancer colorectal[188].* ***E-F****) Morphologie des EC à la surface de la lumière vasculaire. Les EC des vaisseaux physiologiques (E) sont plates et jointives avec un petit chevauchement aux bordures cellulaires. Les EC des vaisseaux tumoraux (F) font des prolongements et les chevauchements sont larges[189].* ***G-H****) L'endothélium du rein sain présente peu de fenestrations (G). L'endothélium du rein touché d'un carcinome présente de nombreuses fenestrations (H).* ***I-J****) Organisation des cellules musculaires lisses/ péricytes (desmine, rouge) autour de l'endothélium (CD31, vert). I) Les veinules et les artérioles sont fortement recouvertes de péricytes dans un pancréas physiologique. J) Dans le cancer du pancréas, les péricytes sont moins nombreux et recouvrent mal l'endothélium[190].*

Ces altérations structurales ont des conséquences fonctionnelles majeures. Les vaisseaux tumoraux sont très perméables, le flux sanguin est donc irrégulier, ce qui compromet la perfusion homogène des tissus[191]. Il en résulte une hypoxie chronique au sein des tumeurs qui favorise l'agressivité des cellules tumorales et leur résistance à la radiothérapie. Cette hypoxie soutient la production continue de facteurs pro-angiogéniques. En parallèle, l'élimination des déchets métaboliques est altérée, ce qui, combiné à une glycolyse tumorale exacerbée, conduit à l'accumulation de lactate et à l'acidification du microenvironnement tumoral. Ce pH extracellulaire bas perturbe l'activité des cellules immunitaires, l'efficacité des chimiothérapies et favorise l'invasion des cellules tumorales[192]. Ainsi, la structure anormale des vaisseaux tumoraux constitue à la fois une signature morphologique de la tumeur et un déterminant clé de son évolution agressive et de sa résistance thérapeutique. Ces anomalies sont le fruit d'altérations et de dérégulations moléculaires profondes.

3.1.3. Dérégulations moléculaires

L'angiogenèse tumorale est associée aux dérégulations de diverses voies moléculaires. Parmi celles-ci, la voie des VEGF, des FGF, et des IGF occupent une place centrale, en orchestrant la prolifération, la migration et la survie des EC. Selon les contextes, ces dérégulations relèvent de la surexpression des ligands, de l'activation anormale de leurs récepteurs, ou encore de la suppression de régulateurs négatifs. Ces phénomènes sont alimentés par les cellules tumorales elles-mêmes, mais aussi par une multitude de cellules accessoires du microenvironnement. L'étude détaillée de ces dérégulations est essentielle pour mieux comprendre l'angiogenèse des cancers.

- **Dérégulation de la voie des VEGF et de ses partenaires : exemple de l'axe VEGF-A/VEGFR-2 :**

Pivot central de la régulation angiogénique, la voie des VEGF repose sur une coordination précise entre signaux activateurs et inhibiteurs. Dans le contexte tumoral, cet équilibre se rompt : le VEGF-A et son récepteur VEGFR-2 sont fortement induits, tandis que les freins physiologiques, comme TSP-1 et sFLT1 s'amenuisent. Ce déséquilibre favorise la prolifération et la migration des EC, ainsi que l'internalisation de leurs jonctions.

Dérégulations de VEGF-A :

Une caractéristique majeure des dérégulations de la voie du VEGF dans les tumeurs est la surexpression du ligand VEGF-A, dont les niveaux peuvent être 5 à 20 fois supérieurs dans le tissu tumoral et dans le plasma des patients, par rapport aux conditions physiologiques. Cette augmentation résulte d'une combinaison de mécanismes génétiques et transcriptionnels.

Sur le plan génétique, des amplifications chromosomiques du locus 6p21 entraînent une augmentation du nombre de copies du gène *VEGFA* dans les cellules tumorales. Dans le mélanome et les sarcomes, cette amplification est associée à un pronostic défavorable et à une diminution de la survie des patients [193,194].En revanche, aucune mutation somatique récurrente et fonctionnelle de *VEGFA* n'a été identifiée dans les cancers.

Au niveau transcriptionnel, l'hypoxie constitue son principal inducteur. La stabilisation du facteur HIF-1α entraîne une forte activation de la transcription de *VEGFA* [195]. D'autres facteurs de transcription, comme AP-1 et SP1, activés par des signaux inflammatoires ou oncogéniques renforcent également son expression. De plus, l'épissage alternatif du gène génère plusieurs isoformes dont le $VEGF_{165}$ qui prédomine dans les tumeurs. Ce variant combine une bonne diffusion dans la MEC et une forte affinité pour ses corécepteurs [196,197].

Enfin, certaines études sur le glioblastome ont montré que les cellules tumorales, via la sécrétion de molécules de guidance axonale, peuvent recruter des macrophages au phénotype M1-like [198]. Une fois dans le tissu tumoral, les macrophages se repolarisent en M2-like et produisent de fortes quantités de VEGF-A, contribuant à la dysmorphie vasculaire [199].

Dérégulations de VEGFR-2 :

VEGFR-2 est généralement fortement surexprimé dans les EC des tumeurs, par rapport aux EC normales[200]. Cette surexpression rend les EC particulièrement sensibles au VEGF. Cette augmentation de VEGFR-2 ne résulte pas de mutations mais de mécanismes de régulations transcriptionnels et post-traductionnels, déclenchés par les cellules tumorales et leur microenvironnement. Comme en contexte physiologique (**cf. 2.4.1**), l'hypoxie, via l'activation de HIF-1α, stimule la transcription de *KDR*. Le VEGF-A agit aussi lui-même comme inducteur transcriptionnel. D'autres signaux contribuent à cette régulation, incluant l'inflammation via les facteurs de transcription NF-κB et AP-1 ainsi que la rigidité et la composition de la MEC via YAP/TAZ et la signalisation intégrine/FAK[201,202].

Enfin, certaines études ont montré que les EC tumorales internalisent VEGFR-2 plus lentement que les EC normales. Ce maintien prolongé du récepteur à la surface, favorisant une activation durable s'explique notamment par ses interactions avec ces corécepteurs et la rigidité de la MEC qui ralentissent l'endocytose[203,204].

Dérégulations des inhibiteurs de la voie VEGF :

Comme mentionné précédemment (**cf. 2.5.1**), sFLT1 joue un rôle de régulateur négatif dans la voie du VEGF. Bien que les données concernant les altérations génétiques spécifiques de sFLT1 soient encore limitées, des recherches épigénétiques indiquent que son promoteur peut être hyperméthylé dans les contextes tumoraux[205]. De plus, l'hypoxie tumorale inhibe son expression[206].

THBS1 code pour TSP-1, un régulateur négatif sécrété de la voie du VEGF (**cf 2.5.1**), dont l'expression peut être diminuée dans divers contextes tumoraux. L'expression de *THBS1* est contrôlée par plusieurs facteurs de transcription, dont certains présentent des altérations dans le cancer. Par exemple, p53 agit comme un régulateur positif [207,208], tandis que des oncogènes tels que Myc et ID1 inhibent son expression [209]. Enfin, certains miR, comme miR-194, surexprimé dans certains types tumoraux, peuvent inhiber sa traduction [208].

- **Dérégulation de la voie des FGF et de ses partenaires : exemple de l'axe FGF2/FGFR-1 :**

À l'interface entre croissance tumorale et remodelage vasculaire, la voie FGF est soumise à un contrôle fin qui est rompu dans les cancers, par la surexpression de FGF-2 et de FGFR-1 dans les EC ainsi que la perte de frein exercé par PTX3. Ces altérations convergent vers une angiogenèse pathologique, caractéristique des environnements tumoraux agressifs.

Dérégulations de FGF-2 :

Le ligand FGF-2 est fréquemment surexprimé dans les cancers. Dans le cancer de la prostate, ses niveaux plasmatiques sont environ 2.5 fois plus élevés que chez les donneurs sains[210].

Le gène *FGF2*, localisé au locus 4q27, se trouve dans une région génomique souvent amplifiée notamment dans les cancers colorectaux, pancréatique, prostatique et les lymphomes [211]. À ce jour, aucune mutation somatique du gène *FGF2* n'a été rapportée dans les cancers. Sur le plan épigénétique, son promoteur est fréquemment hypométhylé et les histones présentent des marques d'activation[212]. La transcription de *FGF2* est stimulée par des oncogènes comme Ras[213]. Les cytokines pro-inflammatoires augmentent aussi son expression. La production de FGF-2 est réalisée par les cellules tumorales elles-mêmes, les EC mais aussi les fibroblastes et les macrophages recrutés sur le site tumoral. Une précédente étude suggère même que le FGF-2 favoriserait lui-même la polarisation des macrophages vers un phénotype pro-tumoral et pro-angiogénique, sécréteurs de FGF2[214]. Pour finir, la biodisponibilité de FGF-2 est favorisée par le remodelage de la MEC. Les MMPs libèrent le FGF-2 piégé dans la matrice. Ces augmentations corrèlent avec le risque accru de récidive tumorale[215].

Dérégulations de FGFR-1 :

FGFR-1 constitue le principal récepteur des EC et son expression est significativement augmentée dans les contextes tumoraux. Les modulations endothéliales relèvent plutôt de régulation transcriptionnelle, induites par le microenvironnement tumoral façonné par les cellules cancéreuses. Parmi elles, l'hypoxie via HIF-1α, l'inflammation et la rigidité de la MEC activent le promoteur de FGFR-1 [216,217].

Dérégulations de la PTX3 :

La PTX3 présente un rôle ambivalent dans le cancer et dépendant du contexte tumoral et du microenvironnement (**Figure 34**).

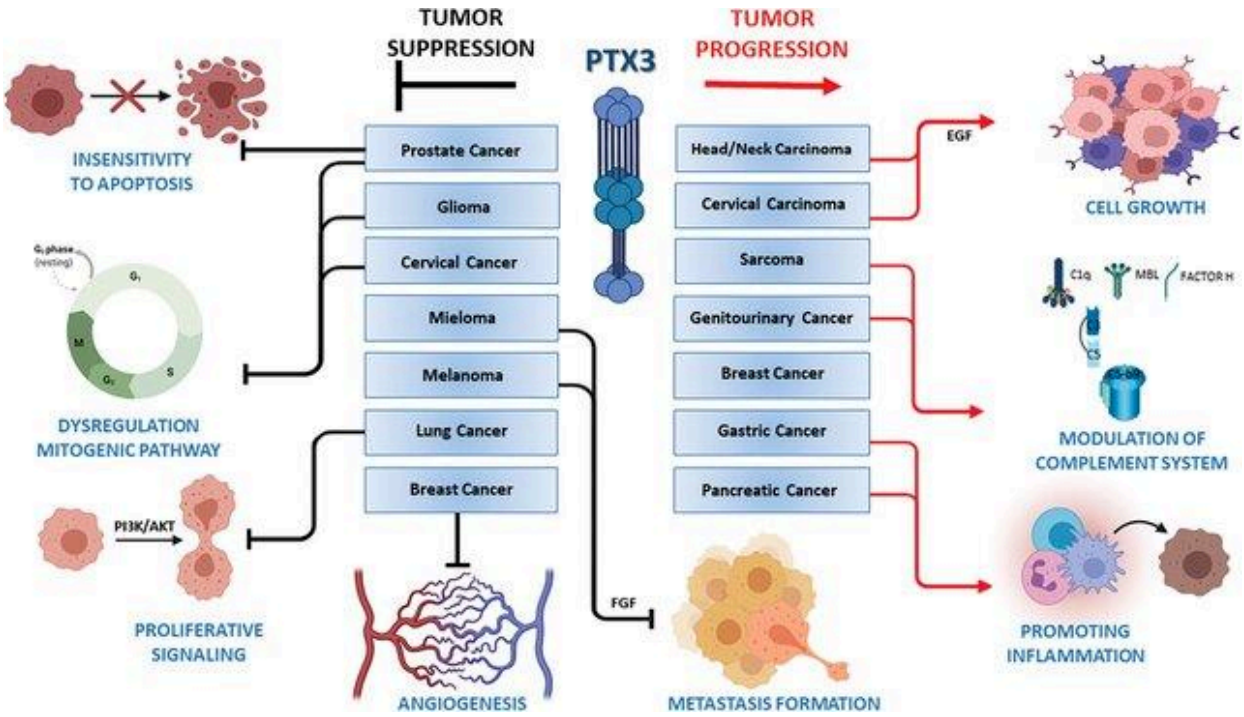


Figure 34: Rôle ambivalent de PTX3 dans le cancer[218]

La PTX3 est oncosuppressive dans les cancers peu inflammatoires et très dépendants de la voie des FGF. En bloquant le FGF-2, elle lève l'insensibilité des cellules tumorales à l'apoptose et réduit leur signalisation. C'est un puissant inhibiteur de l'angiogenèse, ce qui participe à la réduction de la croissance tumorale et de la formation des métastases. À l'inverse, elle est plutôt pro-tumorale dans les cancers très inflammatoires et peu dépendants de la voie des FGF. Par l'inflammation chronique qu'elle entretient, elle favorise la croissance et l'agressivité tumorale.

Dans les cancers très inflammatoires, la PTX3 est pro-tumorale. C'est par exemple le cas dans le cancer du pancréas, le cancer gastrique ou encore les cancers gynécologiques. Sa région N-terminale interagit avec le CD44 des leucocytes ce qui favorise leur recrutement et leur activation. Eux-mêmes sont producteurs de PTX3. L'inflammation chronique constitue l'un des moteurs principaux de la transformation et de la progression tumorale[218].

À l'inverse dans les contextes tumoraux moins inflammatoires et très dépendants du FGF-2, elle est antitumorale. C'est par exemple le cas dans le cancer du sein, le mélanome, le carcinome œsophagien et le fibrosarcome. Des souris déficientes pour PTX3 sont prédisposées à la carcinogenèse épithéliale et mésenchymateuse[219]. Sa liaison au FGF-2 empêche l'activation pro-angiogénique et pro-tumorale des FGFR des cellules tumorales et des EC. Elle limite la néovascularisation et la croissance tumorale. Initialement produite par les cellules myéloïdes (macrophages, neutrophiles, monocytes), les fibroblastes et les EC, son expression est souvent réprimée par hyperméthylation de l'ADN de son promoteur, et par régulation négative via des facteurs oncogéniques dans les cancers[136]. Par exemple,

dans le carcinome œsophagien, 85% des tumeurs présentent une hyperméthylation du promoteur, versus 25% dans les tissus normaux[220].

Dans le cancer du sein, des analyses provenant de *Human Protein Atlas* et de la base de données *TCGA* montrent une meilleure survie globale des patients présentant une forte expression de PTX3 (**Figure 35**). Dans le mélanome et le fibrosarcome, la restauration de PTX3 en modèles pré-cliniques réduit la vascularisation et la progression tumorale, ce qui souligne son potentiel rôle oncosuppresseur[221,222].

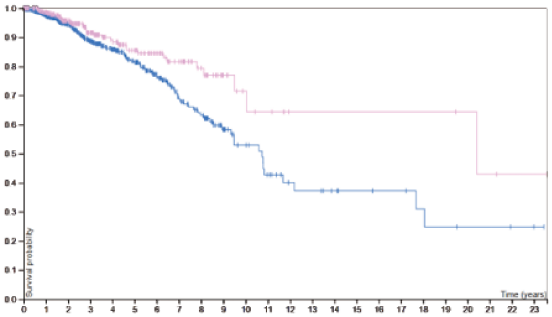


Figure 35: Survie des patients atteints de cancer du sein selon leur profil PTX3

Rose : expression forte de PTX3. Bleu : expression faible de PTX3.

Disponible sur Human Protein Atlas

- **Dérégulation de la voie des IGF et de ses partenaires : exemple de l'axe IGF1-2/IGF1R :**

Dans les tumeurs, l'axe IGF1-2/IGF1R constitue un puissant moteur d'angiogenèse, tandis que son principal modulateur, IGFBP-3 est amoindri, levant le frein sur la biodisponibilité des IGF et exacerbant la néovascularisation.

Dérégulations d'IGF-1 et IGF-2 :

Dans les tumeurs, IGF-1 et IGF-2 sont surproduits par les cellules cancéreuses, ce qui augmente leurs effets pro-survie et pro-angiogéniques. Le taux sérique est d'ailleurs corrélé positivement avec le risque de cancer[223].

L'IGF-1 est fréquemment dérégulé du fait de boucles paracrines qui activent IGF1R et stimulent la tubulogenèse et la migration endothéliale. À l'inverse, la dérégulation d'IGF-2 s'appuie surtout sur des mécanismes épigénétiques et génomiques. La perte d'empreinte du locus 11p15 maternel ainsi que la réactivation des promoteurs fœtaux favorise sa production excessive. Ces phénomènes sont fréquemment observés dans les tumeurs pédiatriques d'origine embryonnaire comme les rhabdomyosarcomes, ou encore dans les hépatocarcinomes[224,225].

Dérégulations du récepteur IGF1R :

Dans l'endothélium tumoral, IGF1R est principalement surexprimé, et rarement muté. Sa forte expression endothéliale rend les EC plus sensibles aux concentrations d'IGF. Cette hausse est associée à l'augmentation de sa transcription par l'hypoxie, l'inflammation ou les dérégulations métaboliques[226].

Dérégulations d'IGFBP-3 :

IGFBP-3 est sous-régulé dans de nombreux cancers par une combinaison de mécanismes transcriptionnels, épigénétiques et post-traductionnels. Dans le cancer du poumon, l'hyperméthylation de son promoteur est fréquente (≥60%) et est associée à un mauvais pronostic et une mauvaise réponse aux chimiothérapies[227]. L'hypoxie prolongée participerait à cette dérégulation épigénétique. La perte de p53, qui contribue à l'activation de sa transcription favorise cette baisse, tout comme la perception de signaux paracrines inhibiteurs[228]. L'activation des MAPK participe notamment à l'inhibition de sa transcription. Aussi, la forte concentration en protéase extra-cellulaires clive IGFBP-3, réduisant son affinité pour les IGF et neutralisant donc fonctionnellement son frein[229].

Les dérégulations des voies VEGF, FGF et IGF, fréquemment observées et prépondérantes dans les cancers, soulignent l'importance de ces mécanismes dans la tumorigenèse et justifient le développement de thérapies ciblées anti-vasculaires.

3.1.4. Thérapies ciblées anti-vasculaires : stratégies et résistances

Parmi les approches thérapeutiques ciblant les vaisseaux tumoraux, deux grandes classes se distinguent : les thérapies anti-angiogéniques et les agents de disruption vasculaire (*Vascular Disrupting Agents*, VDA) (**Figure 36**). Ils visent à faire tomber la balance angiogénique en faveur des facteurs anti-angiogéniques en limitant la formation de néovaisseaux tumoraux ou en détruisant les segments vasculaires déjà formés.

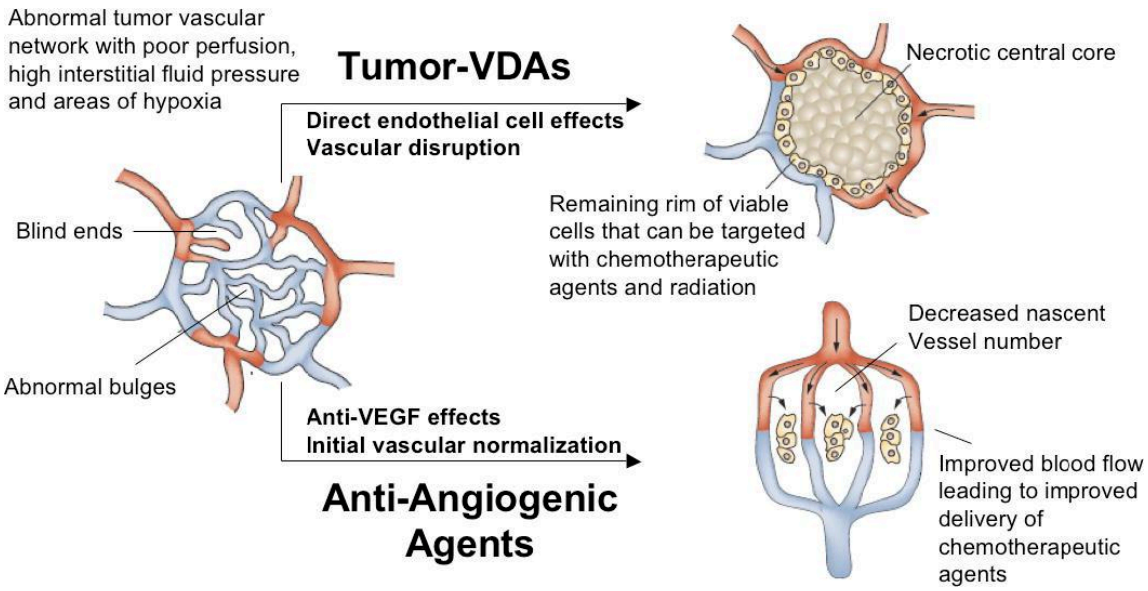


Figure 36: Différences des thérapies anti-angiogénique et agents de disruption vasculaire[230]

Les thérapies anti-angiogéniques neutralisent les voies pro-angiogéniques pour limiter la néo-angiogenèse tumorale. Les thérapies par agents de disruption vasculaire éliminent les vaisseaux tumoraux déjà formés pour favoriser la nécrose des cellules tumorales.

- **Les thérapies anti-angiogéniques** :

Les thérapies anti-angiogéniques visent à inhiber la formation de néovaisseaux tumoraux, en ciblant principalement l'axe VEGF-VEGFR. Le bévacizumab, anticorps monoclonal dirigé contre le VEGF-A a été le premier à être approuvé par la FDA, en combinaison avec le 5-fluorouracile (5-FU), pour le traitement du cancer colorectal métastatique[231,232]. Il a ensuite montré un bénéfice dans le cancer du rein métastatique et le cancer du poumon à grandes cellules[233,234]. En revanche, les résultats ont été décevants dans d'autres cancers (sein métastatique, glioblastome, cancers gastriques et pancréatiques), sans amélioration significative de la survie globale, conduisant parfois à des retraits d'autorisation, comme dans le cancer du sein en 2011[235]. L'aflibercept et la Ramucirumab, des anticorps monoclonaux antagonistes des VEGFRs et du VEGF-A ont donnés des résultats similaires[236,237].

Les FGFR sont aussi ciblés dans des contextes spécifiques (mutations, amplification, fusion) via des inhibiteurs de tyrosine kinase (TKI) sélectifs, mais leur impact direct sur l'angiogenèse tumorale reste secondaire. Ces processus sont notamment associés à l'adaptation tumorale rapide, qui utilise des voies alternatives[238].

Aussi, inspirée du rôle naturel de PTX3 comme piège à FGF-2, la petite molécule NSC12 agit comme trap du FGF et bloque l'interaction entre les FGF et leurs récepteurs[239]. Elle inhibe à la fois la

prolifération des EC et l'angiogenèse pathologique dans plusieurs modèles tumoraux précliniques. Cependant, elle n'a toujours pas été testée en clinique.

Pour dépasser la redondance des voies pro-angiogéniques, des approches plus larges ont été explorées. Certains inhibiteurs de tyrosine kinases sont moins spécifiques et bloquent l'activation de plusieurs récepteurs impliqués dans l'angiogenèse comme les VEGFR, les FGFR et les PDGFR (par exemple le Lenvatinib, le Sunitinib et le Sorafenib). Les résultats sont convaincants dans certains contextes tumoraux comme le carcinome rénal métastatique, mais ils restent limités par une toxicité cumulative[240].

- **Les agents de disruption vasculaire (VDA) :**

Contrairement aux anti-angiogéniques qui bloquent la formation de nouveaux vaisseaux, les VDA détruisent les vaisseaux tumoraux déjà formés, en provoquant un effondrement brutal de la perfusion intra-tumorale et une nécrose ischémique. On distingue : (i) les **poisons du fuseau mitotique** qui déstabilisent le cytosquelette de microtubule dans cellules prolifératives dont les EC tumorales ; (ii) les **agents pro-apoptotiques ciblant** spécifiquement les EC tumorales pour induire l'apoptose.

Les agents inhibant la polymérisation de la tubuline sont actuellement les plus avancés dans les thérapies de disruption vasculaire. Parmi eux, la combretastatine A4-phosphate (CA4P), se lie avec une forte affinité à la sous-unité β-tubuline. Elle bloque les cellules en phase G2/M, ce qui favorise l'arrêt du cycle cellulaire et l'induction d'apoptose. De façon intéressante, elle est efficace à très faible concentration sur les EC tumorales, tout en ayant peu d'effet sur les EC normales, bien que les mécanismes expliquant cette spécificité restent encore mal compris [241–243]. Des bénéfices modestes ont été observés dans le cancer de l'ovaire récidivant, notamment en association avec le Bévacizumab ou le paclitaxel [244].

De nouvelles approches visent aussi à améliorer la spécificité des VDA en combinant des séquences peptidiques ciblant préférentiellement les EC des tumeurs avec des séquences pro-apoptotiques ou des poisons du fuseau mitotique (CA4P). Les EC tumorales expriment le couple d'intégrine $\alpha_v\beta_3$, induit au cours des processus angiogéniques et connu pour sa forte affinité avec le motif peptidique RGD. Des travaux antérieurs ont notamment développé des constructions combinant ce motif RGD à des peptides pro-apoptotiques. Cette stratégie permet l'internalisation sélective de la protéine chimérique via les intégrines, entraînant la dégradation de la membrane mitochondriale et l'induction de l'apoptose spécifiquement dans les EC tumorales [245].

- **<u>Les limitations des thérapies anti-vasculaires :</u>**

Malgré un rationnel biologique solide et des résultats initiaux encourageants, les thérapies anti-vasculaires ont montré une efficacité clinique limitée. Les premiers succès précliniques reposaient sur des modèles murins, souvent restreints à des tumeurs de petite taille ne reproduisant pas la complexité et l'hétérogénéité des vaisseaux tumoraux humains. En clinique, les inhibiteurs des voies pro-angiogéniques n'ont bénéficié qu'à une fraction de patients, offrant le plus souvent un gain transitoire, sans amélioration sur la survie globale. Cette efficacité partielle s'explique par la plasticité vasculaire, notamment une hétérogénéité structurale et fonctionnelle des vaisseaux tumoraux, la persistance de vaisseaux plus matures, l'activation de voies pro-angiogéniques alternatives et une reprogrammation métabolique des EC. S'y ajoute des mécanismes indépendants de l'angiogenèse, comme la co-option vasculaire, insensible aux thérapies anti-angiogéniques et aux VDA. Les VDA présentent aussi des contraintes supplémentaires. Ils sont inefficaces sur les vaisseaux co-optés, sur les vaisseaux en périphérie tumorale et sur les vaisseaux de gros calibre où l'effondrement luminal est plus difficile. Ils sont en plus marqués par une forte toxicité cardiovasculaire (infarctus)[246].

L'hypoxie induite par la destruction vasculaire active des réponses adaptatives sévères : sélection de clones tumoraux invasifs, recrutement de cellules immunitaires immunosuppressives et pro-angiogéniques et revascularisation rapide à l'arrêt du traitement. Dans ce contexte, des stratégies plus nuancées, visant à normaliser plutôt qu'à détruire la vascularisation tumorale pourraient surmonter une partie de ces limitations.

3.1.5. La normalisation vasculaire

Le concept de normalisation vasculaire, introduit dans les années 2000, repose sur l'idée que la modulation contrôlée de l'angiogenèse tumorale pourrait restaurer partiellement une organisation et une fonctionnalité plus physiologique du réseau vasculaire tumoral. Contrairement aux approches visant une inhibition complète de la croissance vasculaire, la normalisation ne cherche pas à supprimer la vascularisation, mais à en améliorer la structure et la fonctionnalité. Elle vise à réduire l'hypoxie et à améliorer la perfusion des vaisseaux afin de créer une « fenêtre de normalisation » transitoire durant laquelle la perfusion est optimisée pour une meilleure délivrance des traitements systémiques et une reprogrammation du microenvironnement tumoral. Moléculairement, elle cherche à rééquilibrer les signaux pro- et anti-angiogéniques plutôt qu'à les bloquer de façon drastique. Elle repose donc sur une

modulation fine de cibles moléculaires clés, afin de stabiliser les interactions entre EC, péricytes et MEC, tout en réduisant l'inflammation et l'hypoxie associée (**Figure 37**).

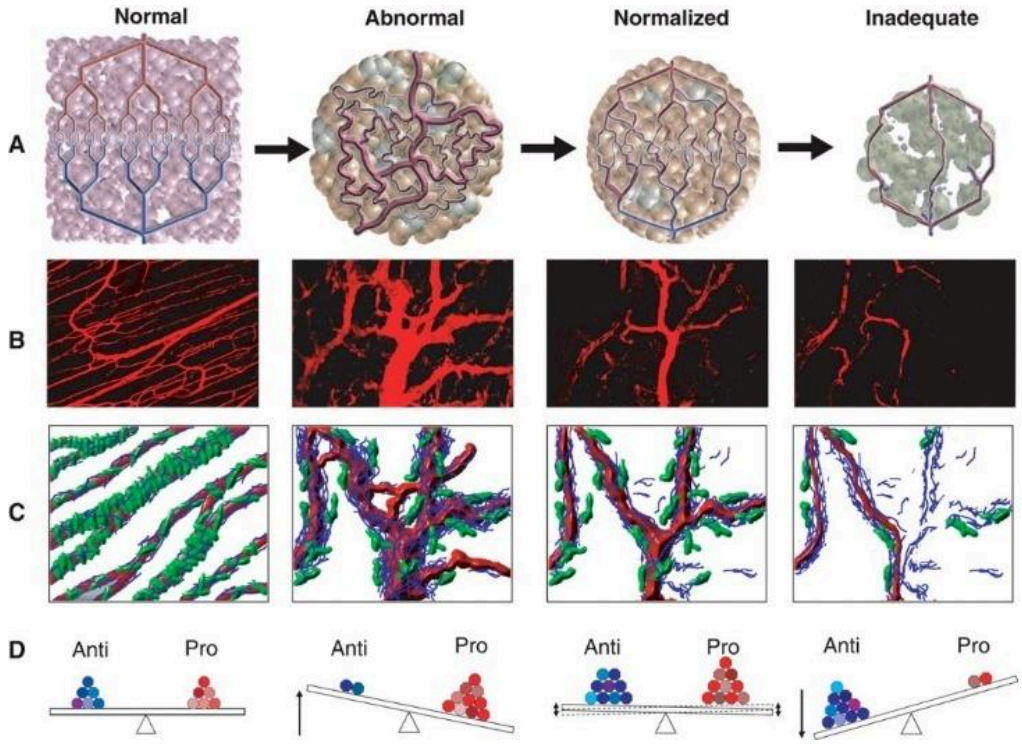


Figure 37: Principes de la normalisation vasculaire comparés à la vascularisation physiologique, tumorale et traitée par thérapie anti-angiogénique [247]

Le réseau vasculaire physiologique est composé de vaisseaux homogènes, linéaires et recouverts de péricytes. Il est dépendant d'un équilibre contrôlé entre facteurs pro- et anti-angiogéniques. La vascularisation tumorale est anarchique à cause de la rupture de l'équilibre angiogénique en faveur des facteurs pro-angiogéniques. La vascularisation normalisée est plus physiologique. Les vaisseaux sont plus linéaires et mieux recouverts de péricytes. Elle résulte d'un rééquilibrage des facteurs angiogéniques, via l'utilisation modérée de traitements anti-angiogéniques. Les anciennes approches anti-angiogéniques visaient à détruire les vaisseaux, en administrant de fortes doses d'anti-angiogéniques.

Les anti-angiogéniques précédemment décrits (**cf.3.1.4**) administrés modérément, tels que les anticorps anti-VEGF ou les inhibiteurs de VEGFR, constituent l'une des approches de normalisation vasculaire les plus étudiées[248]. En réduisant l'excès de signaux pro-angiogéniques, ils favorisent la stabilisation des vaisseaux. Ces traitements peuvent être associés à des agents renforçant les interactions entre les EC et les péricytes, ou combinés à des thérapies anti-fibrotiques visant à diminuer la rigidité et la compression vasculaire. Les analyses histologiques de souris traitées par ce type de stratégie montrent un réseau vasculaire moins hétérogène et moins tortueux (**Figure 37**). Les segments vasculaires très dysmorphiques et très dépendants des facteurs pro-angiogéniques sont éliminés par *pruning*, tandis que les vaisseaux restants poursuivent leur maturation, notamment via une

augmentation de la couverture péricytaire[249]. Ces modifications structurales se traduisent par une diminution de la perméabilité vasculaire et de la pression interstitielle, entraînant une amélioration de la perfusion tumorale et une réduction de l'hypoxie[248,249] (**Figure 38**).

La normalisation vasculaire ne se limite pas à un effet morphologique sur les vaisseaux : elle constitue également un levier fonctionnel majeur. En améliorant la perfusion, elle optimise la distribution des chimiothérapies, tandis que la restauration de l'oxygénation potentialise la réponse à la radiothérapie[248,250]. Ses effets bénéfiques s'étendent aussi au microenvironnement tumoral (**Figure 38**). La réduction de l'hypoxie induit une reprogrammation immunitaire favorable, facilitant le recrutement de cellules antitumorales, comme les lymphocytes T cytotoxiques et les cellules *Natural Killer*. Parallèlement, elle favorise la polarisation des macrophages M2-like pro-tumoraux vers un phénotype M1-like à activité antitumorale, et contribue à la diminution de l'inflammation chronique[251].

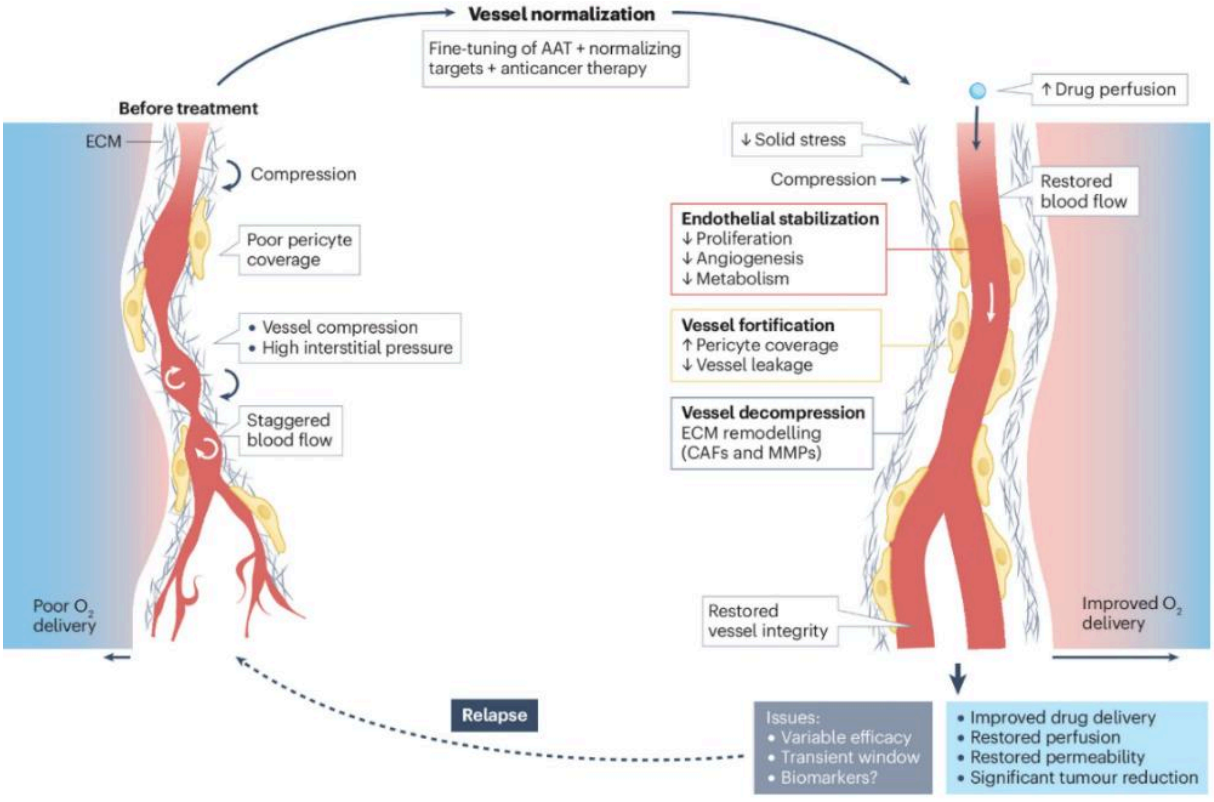


Figure 38: Mécanismes cellulaires et conséquences de la normalisation vasculaire[252]

Les thérapies normalisantes des vaisseaux tumoraux permettent de stabiliser les cellules endothéliales et de fortifier les structures vasculaires. Le microenvironnement périvasculaire est aussi remodelé afin de limiter les compressions des segments vasculaires. Ces phénomènes restaurent un flux sanguin et une perméabilité vasculaire physiologiques ce qui favorise l'oxygénation et la délivrance des traitements.

3.2. Les anomalies vasculaires

La classification moderne des anomalies vasculaires repose sur celle proposée par l'*International Society for the Study of Vascular Anomalies* (ISSVA), qui fait autorité à l'échelle internationale.
Elle distingue deux grandes familles : les malformations et les tumeurs vasculaires[253]. Les malformations vasculaires résultent d'anomalies structurelles congénitales sans prolifération cellulaire active, alors que les tumeurs vasculaires sont caractérisées par une forte prolifération endothéliale.

3.2.1. Les malformations vasculaires

Ce sont des anomalies structurelles des vaisseaux sanguins présentes dès la naissance, mais parfois détectées plus tard. Elles sont dues à un défaut de développement et de maturation des vaisseaux au cours de l'embryogenèse. Dans 95% des cas, elles sont associées à une mutation somatique post-zygotique responsable d'une mosaïque tissulaire. Le moment de leur apparition pendant le développement embryonnaire détermine l'étendue et la sévérité de l'atteinte[254]. Une mutation survenant très tôt, quand les cellules sont encore peu spécialisées sera transmise à un grand nombre de tissus, ce qui entraînera un phénotype plus étendu et sévère. Une mutation apparaissant plus tard quand les cellules sont déjà engagées vers un tissu spécifique donnera une atteinte localisée. Des mutations germinales, plus rares, sont responsables des formes familiales. Les malformations vasculaires résultent fréquemment d'une activation constitutive précoce de voies de signalisation impliquées dans la croissance cellulaire et dans le remodelage vasculaire.

- **<u>Classification :</u>**

L'ISSVA divise les malformations vasculaires en :

- **Malformations simples** (un seul type de vaisseau impliqué) : (i) Capillaires comme les télangiectasies ou les angiomes plans (**Figure 39A**) ; (ii) Veineuses (**Figure 39B**) ; (iii) Lymphatiques (**Figure 39C**) ou Artérioveineuse avec un shunt artérioveineux direct (**Figure 39D**).
- **Malformations combinées** (plusieurs types de vaisseaux impliqués).
- **Malformations associées à d'autres anomalies, syndromique** : comme par exemple Sturge-Weber qui est caractérisé par des malformations simples capillaires, des atteintes oculaires et squelettiques.



Figure 39: Exemple de malformations vasculaires simples

***A**) Télangiectasie (malformation simple capillaire)[255]. **B**) Malformation veineuse d'une main[256]. **C**) Malformation lymphatique dans le cou d'un jeune patient[257]. **D**) Malformation artérioveineuse de la main[258]. Les branches artérielles sont directement connectées aux veines sans le lit capillaire intermédiaire (shunt artérioveineux).*

- **Exemple des mutations somatiques *PIK3CA* :**

Les malformations veineuses et lymphatiques sont fréquemment associées à des mutations activatrices du gène *PIK3CA*, codant pour la sous-unité catalytique p110α de la PI3K. La plus fréquente est la mutation p.H1047R. L'activation permanente de la voie PI3K/AKT/mTOR confère aux EC une survie accrue, et stimule leur croissance, entraînant une hypertrophie locale des segments vasculaires déjà formés[259]. La maturation vasculaire est incomplète, le recrutement des cellules périvasculaires est insuffisant, ce qui rend la paroi instable et fragile. De plus, les jonctions intercellulaires sont moins serrées ce qui favorise l'hyperperméabilité. Cliniquement, ces anomalies se traduisent par des vaisseaux dilatés et tortueux, avec une lésion qui s'étend progressivement au cours de la vie et peut connaître des poussées évolutives lors de la puberté (influence hormonale), de traumatismes ou d'épisodes inflammatoires[260]. Elles sont généralement traitées par thérapies ciblées comme avec des inhibiteurs de mTOR (Sirolimus ou Everolimus) ou des inhibiteurs de la PI3K (Alpelisib) (**Figure 40**)[254].

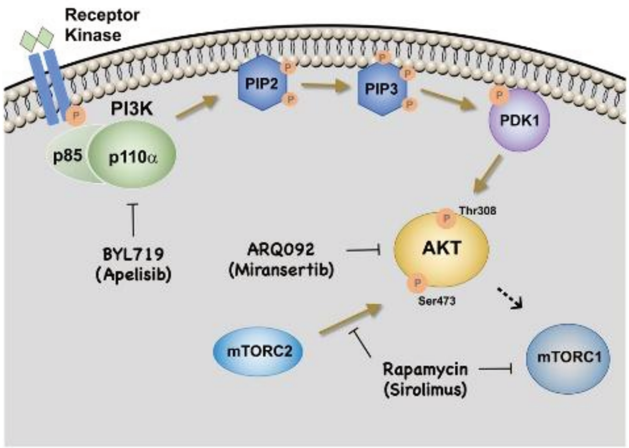


Figure 40: Ciblage de la voie PI3K-Akt-mTOR en cas de mutation *PIK3CA*[259]

Les malformations vasculaires à mutation PIK3CA peuvent être traitées par thérapies ciblées. L'apelisib inhibe l'activité de la sous-unité p110α de la PI3K. Le Miransertib inhibe l'activité de la kinase Akt. Le Sirolimus inhibe l'activité de mTOR.

- **Exemple des mutations somatiques *GNAQ* :**

Les malformations capillaires et le syndrome de Sturge-Weber sont souvent liés à des mutations activatrices du gène *GNAQ*, codant pour la sous-unité αq des petites protéines G trimériques. La mutation récurrente et mosaïque p. Arg183Gln, rendant l'hydrolyse du GTP plus lente, induit une suractivation de Gαq et de ses voies de signalisation en aval, notamment la voie MAPK/ERK[261]. Cette dérégulation entraîne une différenciation incomplète des EC, une mauvaise spécification artérioveineuse avec formation de shunts et une altération des réponses au flux sanguin. Il en résulte une dilatation persistante des capillaires, responsable de manifestations allant de simples lésions cutanées esthétiques (angiomes plans) à des atteintes potentiellement graves lorsqu'elles touchent le système nerveux central[262]. Si nécessaire, elles peuvent être prises en charge avec des thérapies ciblées dirigé contre MEK (Trametinib) ou contre la PKC (Sotrastaurine)[254] (**Figure 41**).

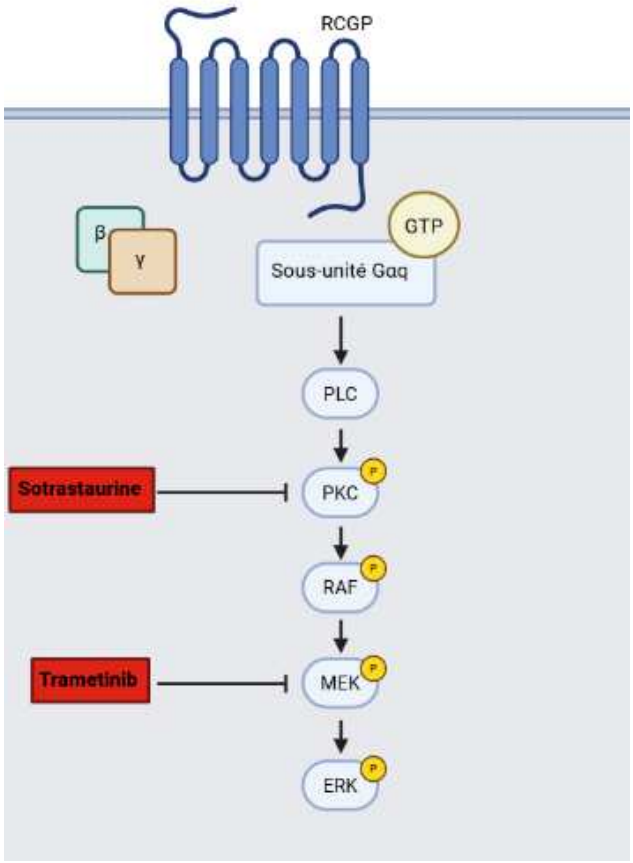


Figure 41: Ciblage de la voie MAPK-ERK en cas de mutation *GNAQ*

Les malformations vasculaires à mutations GNAQ peuvent être traitées par thérapies ciblées de la voie MAPK. La Sotrastaurine inhibe l'activité de la PKC. La Trametinib inhibe l'activité de la kinase kinase MEK. Créé sur Biorender

3.2.2. Les tumeurs vasculaires

Les tumeurs vasculaires sont des lésions caractérisées par une prolifération active et anormale des EC. Les causes exactes sont variables selon le type de tumeur vasculaire. Elle peut être associée à des mutations somatiques et à des facteurs environnementaux (hypoxie, radiations…).

- **<u>Classification :</u>**

L'ISSVA divise les tumeurs vasculaires en :

- **Tumeurs vasculaires bénignes** : comprenant notamment les hémangiomes infantiles (**cf. 4**) ; et les hémangiomes congénitaux (**Figure 42A-C**)
- **Tumeurs vasculaires localement agressive** : comprenant notamment les sarcomes de Kaposi (**Figure 42D**).
- **Tumeurs vasculaires malignes** : comprenant notamment les angiosarcomes (**Figure 42E**).

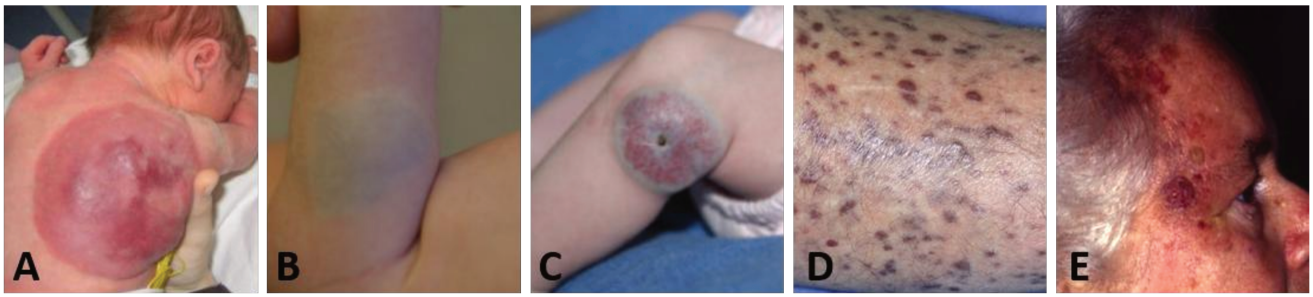


Figure 42: Exemples de tumeurs vasculaires

***A-C**) Hémangiomes congénitaux (A-RICH, B- NICH, C-PICH)[263]. **D**) Sarcome de Kaposi de la jambe[264]. **E**) Angiosarcome.*

- **<u>Exemple des hémangiomes congénitaux :</u>**

Les hémangiomes congénitaux sont des tumeurs vasculaires bénignes rares et présentes dès la naissance, dont la prolifération endothéliale se produit *in utero* et cesse après l'accouchement. Ils se manifestent sous forme de masses vasculaires sous-cutanées bien délimitées, de teinte rouge à violacée. Trois formes cliniques sont décrites : (i) les hémangiomes rapidement involutifs (*RICH,* **Figure 42*A***) qui régressent spontanément en quelques mois ; (ii) les hémangiomes non involutifs (*NICH,* **Figure 42*B***) qui persistent sans régression ; et les formes à involution partielle (*PICH,* **Figure 42*C***)[263]. 75% des cas sont associés à des mutations somatiques activatrices du gène *GNAQ*, la plus fréquente étant la mutation p. Q209L[265]. Localisée sur un résidu critique pour l'hydrolyse du GTP de la sous-unité

Gαq, cette mutation abolit l'efficacité des GTPase en maintenant la protéine et la voie des MAPK/ERK dans un état actif. Les mécanismes conduisant à la stabilisation ou à la régression restent cependant mal élucidés. Une proportion non-négligeable ne présente pas de mutations à ce jour identifiées, ce qui suggère aussi des mécanismes alternatifs, ou des altérations encore non identifiées. Si nécessaire, la prise en charge thérapeutique passe généralement par l'exérèse de la tumeur[263].

4. L'HÉMANGIOME INFANTILE

Dans ce travail, l'HI représente un modèle particulièrement intéressant pour étudier les mécanismes de régression vasculaire. Contrairement à la plupart des tumeurs où l'angiogenèse pathologique persiste, l'HI se distingue par une évolution spontanée. Cette capacité unique à inverser un processus angiogénique actif en fait un modèle pour comprendre comment un tissu peut rétablir son équilibre vasculaire. Etudier la physiopathologie de l'HI offre ainsi une opportunité rare d'explorer les programmes biologiques capables de freiner, stabiliser puis remodeler un réseau vasculaire immature. Il est donc essentiel de revenir sur les connaissances actuelles concernant cette pathologie afin d'en dégager les éléments clés susceptibles d'expliquer sa capacité unique à régresser spontanément.

4.1. Présentation, caractéristiques et complications cliniques

4.1.1. Epidémiologie et facteurs de risques

L'hémangiome infantile (HI) est la tumeur bénigne la plus fréquente du nourrisson, touchant environ 4 % des enfants, avec une prédominance marquée chez les populations caucasiennes et chez les filles (3 :1) [266]. Plusieurs facteurs de risque ont été identifiés parmi lesquels la prématurité et le faible poids à la naissance sont les plus fortement associés [267]. La prévalence augmente jusqu'à 30% chez les enfants de moins de 1kg[268,269]. Les grossesses multiples, certaines complications placentaires, les situations d'hypoxie périnatale constituent également des facteurs contributifs [270]. Les HI ne se développent pas exclusivement sous la peau, bien que les HI cutanés représentent jusqu'à 80% des cas, en particulier au niveau de la tête et du cou (60%), du tronc (25%) et des membres (15%)[271]. Les hémangiomes hépatiques sont ensuite les plus communs, la localisation viscérale ou osseuse est plus rare.

4.1.2. Classification

Les HI peuvent être classés selon leur profondeur, leur morphologie et leur extension topographique. On distingue les HI superficiels (50 à 60% des HI), qui siègent principalement dans le derme papillaire et se traduisent cliniquement par des lésions rouges, planes ou légèrement surélevées, à l'aspect dit « en fraise » (**Figure 43A**). Les HI profonds (15% des HI), localisés dans le derme réticulaire et dans l'hypoderme apparaissent plutôt sous forme de masses sous-cutanées, de couleur bleutée (**Figure**

43B). Il existe également des formes mixtes (25 à 35%), comportant à la fois une composante superficielle et profonde (**Figure 43C**)[272].

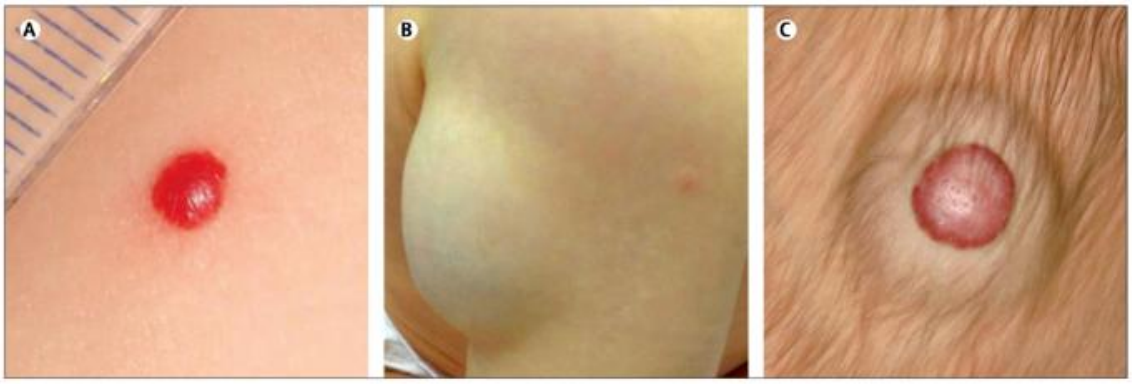


Figure 43: Classification morphologique des HI[273]

A) *HI superficiel, localisé dans le derme papillaire* ***B)*** *HI profond localisé dans le derme réticulaire et l'hypoderme* ***C)*** *HI mixte, localisé dans le derme papillaire, réticulaire et hypoderme.*

Sur le plan topographique, les HI localisés correspondent à de petites lésions nodulaires. Ils représentent 67% des cas[274]. Les HI multifocaux présentent plusieurs lésions distinctes et les HI segmentaires correspondent à des plaques étendues. Cette classification désormais standardisée est essentielle pour guider la prise en charge et la surveillance clinique de cette tumeur.

4.1.3. Diagnostic

Le diagnostic des HI repose principalement sur l'historique naturel du patient et de la lésion, ainsi que de l'examen clinique réalisé par un dermatologue. Leur aspect, leur localisation et leur évolution typique permettent généralement un diagnostic sans examen complémentaire. À la palpation, la lésion est souple, compressible et souvent chaude. Elle n'est ni douloureuse, ni inflammatoire sauf en cas d'ulcération [272]. Dans les cas atypiques, l'évaluation clinique est multidisciplinaire, complétée si besoin par imagerie médicale et endoscopie. L'échographie Doppler différencie les HI des malformations artérioveineuses et l'IRM précise l'extension des formes profondes [275]. La biopsie, rare, est réservée aux formes douteuses avec analyse du marqueur GLUT-1, pour exclure un sarcome [272]. Enfin, les HI péri-oculaires nécessitent un avis ophtalmologique systématique, même en cas d'atteinte modérée en raison du risque de séquelles visuelles.

4.1.4. Cycle tumoral

L'HI suit un cycle tumoral bien caractérisé en deux phases : la phase proliférative et involutive (**Figure 44**).

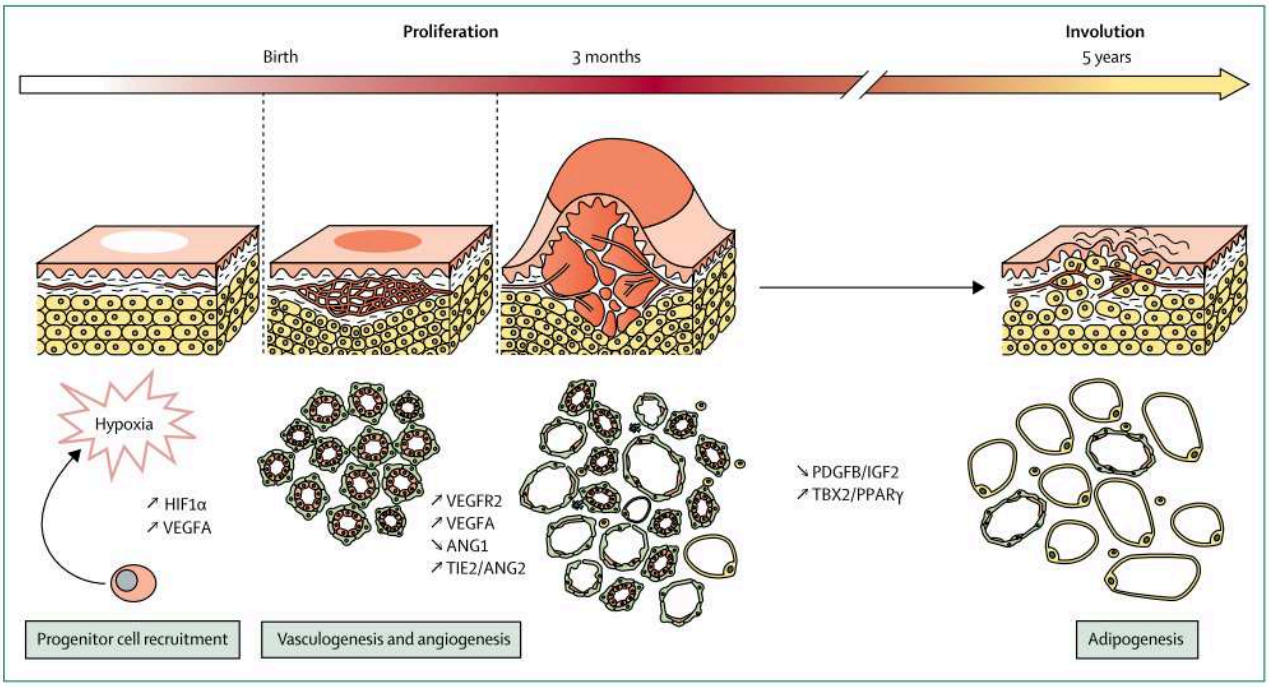


Figure 44: Les phases du cycle tumoral de l'HI [273]

L'HI est caractérisé par son cycle unique. La phase de prolifération démarre quelques semaines suivants la naissance. Elle se définie par la prolifération excessive des EC, en réponse à de fortes concentrations en facteur pro-angiogéniques comme le VEGF-A, le FGF-2 et l'IGF-2. Ensuite, la tumeur se stabilise, la prolifération s'arrête puis la tumeur rentre dans une seconde phase, nommée involution. L'involution se caractérise par la régression progressive des capillaires lésionnels et leur remplacement par du tissu cicatriciel. C'est une phase qui s'étend parfois jusqu'à 7-8 ans.

La **phase proliférative** de l'HI survient peu après la naissance durant les 6 à 12 premiers mois de vie et est marquée par une croissance rapide de la lésion. La tumeur apparaît comme une masse rouge vif. Histologiquement, cette phase est caractérisée par une prolifération intense des EC, formant des capillaires étroits et densément regroupés, souvent immatures, au sein d'un stroma richement cellulaire (**Figure 45A-D**). L'architecture vasculaire est désorganisée, sans lumière bien définie[276]. Sur le plan moléculaire, cette prolifération est soutenue par la surexpression de facteurs pro-angiogéniques comme le VEGF-A, le FGF-2, la noradrénaline, l'IGF-2 ou le PDGF[277,278].

La **phase d'involution** débute généralement autour de 12 mois et peut se prolonger pendant plusieurs années, jusqu'à l'âge de 5 à 10 ans. Sur le plan clinique, elle se manifeste par un ralentissement, puis un arrêt de la croissance de la lésion, qui devient progressivement plus pâle, moins tendue et plus souple au toucher. La masse s'aplatit peu à peu et son volume diminue, traduisant la régression du tissu vasculaire. Ce processus s'accompagne d'un remplacement du tissu tumoral par un tissu fibro-adipeux cicatriciel[273]. Histologiquement, on observe une réduction progressive du nombre de lumières vasculaires (**Figure 45B-E**). Celles qui persistent, encore positives pour le marqueur GLUT-1, deviennent plus larges et mieux structurées, tandis que le tissu adipeux vient occuper l'espace laissé par le compartiment vasculaire (**Figure 45 C-F**). Sur le plan moléculaire, cette régression s'accompagne d'une baisse progressive des signaux pro-angiogéniques.

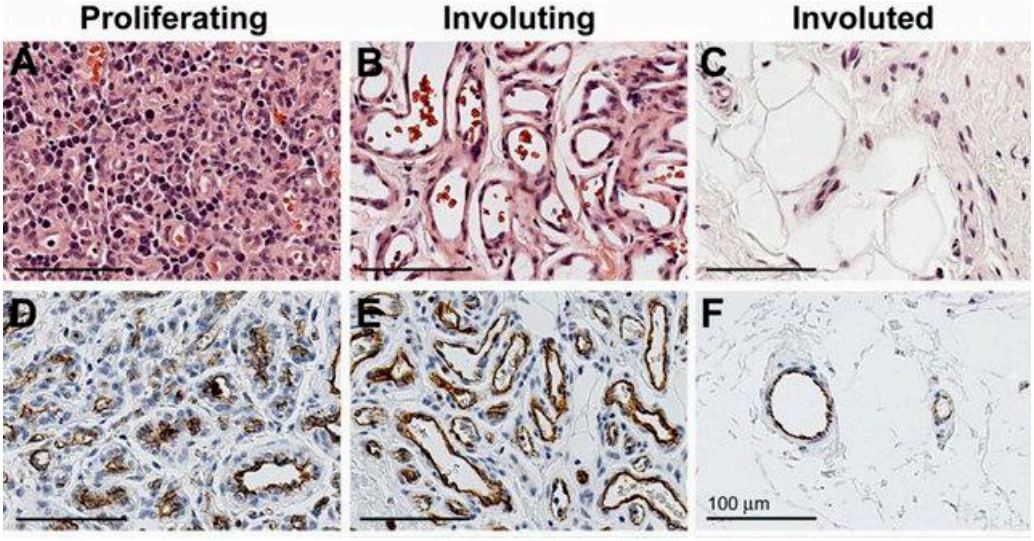


Figure 45: Histologie de l'HI pendant son cycle tumoral[279]

A-C) *Coloration hématoxyline-éosine de coupes FFPE d'HI prolifératif (A), involutif (B) et involué (C).* ***D-F)*** *Immunohistochimie de GLUT-1 de coupes FFPE d'HI prolifératif (D), involutif (E) et involué (F). Echelle, 100µm*

4.1.5. Conséquences cliniques

Les risques associés aux HI varient selon leur localisation anatomique, leur taille, leur profondeur et leur vitesse de croissance. Bien que la majorité des HI soient sans conséquence et qu'ils régressent spontanément, 10% d'entre eux, considérés comme sévères, peuvent entraîner des complications fonctionnelles, esthétiques voire vitales (**Figure 46**).

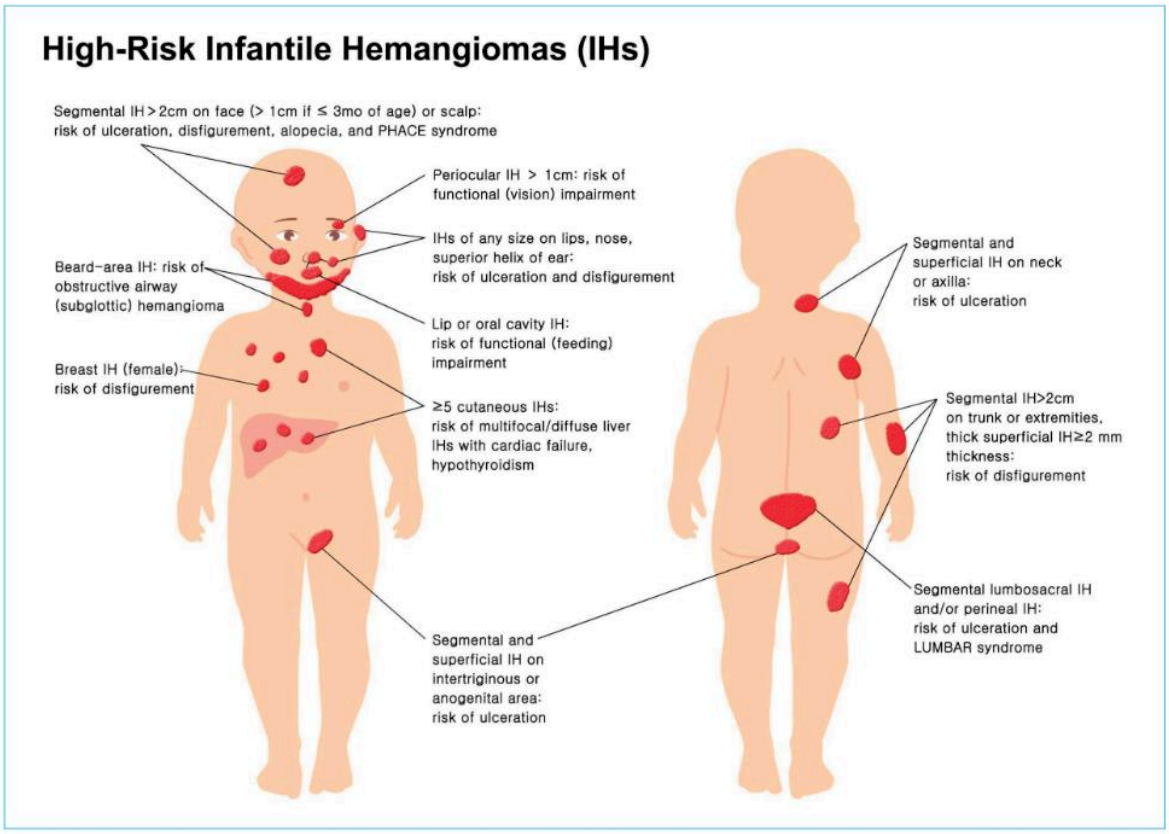


Figure 46: Localisation récurrente des hémangiomes sévères

Dans les formes les plus sévères, les HI peuvent engager le **pronostic vital** de l'enfant. C'est notamment le cas des HI profonds ou segmentaires situés dans la région de la barbe ou au niveau sub-glottique. Ils peuvent entraîner une obstruction des voies aériennes supérieures, représentant 1.4% des HI sévères[280]. Ils se manifestent autour de l'âge de 2 à 4 mois par des signes respiratoires évocateurs. Par ailleurs, la présence de plus de 5 HI cutanés doit évoquer la possibilité d'HI hépatiques. Ces derniers peuvent être responsables de complications systémiques graves.

Les HI peuvent aussi être la source de **lourdes atteintes fonctionnelles**, compromettant les sens essentiels et les fonctions primaires de l'enfant. Lorsqu'ils sont localisés dans la région péri-orale, ils peuvent altérer la succion, la déglutition et plus tard l'élocution. Les HI situés en région périorbitaire peuvent provoquer des troubles visuels. Dans les cas extrêmes, une compression du nerf optique peut même entraîner la cécité. En région péri-auriculaire ou mastoïdienne, ils peuvent obstruer le conduit auditif externe induisant une perte d'audition. Plus rarement, les HI situés à proximité des articulations peuvent entraîner une limitation de l'amplitude des mouvements [281,282].

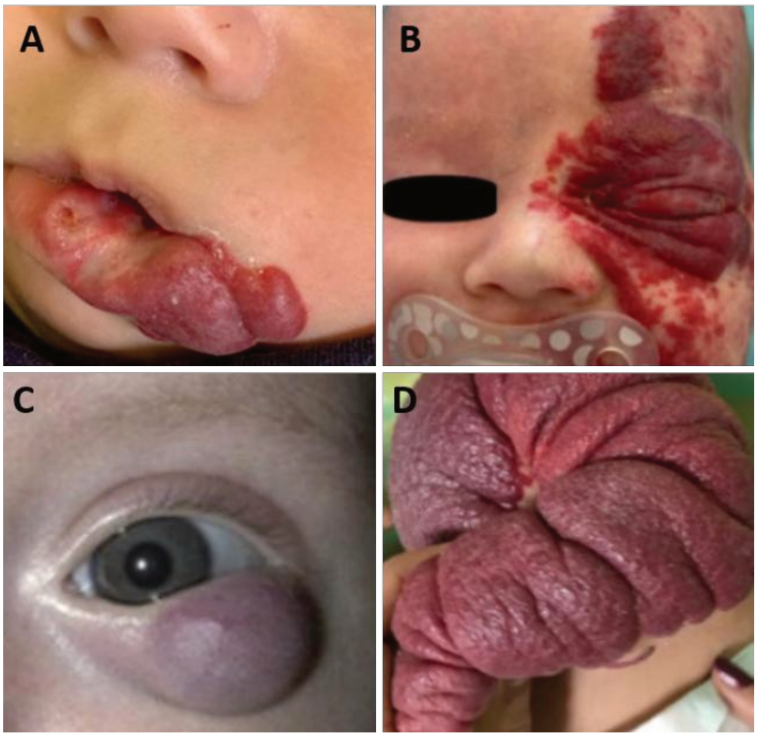


Figure 47: Exemples d'HI sévères

A) *HI de la lèvre inférieure, avec ulcération* ***B)*** *HI segmentaire de la région péri-oculaire* ***C)*** *HI localisé de la région péri-oculaire.* ***D)*** *HI segmentaire du bras entier. Adapté de Resic et al (A, B, D)*[283] *et Callahan et al (B)*[284].

L'**ulcération** est la complication la plus fréquente de l'HI, constituant jusqu'à 20% des cas [285–287]. Elle touche majoritairement les jeunes patients de moins d'un an, durant la phase de prolifération tumorale intense, surtout dans les HI superficiels de plus de 2 centimètres [273]. Certaines localisations sont plus à risque notamment les zones soumises aux frottements, à la macération et à l'humidité. L'ulcération se manifeste par une rupture de la barrière cutanée et peut être profonde. C'est un phénomène douloureux, source d'infection, de saignements et de cicatrices inesthétiques [286,288].

Pour finir, les **contraintes esthétiques** liées aux HI représentent un enjeu majeur, notamment quand ils sont volumineux, ulcérés ou situés dans des zones exposées. Bien que la plupart des HI régressent spontanément, l'involution laisse place à des séquelles cutanées permanentes dans 50 à 70% des cas. Ces séquelles peuvent prendre différentes formes, notamment une peau plissée (**Figure 48B**), atrophique ou fibreuse, des zones de dépigmentation ou d'hyperpigmentation, des télangiectasies persistantes (**Figure 48A**) ou des replis cutanés résiduels liés à l'étirement prolongé de la peau. Ces altérations peuvent créer des asymétries faciales ou des déformations localisées.

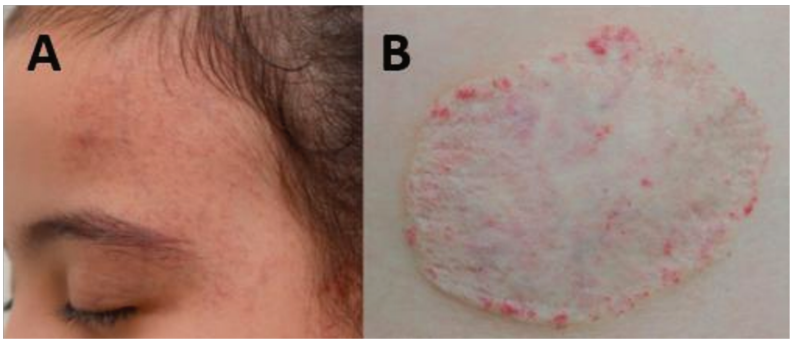


Figure 48: Exemple de séquelles esthétiques d'HI involués [289]

A) *Télangiectasie, petits vaisseaux visibles en surface de la peau* ***B)*** *Tissu fibro-adipeux lâche*

4.2. Stratégies thérapeutiques

Plusieurs outils cliniques ont été développés afin d'aider les cliniciens à choisir la prise en charge thérapeutique la plus adaptée. C'est par exemple le cas de l'outil en ligne et gratuits IHReS (*Infantile Hemangioma Referral Score*)[290] ou encore *DeepIH* un outil assisté par intelligence artificielle[291].

4.2.1. Traitements médicamenteux

Les prises en charge médicamenteuses constituent aujourd'hui la première ligne de traitement des HI. Elles offrent des options efficaces et moins invasives pour contrôler leur croissance et favoriser leur régression.

- **<u>Le propranolol, un β-bloquant non sélectif</u> :**

Historiquement, les corticoïdes constituaient le traitement de première intention des HI, bien que leur efficacité soit souvent limitée et leur profil d'effets secondaires préoccupant. En 2008, Christine Léauté-Labrèze, dermatologue du CHU de Bordeaux, rapporte le cas d'un enfant porteur d'un HI péri-nasal réfractaire aux corticoïdes, qui développa une cardiomyopathie hypertrophique obstructive, complication connue de la prednisolone. Ce patient fut traité par le propranolol, un β-bloquant non sélectif utilisé en cardiologie, autorisé en pédiatrie. Il présenta une régression spectaculaire de la lésion dès la première administration, avec une disparition quasi-totale à 14 mois. Un second cas clinique, présentant un HI étendu sévère montra également une amélioration majeure sous propranolol, avec une réduction rapide des symptômes obstructifs et une quasi-disparition des lésions vasculaires après plusieurs mois de traitement [292] (**Figure 49**). Ces observations encourageantes sur 11 enfants ont

conduit à la réalisation d'un essai clinique multicentrique, randomisé, incluant 450 autres patients. Les résultats démontrèrent une amélioration chez 88% des patients traités, avec 75% d'entre eux présentant une régression totale [293]. En 2014, la FDA approuve officiellement son utilisation dans le traitement des HI sévères et compliqués, sous la forme d'un médicament oral spécifique, l'Hémangeol®. Aujourd'hui, c'est encore le seul traitement officiellement approuvé.



Figure 49: Evolution du second enfant traité par propranolol[292]

A) *Enfant à 9 semaines, avant le traitement au propranolol et après 4 semaines de traitements aux corticoïdes.* ***B)*** *Enfant à 10 semaines, après 7 jours de traitement au propranolol.* ***C)****Enfant à 6 mois, sous propranolol.* ***D)*** *Enfant à 9 mois, arrêt du propranolol.*

Une posologie de 1 à 3mg/kg/jour, répartie en deux prises, est généralement recommandée sur une durée de 12 mois. L'efficacité du traitement dépend de la fenêtre temporelle d'administration. Plus le traitement est administré tôt, (avant 10 semaines) plus le propranolol est efficace[294]. Des adaptations posologiques sont nécessaires selon le profil du patient, notamment chez les enfants présentant des HI segmentaires et profonds où la durée du traitement peut être prolongée jusqu'à 24 mois, sous risque de rechute[295]. Les résistances sont rares (≤1%) et sont en réalité souvent associées à l'initiation trop tardive du traitement. L'arrêt du propranolol est réalisé progressivement, une régression complète étant vérifiée par échographie Doppler [296].

Par sa découverte fortuite, les mécanismes moléculaires d'action du propranolol ne sont pas encore totalement élucidés. Plusieurs pistes ont été proposées pour expliquer son effet. En bloquant les récepteurs β-adrénergiques, il induit une vasoconstriction rapide des vaisseaux atténuant la rougeur de la lésion, il limite la production de facteurs pro-angiogéniques comme le VEGF, l'angiotensine II et le FGF-2[297,298] et de MMP comme MMP-2 et MMP-9[299]. Le propranolol neutraliserait l'effet de la noradrénaline, cytokine pro-angiogénique et ligand naturel des récepteurs adrénergiques[278]. Il semblerait aussi induire une apoptose légère des EC, réduisant progressivement la masse tumorale, mais il reste peu cytotoxique aux doses cliniques ($[Propranolol]_{plasma} \leq 0.5\mu M$)[300].

Pour finir, le propranolol présente un profil de sécurité favorable, quelques rares cas d'effets secondaires ont été rapportés. Ils incluent des épisodes de bradycardie (0.1%), d'hypotension (0.1%), d'hypoglycémie (0.6%) et des bronchospasmes (12.9%)[301]. L'effet le plus communément rapporté concerne les troubles du sommeil, affectant environ 20% des enfants et se traduisant par une augmentation des cauchemars[302]. Ce phénomène s'explique en partie par la structure lipophile du propranolol, qui facilite son passage à travers la barrière hémato-encéphalique. Par ailleurs, aucun effet sur le neurodéveloppement n'a été démontré[301]. Bien que faibles, ces risques nécessitent une surveillance clinique attentive afin d'adapter le traitement et d'assurer une prise en charge sécurisée.

- **<u>Autres β-bloquants</u> :**

Parmi les alternatives au propranolol, le timolol maléate a suscité un intérêt croissant pour le traitement des HI. Ce β-bloquant non sélectif est prescrit dans le traitement du glaucome, depuis 2010. Administré sous forme de gel ou de collyre à 0.5% deux fois par jour, il permet une amélioration clinique de 93% des patients porteurs d'HI [303]. Cependant, malgré son application locale, plusieurs travaux ont montré des taux détectables de timolol dans les urines et le plasma des patients, témoignant d'un passage systémique. Il est uniquement efficace sur des HI superficiel de moins d'1 millimètre [304,305].

L'aténolol, un β-bloquant préférentiellement sélectif des récepteurs adrénergiques β1 est une alternative intéressante chez les enfants présentant une contre-indication au propranolol, en raison du moindre risque de bronchospasme et d'hypoglycémie (associé à l'inhibition du récepteur β2). Une étude portant sur 76 enfants traités par voie orale a montré une bonne efficacité, avec un arrêt de prolifération chez 93.4% des patients[306].

- **<u>Autres traitements pharmacologiques</u> :**

Avant l'usage des β-bloquants, les corticoïdes systémiques étaient les traitements de référence des HI, grâce à leur action anti-inflammatoire et anti-angiogénique, qui limitent la prolifération des EC. Leur usage est aujourd'hui réservé aux formes sévères ou aux patients présentant des contre-indications aux β-bloquants. La prednisolone et la bétaméthasone ont été les plus couramment utilisées, avec des posologies comprises entre 2 et 5 mg/kg/jour, réparties en trois prises quotidiennes, sur une durée de 4 à 12 semaines. Cependant, la réponse thérapeutique est souvent modérée et hétérogène. De plus, même un traitement de courte durée expose à des effets secondaires majeurs, notamment une augmentation du risque d'infections, un retard de croissance (40%), des ulcères gastriques (20%) ainsi que des complications cardiovasculaires et artérioveineuses[307].

Le Sirolimus, un inhibiteur de la voie mTOR, représente une option thérapeutique émergeante dans le traitement des HI complexes et réfractaires. Par son action antiproliférative et anti-angiogénique il cible les mécanismes cellulaires de la croissance tumorale[308].

Par ailleurs, les interférons et la vincristine, utilisés historiquement sont délaissés en raison de leurs effets secondaires sévères[307,309].

4.2.2. Traitements non-médicamenteux : le laser et la chirurgie

Parmi les différentes méthodes de prise en charge, les traitements non médicamenteux reposent sur des approches ciblées comme le laser ou la chirurgie, notamment dans les formes résiduelles, ulcérées ou a conséquences fonctionnelles et esthétiques.

- **<u>Le laser :</u>**

Cette approche repose sur le principe de photo-thermolyse sélective : une longueur d'onde spécifique est absorbée par un chromophore cible, ici les hémoglobines, entraînant une élévation thermique localisée et la destruction des structures vasculaires [310]. Deux classes de lasers sont principalement utilisées. Le laser à colorant pulsé (*Pulse Dye Laser, PDL*), émettant à 595nm, cible du premier pic d'absorption des hémoglobines (**Figure 7**). Son efficacité est estimée de 80% chez les patients, dans les 7 à 14 jours suivant le traitement[311,312]. Toutefois, sa faible longueur d'onde limite sa pénétration cutanée à quelques millimètres, restreignant son usage aux HI superficiels. À l'inverse, le laser Nd : YAG (*Long Pulse Laser*), fonctionnant dans l'infra-rouge à 1064nm (second pic), permet une pénétration jusqu'à 10 millimètres et est adapté aux HI profonds. Une étude menée en 2011 sur 77 enfants a rapporté une réponse positive chez 96% des patients traités (**Figure 50**).

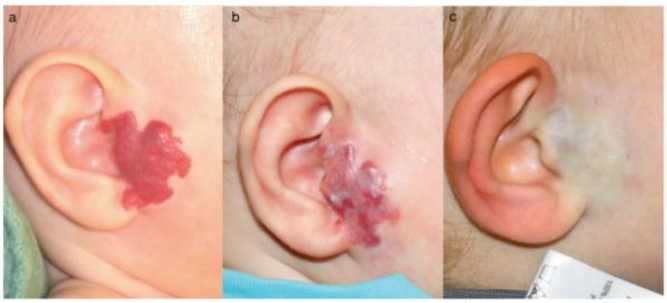


Figure 50: Evolution d'un HI péri-auriculaire traité par Nd:YAG [313]

Néanmoins, l'absorption du faisceau laser par les mélanines épidermiques, combinée à la haute intensité énergétique utilisée peut entraîner des effets secondaires tels que les brûlures, ampoules ou œdèmes. Les séances peuvent être réalisées sous anesthésie locale, espacées de plusieurs semaines et accompagnées par des soins topiques limitant l'inflammation [311,314].

- **La chirurgie :**

La chirurgie est aujourd'hui plus rarement pratiquée en raison de son caractère invasif, du risque opératoire et également de l'efficacité du traitement oral actuel. Elle demeure toutefois indiquée dans certaines situations spécifiques, notamment en cas de menace vitale, d'atteintes fonctionnelles sévères, d'ulcérations, de tissus résiduels persistants ou de formes réfractaires aux traitements pharmacologiques. Elle est d'ailleurs fréquemment envisagée pour les HI péri-nasaux [315].

Les approches physiques présentent l'avantage d'une action locale, limitant les effets systémiques. Toutefois, leur caractère invasif, leur incompatibilité à certaines formes d'HI et les risques hémorragiques en phase proliférative restreignent leur utilisation à des indications bien ciblées.

4.3. Histologie et composants cellulaires

L'HI se caractérise par une architecture complexe, où l'interaction avec les différents types cellulaires joue un rôle fondamental dans la régulation de sa croissance et sa régression. Une compréhension fine de l'organisation histologique est essentielle pour appréhender les mécanismes cellulaires sous-jacents.

4.3.1. Les progéniteurs endothéliaux

Dans les HI en phase proliférative, une population rare de cellules progénitrices immatures a pu être isolée à partir d'un tri par billes magnétiques anti-CD133[316]. Le CD133, marqueur classique des cellules souches initiatrices de tumeurs, a permis d'identifier une rare sous-population cellulaire, représentant environ 0.1% à 1% des cellules de l'HI (**Figure 51**).

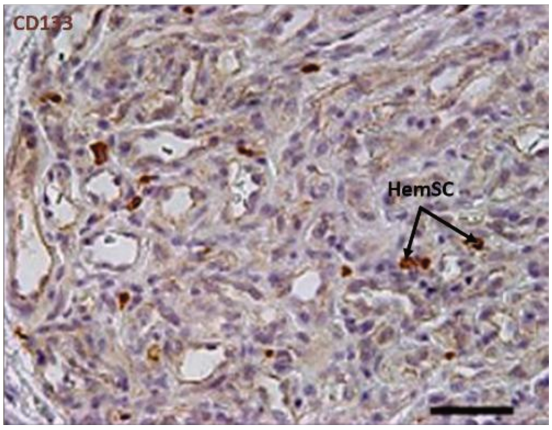


Figure 51: Immunohistochimie de CD133, révélant les cellules souches d'HI[317]

Ces cellules, souvent désignées comme HemSC (*Hemangioma Stem Cells*), présentent des propriétés caractéristiques des cellules souches multipotentes. Elles sont capables de s'auto-renouveler et de se différencier en plusieurs lignages : EC, péricytes et adipocytes (**Figure 52**). Lorsqu'elles sont xénogreffées chez des souris immunodéficientes, elles donnent naissance en 7 jours à des structures vasculaires exprimant GLUT-1. En deux mois, ces structures évoluent spontanément en un tissu adipeux, mimant le processus d'involution observé chez l'enfant[316].

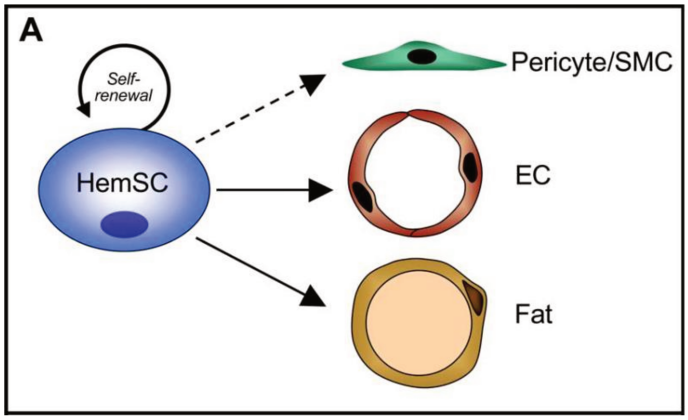


Figure 52: Théorie de la différenciation des HemSC dans l'HI[279]

La cellules souche d'hémangiome peut s'autorenouveler. Elle peut aussi se différencier en EC, péricytes ou adipocytes.

4.3.2. Les cellules endothéliales

Les EC sont les cellules principales et tumorales de l'HI. Sur le plan morphologique et phénotypique, elles présentent des caractéristiques proches de celles observées dans les micro-vaisseaux embryonnaires et fœtaux. Cultivées *in vitro*, elles adoptent une morphologie fusiforme similaire à celle des EC fœtales et montrent une expression faible et diffuse de CD31, une glycoprotéine habituellement abondante à la membrane des EC matures[318]. En revanche, elles expriment fortement d'autres marqueurs endothéliaux tels que CD34, CD105, VEGFR-1 et VEGFR-2, le facteur de von Willebrand (vWF) et la VE-cadhérine[279]. En plus, elles expriment des marqueurs placentaires comme GLUT-1 (**Figure 53**) [319]. Sur le plan fonctionnel, les EC en phase proliférative ont une capacité accrue de migration, de prolifération et de tubulogenèse[318].

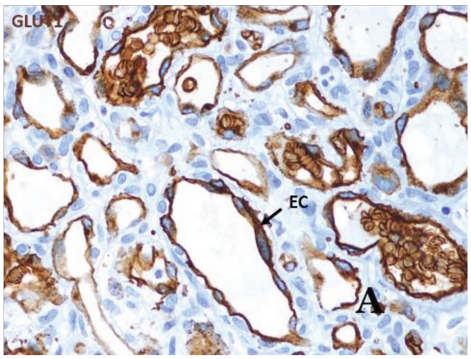


Figure 53: Immunohistochimie de GLUT1, révélant les EC d'HI[320]

4.3.3. Les péricytes

Les péricytes sont des cellules périvasculaires identifiables par l'expression de marqueurs comme αSMA, la desmine, PDGFR-β ou NG-2[321]. Dans l'HI, ils sont présents dès la phase proliférative et forment une couverture péricytaire dense et homogène, ce qui contraste avec l'organisation altérée dans les autres vaisseaux tumoraux (**Figure 54**). En réponse à la forte prolifération endothéliale et au nombre élevé de structures vasculaires à recouvrir, leur densité est augmentée. Cette abondance résulte à la fois de leur forte capacité proliférative, supérieure à celle des péricytes physiologiques, et de la différenciation des HemSC en péricytes[322]. Les péricytes adoptent un phénotype pro-angiogénique, caractérisé par une forte expression de VEGF-A. Leur rôle fonctionnel a été confirmé *in vivo*. La co-injection chez la souris d'EC et de péricytes dérivés d'HI augmente significativement la

formation de micro-vaisseaux[321]. Contrairement aux péricytes matures physiologiques, ceux d'HI ont perdu leurs fonctions stabilisatrices et leur capacité à induire la quiescence des EC, ce qui contribue à la croissance vasculaire active.

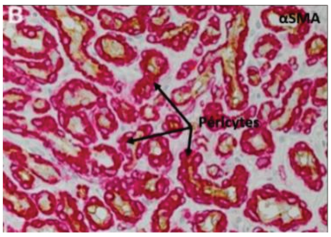


Figure 54: Immunohistochimie de αSMA, révélant la couverture homogène de péricyte dans un HI prolifératif[323]

4.3.4. Les macrophages

L'HI est un tissu riche en macrophages, pouvant représenter jusqu'à un tiers des cellules de la lésion[324]. Ils ont une localisation prépondérante autour des vaisseaux lésionnels [325].

La phase proliférative est caractérisée par un infiltrat de macrophages de type M2-like (**Figure 55**). Ils sembleraient participer à l'orientation de la différenciation des HemSC CD133$^+$ en EC. Aussi, leur sécrétome pro-angiogénique, riche entre VEGF, FGF-2, PDGF ou EGF favoriserait la prolifération des EC [326]. Leur activité soutient la formation d'un réseau vasculaire dense et immature.

En revanche, la phase involutive est caractérisée par un infiltrat majoritairement M1-like (**Figure 55**). Ces macrophages produisent des cytokines pro-inflammatoires comme le TNFα et l'IL1-β, qui pourraient induire l'apoptose des EC et favoriser la résolution de la tumeur. Ils orienteraient plutôt la différenciation des HemSC en adipocytes et favorisent la transition endothélio-mésenchymateuse (*EndMT*) des EC d'HI vers un phénotype adipocytaire[327].

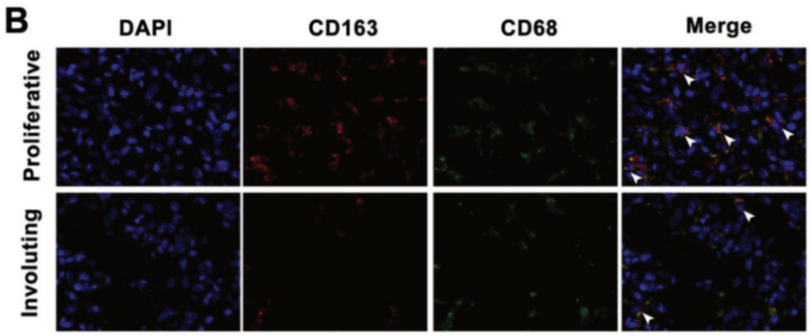


Figure 55: Immunofluorescence des macrophages dans les HI prolifératifs et involutifs [325]

Phénotype M2 (CD163$^+$, CD68$^+$) et phénotype M1 (CD163$^-$, CD68$^+$)

4.3.5. Les mastocytes

Les mastocytes sont plus abondants dans l'HI, quelle que soit la phase, comparativement à la peau physiologique, avec une localisation prépondérante autour des capillaires. Ils sont identifiables par immunomarquages de la tryptase, de la chymase ou de CD117 (**Figure 56**)[328]. Certaines études suggèrent également qu'une partie des mastocytes pourrait proliférer *in situ*, particulièrement pendant la phase de prolifération[329]. Leur densité fluctue pendant le cycle de vie de l'HI. Elle est moindre durant la phase proliférative, ils sont immatures mais semblent fonctionnellement actifs. Ils sécréteraient des facteurs pro-angiogéniques tels que le VEGF ou le FGF-2 ainsi que des protéases comme la chymase. Le nombre de mastocytes atteint son pic au début de la phase d'involution. Pendant cette phase, la majorité des mastocytes est mature et exprime les récepteurs à l'E2, suggérant une activation dépendante des œstrogènes[330,331]. Ils sécrètent des facteurs anti-angiogéniques tels que les interférons et des cytokines pro-inflammatoires comme le TNF-α et l'IL1-β. Leur nombre diminue progressivement, pour atteinte des niveaux modérés en fin d'involution[328].

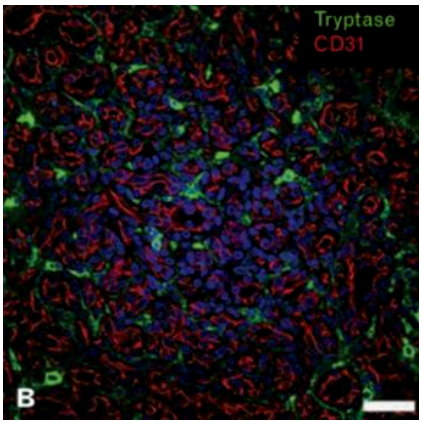


Figure 56: Mastocytes dans un HI en phase d'involution précoce[332]

Immunofluorescence des mastocytes (Tryptase, vert) et des cellules endothéliales (CD31, rouge) dans un HI en début d'involution.

4.3.6. Les adipocytes

Les adipocytes représentent un type cellulaire important de l'HI, particulièrement dans le stade d'involution. Absents ou très peu nombreux durant la phase proliférative, ils apparaissent progressivement lors de la régression tumorale, jusqu'à former une composante majeure du tissu résiduel (**Figure 57**). Histologiquement, les adipocytes présentent une morphologie typique : ce sont de grandes cellules rondes, dont le cytoplasme est occupé par une vacuole lipidique qui repousse le

noyau en périphérie. Ils expriment des facteurs de transcription maîtres comme PPARγ (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma*) et C/EBPα (*CCAAT/enhancer-binding protein alpha*) et des marqueurs protéiques comme les périlipines ou la leptine [333]. Ils s'organisent en lobules adipeux, souvent intercalés entre les structures vasculaires résiduelles. Les mécanismes de leur apparition sont encore peu clairs et débattus.

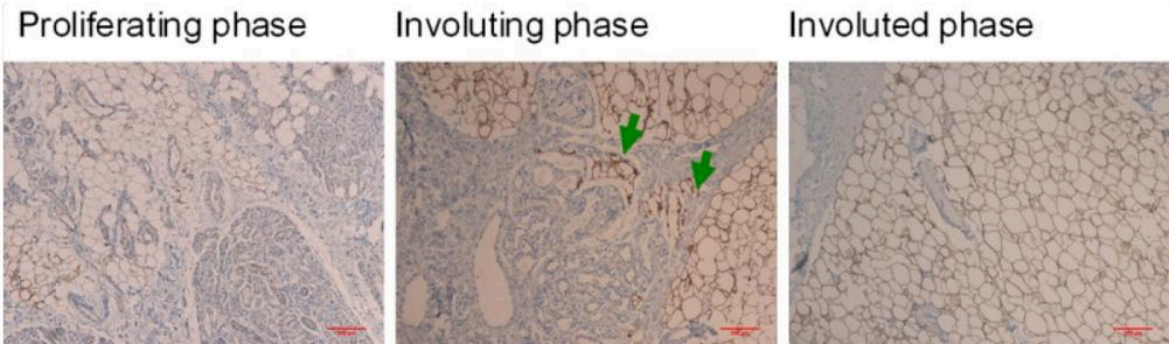


Figure 57: Immunohistochimie de la Périlipine A, révélant des adipocytes dans les HI prolifératifs, involutifs et involués[333]

4.3.7. Les télocytes

Les télocytes ont récemment attiré l'attention dans le contexte de l'HI, en raison de leur implication dans la régulation de l'angiogenèse et de l'homéostasie cutanée. La description précise de leur nature, leur morphologie ainsi que leurs rôles dans les contextes physiologiques et pathologiques sera approfondie dans **l'axe 5 de l'introduction de thèse**.

4.4. Physiopathologie

4.4.1. Etiologie

L'origine de l'HI reste incomplètement élucidée mais plusieurs hypothèses ont été avancées pour expliquer son apparition. Ces théories combinent des facteurs embryologiques, hypoxiques, endocrines et génétiques.

- **<u>Théorie placentaire :</u>**

L'hypothèse placentaire de l'HI repose sur des similarités moléculaires entre les EC de l'HI et les cellules placentaires. Les EC d'HI expriment notamment des marqueurs spécifiques absents dans les vaisseaux

cutanés normaux ou autres anomalies vasculaires, tels que GLUT-1, la mérosine, l'antigène Y de Lewis ou encore le récepteur Fcγ II [270,319,334]. De plus, cliniquement, les HI sont plus fréquents chez les prématurés, les jumeaux ou après complications placentaires, situations dans lesquelles la perfusion placentaire peut être altérée et peut favoriser le passage de cellules trophoblastiques dans la circulation fœtale[335]. Ce lien est renforcé par un risque augmenté d'HI après biopsie des villosités choriales, une procédure invasive qui touche directement le tissu trophoblastique[336]. Ces cellules placentaires, disséminées, persisteraient dans le tissu cutané du nouveau-né et prolifèreraient après la naissance sous l'effet de facteurs angiogéniques comme le VEGF ou l'hypoxie locale. Cependant, les analyses génétiques et moléculaires n'ont pas confirmé cette hypothèse. Aussi, l'étude de Pittman et al. a montré que les EC d'HI présentaient un profil génétique identique à celui de l'enfant et distinct de celui de la mère[337].

- **<u>Théorie de l'hypoxie périnatale :</u>**

La théorie de l'hypoxie périnatale postule que les épisodes de déficit en oxygène survenant autour de la naissance jouent un rôle majeur dans la prolifération des HI. Ces épisodes d'hypoxie peuvent résulter de diverses complications obstétricales, telles que la prééclampsie, une pathologie maternelle caractérisée par une mauvaise perfusion placentaire[338]. D'autres causes incluent l'asphyxie néonatale, les ischémies locales par compression ou encore une maturation pulmonaire insuffisante chez les prématurés[323]. Avant l'apparition de l'HI, une macule pâle est souvent visible sur la peau du nourrisson, qui traduit une hypoperfusion locale et d'un manque d'oxygénation (**Figure 58**). Face à ce déficit en oxygène, les EC activent HIF-1α qui stimule l'expression de gènes pro-angiogéniques comme le VEGF. L'hypoxie stimule aussi le recrutement des EPC[339]. Cette réponse adaptative explique en partie la survenue plus fréquente d'HI chez les nourrissons prématurés ou présentant des antécédents de souffrance fœtale.



Figure 58: Lésion précurseur d'un HI sur un nouveau-né[340]

- **<u>Théorie de l'axe rénine-angiotensine (RAS) :</u>**

L'axe RAS implique plusieurs organes : le foie produit l'angiotensinogène, transformé en angiotensine I par la rénine, une enzyme produite par les reins en réponse à une baisse de pression ou de volume sanguin. L'angiotensine I est ensuite convertie en angiotensine II par l'enzyme ACE (*Angiotensin-converting Enzyme)* synthétisée dans les poumons (**Figure 59**). L'angiotensine II possède des propriétés pro-angiogéniques, notamment via la stimulation de la production de VEGF [341]. Physiologiquement, les taux sériques de rénine sont environ 5 fois plus élevés chez les nourrissons au cours des trois premiers mois de vie, comparés à ceux observés chez l'adulte. Cette concentration diminue progressivement avec l'âge pour atteindre des niveaux similaires à ceux de l'adulte vers l'âge de 8 ans. Par ailleurs, des taux plus élevés de rénine ont été rapportés chez les nouveau-nés prématurés, chez les femmes et dans les populations caucasiennes [323].

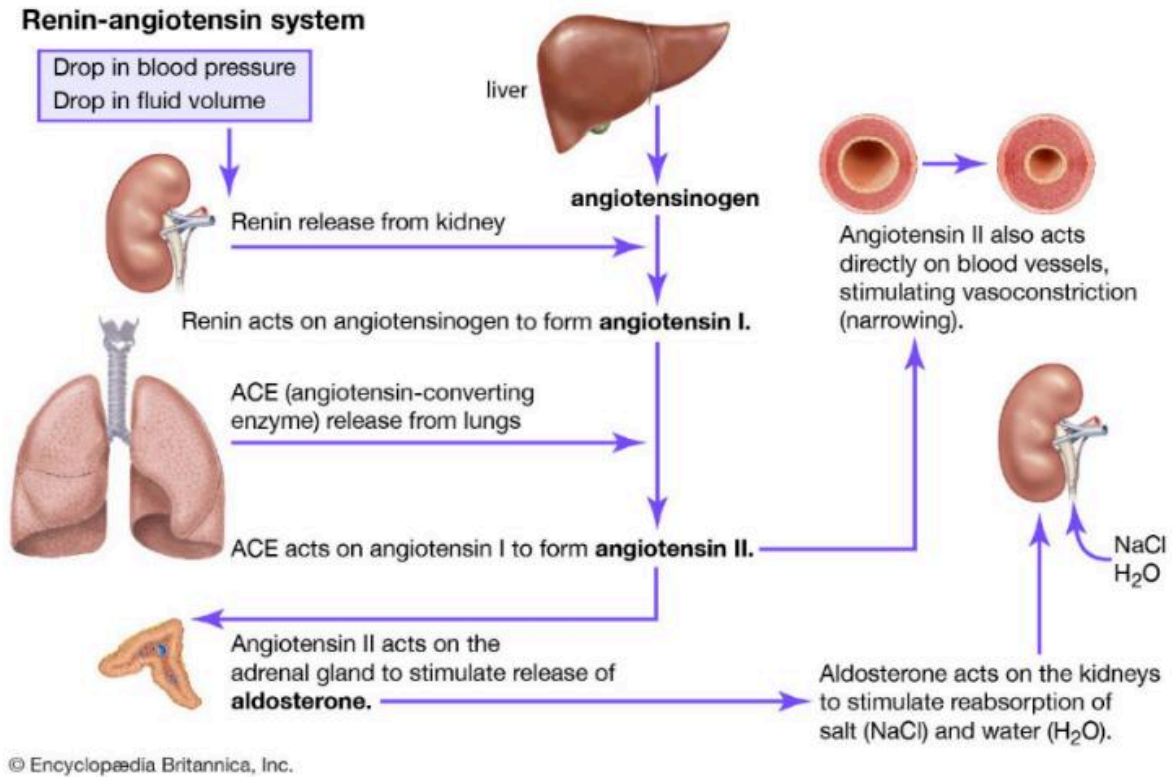


Figure 59: Système rénine - angiotensine (RAS) [342]

Le foie produit l'angiotensinogène, qui est converti en angiotensine I grâce à la rénine, une enzyme produite par les reins. L'angiotensine I est ensuite catalysée en angiotensine II, par l'enzyme ACE, synthétisée par les poumons. L'angiotensine II a des propriétés pro-angiogéniques sur les EC, qui expriment son récepteur.

L'expression de l'angiotensinogène, de la rénine et de l'ACE est élevée au cours des trois premiers mois de la vie et chez les prématurés, coïncidant avec la phase proliférative de l'HI. Certaines études suggèrent également une production autocrine des EC d'HI, suggérant qu'elles ne sont pas uniquement présentes par diffusion ou apport circulant, mais aussi produites localement. Elles expriment positivement le récepteur 2 de l'angiotensine II, responsable de leur hyperprolifération *in vitro*. Le biomarqueur de référence de l'HI, GLUT-1 est régulé positivement par l'angiotensine II [343,344].
Leur niveau diminue lors de la phase involutive.

- **Théorie des altérations génétiques :**

De rares formes familiales d'HI ont été décrites, suggérant un mode de transmission autosomique dominant. Des études de liaison génétique ont mis en évidence une association entre ces cas familiaux et la région chromosomique 5q31-33, qui contient plusieurs gènes clés de l'angiogenèse, dont *FGFR4*, *PDGFRB* et *VEGFR3*[345,346]. Au niveau moléculaire, l'étude de Jinnin et al. a montré que les EC d'HI expriment des niveaux anormalement faibles de VEGFR-1, dont l'activation du gène dépend du facteur de transcription NFAT. Ce défaut de signalisation a été attribué à l'altération du complexe VEGFR-2/ TEM8 / intégrine β1, nécessaire pour l'activation de NFAT. Deux variants rares, *TEM8 S326T* et V*EGFR2 C482R* ont été identifiés chez plusieurs patients, perturbant potentiellement ce complexe[347,348]. Une autre étude a détecté une mutation somatique dans le gène *VEGFR2* (P1147S) codant pour le domaine kinase, chez 2 patients sur 15, pouvant renforcer l'activation du récepteur. Malgré ces observations, les altérations génétiques dans l'HI restent rares, non récurrentes et encore insuffisamment validées[349]. Contrairement à d'autres anomalies vasculaires pour lesquelles des mutations somatiques récurrentes ont été établies, aucune mutation spécifique et causale n'a été identifiée dans de larges cohortes d'HI.

4.4.2. Dérégulations cellulaires et moléculaires

Une revue récente a proposé que la physiopathologie de l'HI se déroulerait en trois phases : la phase d'**initiation**, la phase de **prolifération** et la phase de **régression**[350].

La **phase d'initiation** est cliniquement silencieuse et elle correspondrait à un processus de vasculogenèse précoce. La population d'HemSC, définie initialement par l'expression de CD133 serait en réalité hétérogène et comprendrait à la fois des cellules progénitrices endothéliales (*HemEPC*, $CD31^+$, $VEGFR2^+$) et des cellules souches mésenchymateuses (*HemMSC*, $CD31^-$, $VEGFR2^-$, $CD90^+$, $CD29^+$)[350]. Sous l'effet de l'hypoxie périnatale, la production de VEGF est induite via la stabilisation et

l'activation de HIF-1α (**Figure 60.1A**). Le VEGF se lie à ses récepteurs VEGFR1 et VEGFR3 exprimés par les HemEPC, favorisant leur différenciation en EC d'HI (**Figure 60.1B**)[351]. Ce processus résulte d'un remodelage épigénétique marqué notamment par l'expression de KLF2, un facteur de transcription central dans la différenciation endothéliale[352]. Les EC ainsi formées produisent ensuite des niveaux élevés de Jagged1 (**Figure 60. 1C**), qui active le récepteur Notch3 des HemMSC, ce qui les engagent dans leur différenciation en péricytes (**Figure 60.1D**)[322]. Les EC et les péricytes sécrètent à leur tour de grandes quantités de VEGF, PDGF et IGF2 qui inhibent respectivement les phases précoces et tardives de l'adipogenèse, empêchant les HemMSC de se différencier en adipocytes à ce stade[353,354].

La **phase de prolifération** est caractérisée par une activité vasculogénique continue à partir des HemSC, mais aussi d'une angiogenèse intense à partir des EC et des péricytes déjà formés (**Figure 60.2**). Le réseau vasculaire se développe sous l'influence des facteurs pro-angiogéniques, parmi lesquels figurent toujours le VEGF, le PDGF et l'IGF-2, mais aussi des neurotransmetteurs issus de la voie β-adrénergique. Parmi ces neurotransmetteurs, la noradrénaline est produite en autocrine par les cellules de l'HI, elles-mêmes. Les EC et les péricytes expriment de forts niveaux du récepteur β2-adrénergique (ADRB2). La liaison de la noradrénaline à son récepteur stimule l'angiogenèse, en favorisant la migration, la prolifération et la tubulogenèse des EC[278]. Ce mécanisme pourrait expliquer en partie l'efficacité du propranolol qui inhibe l'activation d'ADBR2 par la noradrénaline, bloquant ainsi ses effets pro-angiogéniques.

La **phase de régression** débute par la stabilisation du réseau vasculaire, marqué par un arrêt de l'angiogenèse et de la vasculogenèse. Les vaisseaux lésionnels sont peu à peu remplacés par du tissu adipeux. Ce processus d'adipogenèse est encore peu compris mais plusieurs hypothèses coexistent. Les HemSC pourraient changer de trajectoire et s'engager dans une différenciation adipocytaire, possible grâce à la chute des facteurs pro-angiogéniques qui maintenaient jusque-là l'inhibition de cette différenciation (**Figure 60.3A**). L'augmentation d'IGF1 au cours de la régression favorise également l'adipogenèse[355]. Aussi, des données récentes suggèrent également que certaines EC et certains péricytes pourraient eux-mêmes subir une transdifférenciation en adipocytes (**Figure 60.3B**). L'expression du facteur de transcription PPARγ, maître régulateur de la lignée adipocytaire a notamment été détectée dans ces cellules $CD31^+$ et αSMA^+ en phase de régression[333].

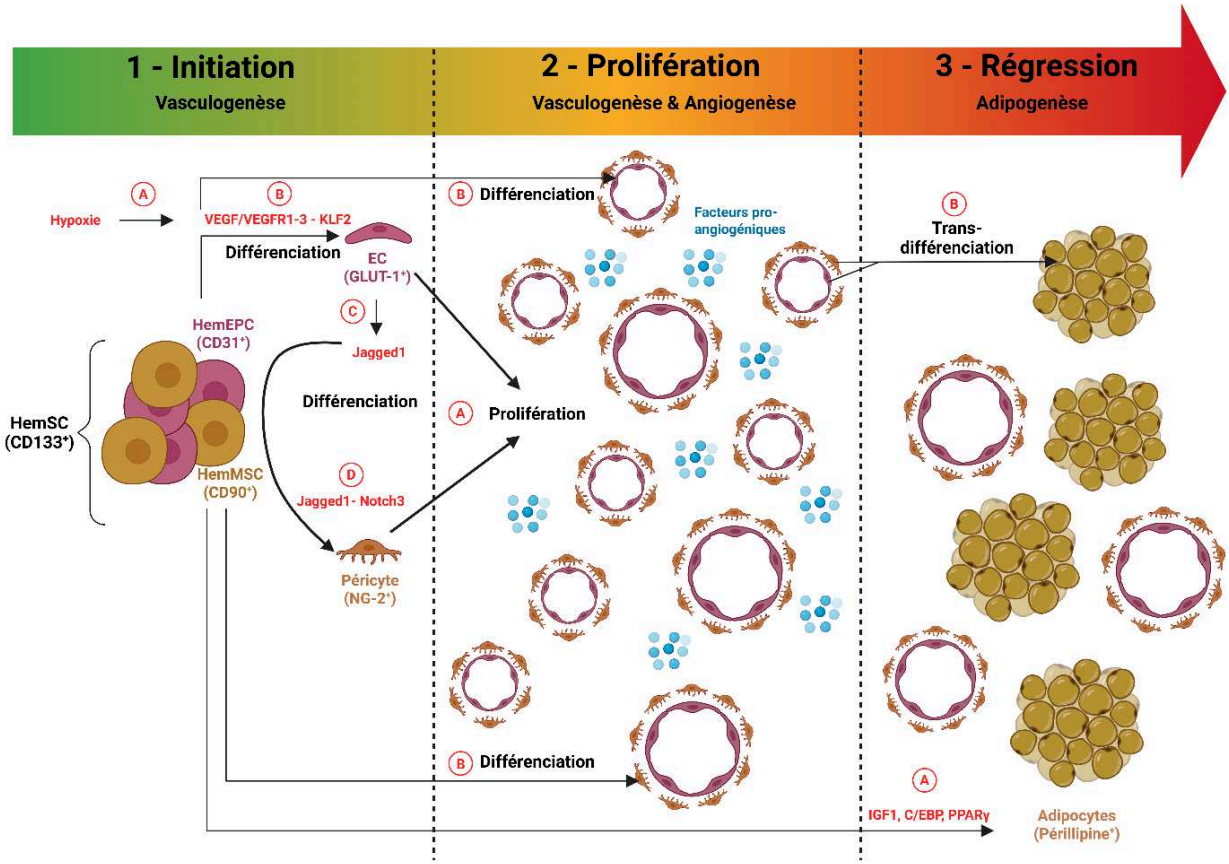


Figure 60: Mécanismes cellulaires et moléculaires de la physiopathologie de l'HI au cours de son cycle tumoral

*(**1**) La phase d'initiation, silencieuse, correspond à la vasculogenèse précoce induite par l'hypoxie et la signalisation VEGF/HIF-1α, menant à la différenciation des HemSC en EC et péricytes. (**2**) La phase de prolifération associe vasculogenèse et angiogenèse soutenues par le VEGF, PDGF, IGF-2 et la voie β-adrénergique. (**3**) Enfin, la phase de régression se caractérise par l'arrêt de la néovascularisation et la conversion progressive du tissu vasculaire en tissu adipeux. Créé sur Biorender*

5. LE TÉLOCYTE

Les télocytes sont des cellules stromales récemment identifiées, probablement d'origine mésenchymateuse, longtemps et encore parfois confondues avec les fibroblastes. Elles présentent pourtant une morphologie, un immunophénotype et un sécrétome distinct. Il s'agit d'un type cellulaire remarquablement conservé au cours de l'évolution car détectées chez de nombreuses espèces animales, y compris des invertébrés, ce qui souligne leur importance fondamentale[356]. Par leurs contacts et leurs sécrétions, ils participent à l'organisation, l'homéostasie et la régénération tissulaire. Leur dérégulation est associée à divers contextes pathologiques y compris tumoraux et dermatologiques, où leur densité, leur morphologie ou leur phénotype semblent étroitement liés à l'état vasculaire local. Dans l'HI, plusieurs observations récentes indiquent que les TC pourraient être modulés au cours du cycle. Nos précédents travaux ont même souligné que le propranolol pourrait exercer une partie de son effet en les ciblant, contribuant à accélérer la régression de la lésion. Ces éléments soulignent l'importance d'aborder cette population cellulaire, dans le cadre de ce travail. Il est en effet essentiel de faire le point sur les connaissances actuelles afin d'identifier les mécanismes par lesquelles ils pourraient contribuer au remodelage vasculaire et driver la régression de l'HI.

5.1. Identification

Le terme « télocyte » (TC) a été utilisé pour la première fois en 2010 par Popescu et al., en Roumanie, à la suite d'observations en microscopie électronique à transmission réalisées sur du myocarde [357]. Dès 2005, des cellules présentant des caractéristiques similaires avaient déjà été décrites dans plusieurs organes sous le nom d'*Interstitial Cajal-like Cell*, qui correspondent en réalité aux TC. De plus, bien que présents dans de nombreux tissus, les TC avaient jusque-là été confondus avec d'autres cellules stromales, telles que les fibroblastes ou les cellules interstitielles de Cajal, en raison de leur morphologie allongée. Leur reconnaissance comme type cellulaire distinct a été rendue possible par la mise en évidence de caractéristiques morphologiques spécifiques, en particulier de très longs prolongements cytoplasmiques, les télopodes, à l'origine de l'appellation « télocyte ».

5.2. Ultrastructure et morphologie

En microscopie électronique, les TC présentent un petit corps cellulaire (9-15µm) à la forme variable (fusiforme, triangulaire, étoilée ou piriforme). Le noyau, volumineux et ovoïde, est entouré d'une fine couche de cytoplasme renfermant quelques organites. Il est euchromatique, traduisant une potentielle activité de synthèse protéique et sécrétoire[358].

Les télopodes sont des prolongements très longs et très fins qui émergent du corps cellulaire, en moyenne au nombre de 3 par cellule. Ils peuvent atteindre plusieurs centaines de micromètres de longueur. Leur morphologie est moniliforme, alternant des segments fins (<0.2µm, ordre de la taille des fibres de collagène) appelés podomères et des renflements appelés podoms, qui contiennent la majorité des organites (**Figure 61**). Des études de microscopie électronique 3D suggèrent que ces prolongements pourraient avoir une morphologie fine en « collier de perles », la plus souvent décrite, mais aussi des formes plus aplaties en « ruban » pour augmenter leur surface de contact avec leurs partenaires[359].

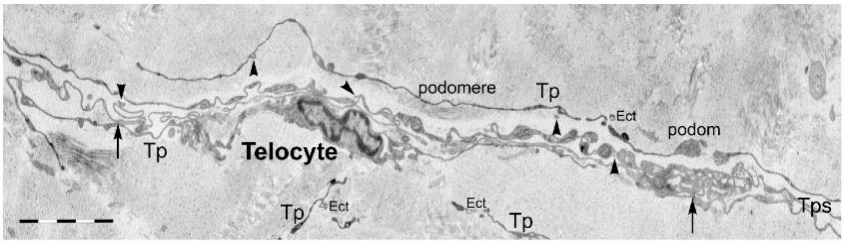


Figure 61: Microscopie électronique à transmission d'un télocyte[360]

Morphologie d'un télocyte de myomètre avec un corps cellulaire fusiforme et deux longs télopodes. Les flèches montrent des jonctions entre deux télopodes. Barre d'échelle, 5µm.

La morphologie des TC est hautement dynamique et modulée par leur environnement. La longueur et le nombre de télopodes ainsi que leur degré de ramifications peuvent varier selon leur état physiologique, les signaux hormonaux ou les conditions environnementales. De précédentes études ont montré que les TC du système reproducteur masculin étaient beaucoup plus ramifiés en réponse aux stimuli hormonaux et selon les périodes estivales [361]. Cette plasticité s'accompagne aussi d'une interaction étroite avec la MEC. Les télopodes se déploient plus facilement et plus abondamment sur de la fibronectine et du collagène de type I, par rapport à d'autres protéines matricielles[362].

5.3. Immunophénotype

Les profils d'expression des TC varient selon l'organe, avec peu de marqueurs ubiquitaires (**Tableau 3**). À ce jour, uniquement CD34, PDGFRα et la vimentine sont des marqueurs ubiquitaires. D'autres marqueurs sont organe-spécifique et parfois même diffèrent selon la localisation des TC dans l'organe, ce qui suggère la présence de différents sous-types de TC[363]. Par exemple, seulement 40 à 50% des TC du pancréas sont positifs pour S100[364]. Aucun marqueur n'est exclusif, ce qui impose le recours à des combinaisons et des co-marquages, idéalement associés à l'analyse ultrastructurale pour confirmer leur identification. Contrairement aux fibroblastes, ils n'expriment pas la fibronectine, le procollagène I et III, ni FSP1[365].

Marqueur	Spécificité	Partagé avec	Référence(s)
CD34	Ubiquitaire	Cellules endothéliales, cellules souches hématopoïétique	273,366
PDGFRα	Ubiquitaire	Cellules musculaires lisses, fibroblastes	367
Vimentine	Ubiquitaire	Fibroblastes, cellules musculaires lisses	366,368
CD10	Ongles, ganglion trigéminal, glande mammaire	Cellules souches mammaires	369
CD29	Poumons, Aorte, cœur	Fibroblastes, cellules endothéliales, cellules musculaires	370–372
CD117	Cœur, poumons, méninges, vessie, glandes salivaires, utérus, trachée, bronches	Cellules souches, mastocytes, mélanocytes	373–375
PDGFRβ	Cœur, valves cardiaques, muscles squelettiques, utérus	Péricytes, fibroblastes, cellules musculaires lisses	376,377
Oct4	Poumons, muscles squelettiques, pancréas	Cellules germinales, cellules souches embryonnaires	378
S100A	Cœur, trompes de Fallope, pancréas	Mélanocytes, cellules dendritiques, adipocytes, cellules de Langerhans	379,380
AQP1	Hémangiome infantile	Cellules endothéliales, hématies	381
CD90	Intestin	Fibroblastes	368
COL6A1	Intestin	Fibroblastes, cellules endothéliales	382
FoxL1	Intestin	Progéniteurs hépatiques, fibroblastes	383,384
Lgr5	Intestin	Cellules souches intestinales	385
Nanog	Cœur	Cellules souches	386
Nestine	Cœur	Cellules souches et progénitrices	387
Récepteurs œstrogène et progestérone	Appareil génital féminin	Cellules épithéliales de l'utérus, l'ovaire et les glandes mammaires	380,388
Sox6	Intestin	Cellules musculaires squelettiques, hématies	389
Sca-1	Cœur	Cellules souches musculaires, mésenchymateuses, hématopoïétiques	386

Tableau 3: Marqueurs des télocytes

La catégorie bleue correspond aux marqueurs ubiquitaires, la catégorie verte correspond aux marqueurs spécifiques de plusieurs organes et la catégorie orange correspond aux marqueurs à ce jour organe-spécifiques.

Dans la peau, l'immunophénotype des TC est caractérisé par l'expression de CD34, de la vimentine et de PDGFRα. L'expression de CD117 est observée uniquement dans certains sous-ensembles de TC localisés autour des follicules pileux du scalpe[390].

5.4. Distribution

Les TC sont détectés dans un large éventail de tissus et dans la plupart des systèmes de l'organisme. Ils sont présents dans le système digestif (œsophage, estomac, intestins, foie et pancréas), souvent localisés dans la sous-muqueuse et la couche musculaire lisse[385,391]. Dans le système respiratoire (trachée, bronches et poumons), ils sont observés dans le stroma péri-bronchique et intra-alvéolaire[392–394]. Dans le système cardiovasculaire, les TC sont abondants dans les valves cardiaques et le myocarde, intercalés entre les cardiomyocytes[395–397]. Ils sont aussi localisés dans l'adventice des vaisseaux de gros calibre[398]. Ils sont également retrouvés dans le système reproducteur féminin (utérus, trompes de Fallope, ovaires et placenta)[399] et masculin (testicules et prostate)[400], où ils se situent fréquemment à l'interface entre l'épithélium et le stroma. Dans le système nerveux, la présence des TC a été rapportée dans certaines structures comme les méninges et le plexus choroïde[401]. Cependant, leur identification dans le parenchyme cérébral reste difficile et controversée, car la morphologie des télopodes et les marqueurs immunohistochimiques peuvent être confondus avec ceux d'autres cellules gliales. Dans le système nerveux périphérique, des cellules laissant penser aux TC (nommées tactocytes) ont été décrites dans l'endonèvre[402,403].

Quelle que soit leur localisation, les TC occupent généralement une position stratégique dans les tissus conjonctifs, en particulier à proximité des vaisseaux sanguins, des terminaisons nerveuses et des fibres musculaires. Ils y forment des couches concentriques. Grâce à leurs longs télopodes, ils établissent un réseau interconnecté qui forme un échafaudage 3D de soutien dans l'espace interstitiel (**Figure 62**)[404].

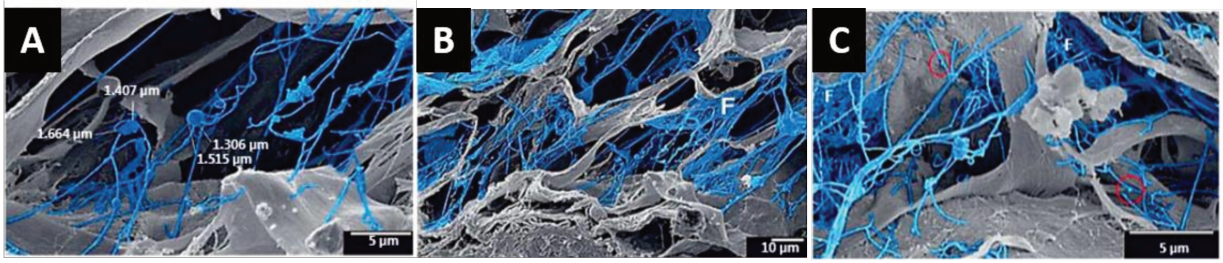


Figure 62: Echafaudage cellulaire de TC[404]

Images de TC (bleus) de tissu utérin, obtenues par microscopie électronique à balayage.

Dans la peau, les TC sont distribués dans le derme[365,405,406]. Ils sont principalement localisés dans le derme réticulaire entre les fibres de collagène et les fibres élastiques. Ils se logent préférentiellement autour des vaisseaux, des nerfs ainsi que des annexes cutanées. Une plus faible proportion se localise dans le derme papillaire, en dessous de la jonction dermo- épidermique, parallèle à la surface de l'épiderme (**Figure 63**).

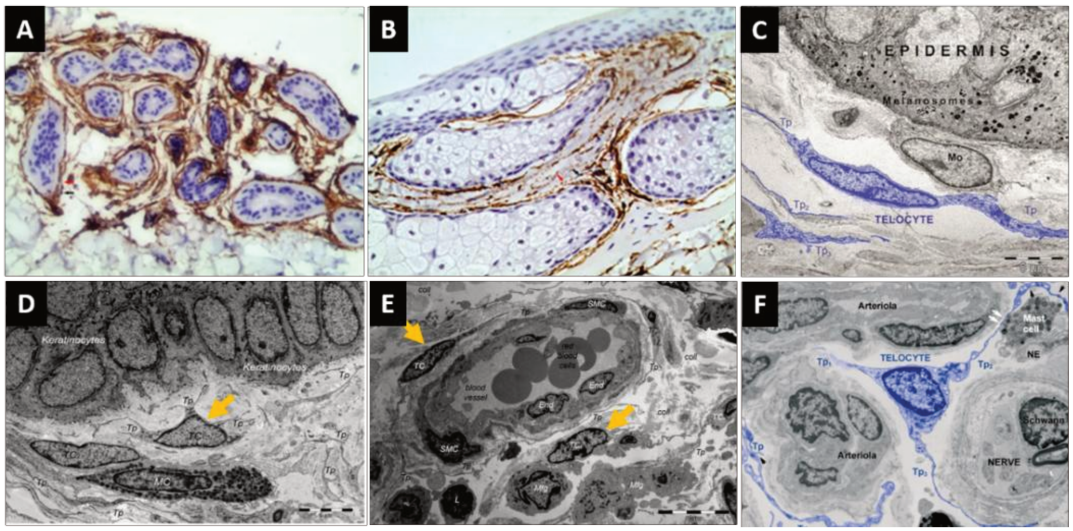


Figure 63: Distribution des TC cutanés

***A-B**) Immunohistochimie des TC (CD34, marron), localisés en couches concentriques autour des glandes sudoripares (A) et sébacées (B)[390]. **C**) Microscopie électronique d'un TC (bleu) localisé dans le derme papillaire, parallèle à l'épiderme. Tp = télopode[407]. **D**) Microscopie électronique d'un TC (flèche jaune) localisé sous l'épiderme. Ses télopodes se projettent vers les kératinocytes basaux et vers un mastocyte (MC). Tp = télopode[408]. **E**) Microscopie électronique d'un capillaire sanguin. Les TC sont pointés par les flèches jaunes. SMC = cellules musculaires lisses, End = EC, Mfg = macrophage, L = lymphocytes. Coll = fibres de collagène de type I, Tp = télopodes[408]. **F**) Microscopie électronique d'un TC (bleu) dont les télopodes entourent un nerf, des artérioles et entrent en contact avec un mastocyte[409].*

5.5. Caractérisation transcriptomique

L'identité des TC, longtemps définie par leur morphologie singulière et quelques marqueurs histologiques comme CD34 et PDGFRα a été considérablement affinée grâce aux approches transcriptomiques. La transcriptomique Single-Cell a révélé une hétérogénéité structurelle et spatiale des TC, en identifiant des sous-populations spécifiques selon l'organe et la position tissulaire. Dans l'intestin, la combinaison de transcriptomique Single-Cell et spatiale a permis de décrire trois populations de TC, dépendantes du compartiment : les TC FOXL1$^+$ à la base des cryptes enrichies en Wnt canoniques soutenant l'auto-renouvellement des cellules souches intestinales, les TC FOXL1$^+$ du corps des villosités à signature BMP ainsi que les TC du haut des villosités FOXL1$^+$ Lgr5$^+$ associés à la maturation et à l'extrusion des entérocytes[410,411]. Dans le poumon, l'intégration de plusieurs jeux de

données de Single-Cell transcriptomique humain a permis d'isoler six clusters de TC $CD34^+$/ $PDGFRA^+$ du reste des cellules pulmonaires. Ces profils transcriptomiquement distincts présentaient aussi des propriétés fonctionnelles différentes. Ces états varient cependant entre un état sain ou pathologique (cancer du poumon)[412].

Enfin, le profilage des miR complète cette caractérisation en montrant que les TC sécrètent des vésicules extracellulaires enrichies en miR, modulant l'angiogenèse, la fibrose et l'immunité[413].

En résumé, la transcriptomique et particulièrement le single-cell érige les TC en une entité stromale hétérogène et dynamique, organisée en sous-populations spatiales et fonctionnelles et fournit un référentiel moléculaire robuste qui dépasse la seule morphologie et l'immunophénotypage.

5.6. Communication cellulaire

Les TC interagissent avec de nombreux types cellulaires grâce à leurs longs télopodes via des contacts membranaires directs et à la libération de signaux à distance. Par ces mécanismes juxtacrines et paracrines, ils participent activement à la communication cellulaire à plus ou moins longue distance.

5.6.1. Communication juxtacrine : les jonctions et contacts

Les TC établissent des contacts directs soit homotypiques, entre eux, soit hétérotypiques, avec d'autres types cellulaires comme les fibroblastes ou certaines cellules immunitaires, assurant la transmission locale de signaux [414]. Grâce à leurs longs télopodes, ils peuvent entrer en contact physique avec des cellules situées parfois à plusieurs centaines de micromètres de leur corps cellulaire. Parmi ces interactions, les jonctions communicantes (aussi appelées jonctions *gap*), permettent le passage de petites molécules (<1kDa) telles que des ions ou seconds messagers, directement entre cytoplasmes voisins. Ces jonctions ont été observées entre plusieurs TC via leur télopodes pour former un réseau fonctionnel, mais aussi entre TC et fibroblastes dans le derme et le poumon, avec des cellules musculaires lisses des vaisseaux de la paroi utérine, ou encore des cardiomyocytes dans le cœur (**Figure 64A**)[368,415]. Les jonctions d'adhérence assurent un ancrage mécanique stable entre TC et cellules partenaires pour favoriser une interaction prolongée. Elles ont été rapportées entre plusieurs TC ainsi qu'avec des fibroblastes, des adipocytes, des cardiomyocytes et des cellules souches (**Figure 64B**)[414,415]. Enfin, des contacts ponctuels atypiques, dépourvus de structures de jonctions ont été décrits à l'extrémité des télopodes, notamment avec des cellules souches cardiaques (**Figure 64C**)[414].

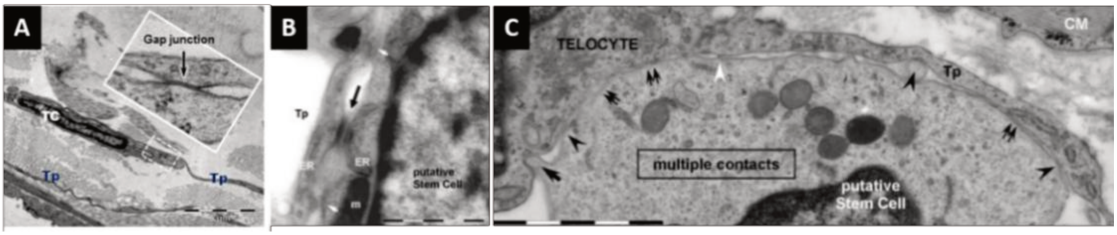


Figure 64: Microscopie électronique des contacts des TC

***A**) Jonctions communicantes entre deux télopodes de TC [416]. **B**) Jonction d'adhérence (flèche noire) entre un TC et une cellule souche cardiaque[414]. **C**) Contacts ponctuels atypiques sans complexes de jonctions visibles entre un TC et une cellule souche cardiaque[414].*

5.6.2. Communication paracrine : les vésicules extra-cellulaires

Plusieurs études ont mis en évidence la capacité des TC à communiquer avec leur environnement via la libération de vésicules extracellulaires, en plus de leurs contacts directs avec d'autres types cellulaires. Ces vésicules sont classées selon trois catégories : (i) les exosomes ; (ii) les ectosomes aussi appelés microvésicules et (iii) les corps apoptotiques. Chez les TC, les deux premières catégories sont les plus fréquemment observées (**Figure 65**) [360].

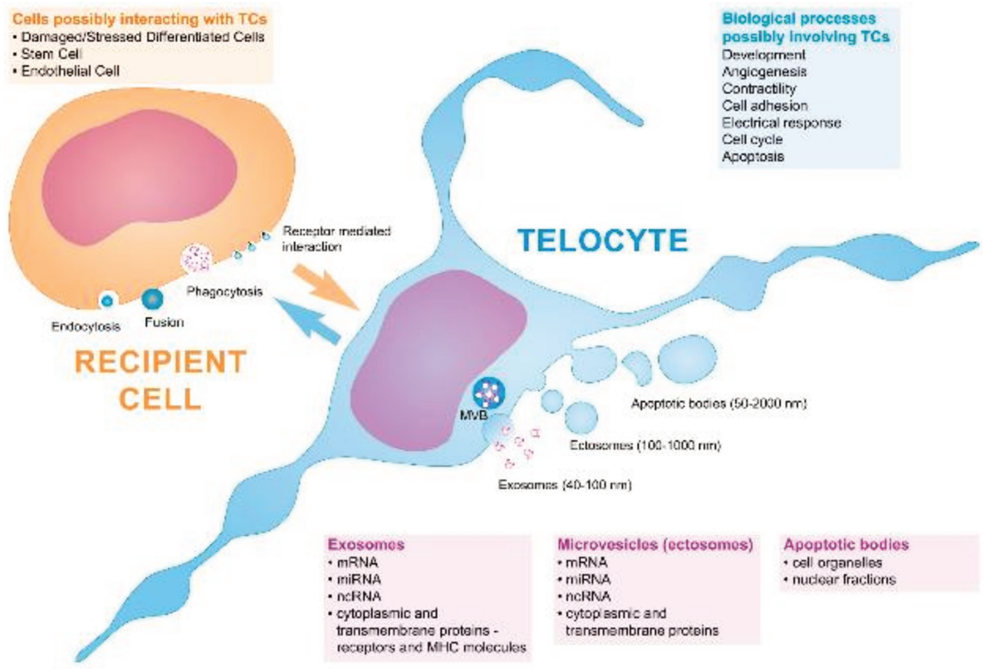


Figure 65: Différents types de vésicules sécrétées par les TC[360]

Les exosomes sont les plus petites vésicules sécrétées par les TC (< 100nm). Les microvésicules, ou ectosomes, sont de plus grande taille (< 1000nm). Toutes deux contiennent des ARNs (codants et non codants) ainsi que des protéines cytosoliques ou membranaires. Les corps apoptotiques, plus gros (> 2000nm), contiennent plutôt des organites.

Les **exosomes** sont des vésicules de petite taille (40 à 100nm) d'origine endosomale, formés par invagination de la membrane des endosomes tardifs, pour donner des corps multivésiculaires qui fusionnent ensuite avec la membrane plasmique pour libérer les exosomes. Chez les TC, ils sont localisés dans les télopodes. Ils transportent des ARN non codants dont des miR (miR146a, miR-221, miR-222)[417] et des protéines de signalisation (VEGF-A, PDGF-A, Wnt5a, Wnt11)[417–419]. Leur fonction principale est de moduler à distance le phénotype de cellules cibles, notamment les cellules souches, les fibroblastes, les EC et les cellules immunitaires[419,420].

Les **ectosomes**, plus grands (100-1000nm), bourgeonnent directement à partir de la membrane plasmique. Chez les TC, ils sont observés comme des protrusions au niveau du corps cellulaire et des télopodes. Ce sont les vésicules principales produites par les TC cutanés[421]. Leur contenu est similaire à celui des exosomes, mais ils contiennent aussi des enzymes (MMPs) et des protéines membranaires (intégrines). Elles peuvent avoir un rôle dans la signalisation, le recrutement cellulaire et la dégradation de la MEC [360].

Enfin, bien que plus rarement mentionné, les **corps apoptotiques** (50 à 2000nm) résultent de la fragmentation cellulaire lors de l'apoptose. Ils ont parfois été observés dans des conditions de stress cellulaire, mais ils ne semblent pas être une voie majeure de la signalisation des TC [360].

5.6.3. Les synapses stromales

À l'interface des communications paracrines et juxtacrines, les TC établissent des synapses stromales, véritables zones spécialisées pour orienter leurs sécrétions[415]. Emprunté aux neurosciences, ce terme désigne ici une interface de rapprochement membranaire étroit entre un TC et une cellule stromale voisine. Ces synapses sont localisées au niveau des télopodes, souvent accompagnées de jonctions d'adhérence qui stabilisent la structure. Sur le plan morphologique, elles se caractérisent par une fente intercellulaire étroite (20 à 30nm), une accumulation polarisée de vésicules dans le télopode du TC, et une cellule cible marquée par le regroupement de récepteurs et parfois de canaux ioniques (**Figure 66**). Ces structures témoignent d'une signalisation ciblée, localisée et rapide. Elles ont été fréquemment observées entre TC et cellules souches[422] ou cellules immunitaires (mastocytes, macrophages)[381,423].

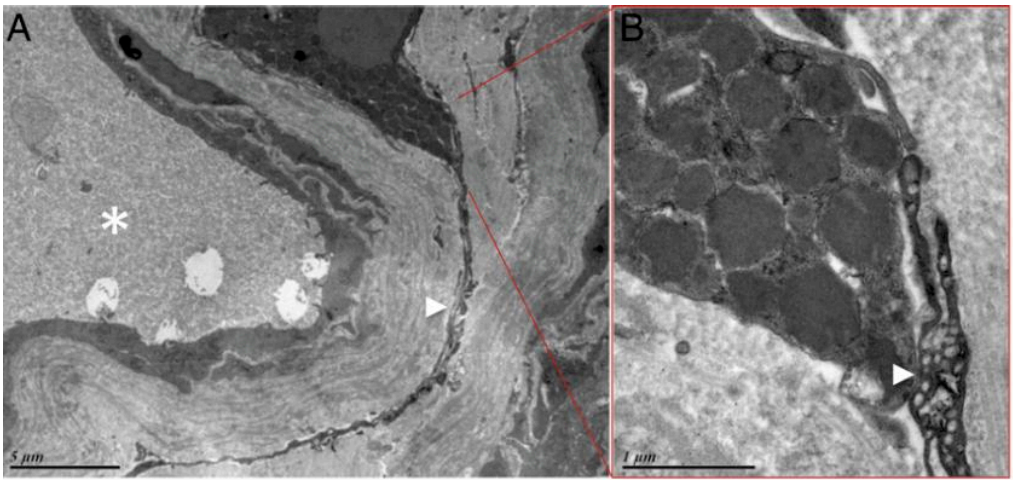


Figure 66: Synapse stromale entre un TC et un mastocyte[381]

*Microscopie électronique d'une biopsie de peau. **A**) Vue globale d'une interaction entre un TC périvasculaire et un mastocyte. L'astérisque blanc correspond à une lumière vasculaire. La tête de flèche blanche montre un télopode. **B**) Zoom du cliché présenté en A. La tête de flèche blanche pointe la synapse stromale.*

5.7. Fonctions biologiques

Les TC apparaissent précocement au cours du développement embryonnaire, dès la 4ème semaine de gestation chez l'Homme. Ils se retrouvent rapidement dans de nombreux tissus en formation à partir de la 6ème semaine[424]. Leur apparition précoce et leur distribution suggèrent un rôle clé dans la morphogenèse, l'angiogenèse et le maintien de l'homéostasie des tissus.

5.7.1. Morphogenèse et organisation tissulaire

Les TC jouent un rôle fondamental dans la morphogenèse et l'organisation tissulaire, en agissant comme des cellules structurantes et coordinatrices du microenvironnement. Leur morphologie unique, qui forme un réseau 3D, leur permet de tisser un réseau qui organise l'espace extracellulaire et guide spatialement la disposition des autres types cellulaires (**Figure 62**). Par exemple, ils orienteraient les cellules progénitrices cardiaques au cours de la formation du myocarde à l'aide de leurs télopodes[376]. Ils modulent aussi la composition et la structure de la MEC. Aussi, leur rôle déterminant est bien documenté dans l'intestin grêle, où ils participent à l'élaboration des patterns de morphogènes.

L'organisation de l'intestin grêle repose sur une architecture en cryptes et villosités qui structurent à la fois la prolifération et la différenciation de l'épithélium. À la base des cryptes résident les cellules souches intestinales, actives et responsables du renouvellement rapide de l'épithélium. Elles sont entourées de cellules progénitrices prolifératives qui migrent dans les villosités vers le haut des

cryptes. Au sommet des cryptes et progressivement dans les villosités, les cellules entrent dans des programmes de différenciation qui aboutissent à la formation des entérocytes et cellules caliciformes.

Sur le plan moléculaire, ce phénomène est sous le contrôle de signaux morphogéniques, notamment sécrétés par les TC. À la base des cryptes, les TC FOXL1^{+} établissent une niche favorable au maintien des cellules souches intestinales, en sécrétant des ligands canoniques de la voie Wnt (notamment Wnt2b) [410,411], ainsi que des coactivateurs comme les R-spondines. L'activation de cette voie permet l'auto-renouvellement des cellules souches et le maintien d'un compartiment prolifératif. En parallèle, ils inhibent localement la voie des BMP, grâce à la production d'antagonistes tels que Noggin, ce qui empêche leur différenciation prématurée. Les analyses en Single-Cell transcriptomique ont révélé une spécialisation progressive des TC le long de l'axe crypte-villosité. À mesure que l'on s'éloigne de la base, l'activité de la voie Wnt canonique diminue au profit de la signalisation Wnt non canonique (comme Wnt5a), impliquée dans la différenciation des cellules souches intestinales en entérocytes (**Figure 67**) [385]. Cette transition est couplée à une activation croissante de la voie des BMP, via l'expression de BMP4 et la répression de Noggin par les TC FOXL1^{+} du corps des villosités, favorisant la polarisation et la différenciation terminale des cellules épithéliales. Au niveau de la pointe de la villosité, les données de Single-Cell suggèrent l'existence d'une sous-population distincte des TC, caractérisée par l'expression de FOXL1 ainsi que de Lgr5. C'est cette sous-population qui est la source de Wnt5a. La déplétion de la protéine Porcupine dans les TC intestinaux, qui est essentielle à la maturation des protéines Wnt, provoque un défaut de prolifération des cellules souches intestinales. Par conséquent, le renouvellement des entérocytes est altéré, provoquant l'effondrement des unités cryptes-villosités[410].

Les TC intestinaux contribuent également à l'organisation du réseau vasculaire sous-épithélial, un élément clé pour l'absorption des nutriments. Dans les villosités, les capillaires forment une boucle dont l'extrémité apicale est fenestrée pour permettre le transfert rapide des nutriments dans la circulation. Les TC jouent un rôle essentiel dans le maintien de la polarisation des fenestrations, en modulant la distribution du VEGF-A, principal inducteur de ces structures. Ils sécrètent de manière polarisée la protéase ADAMTS18, qui clive la fibronectine de la MEC. En absence de fibronectine, le VEGFA n'est plus retenu. Ainsi, seules les régions non dégradées, localisées du côté épithélial des EC conservent une accumulation du VEGFA (**Figure 67**) [425].

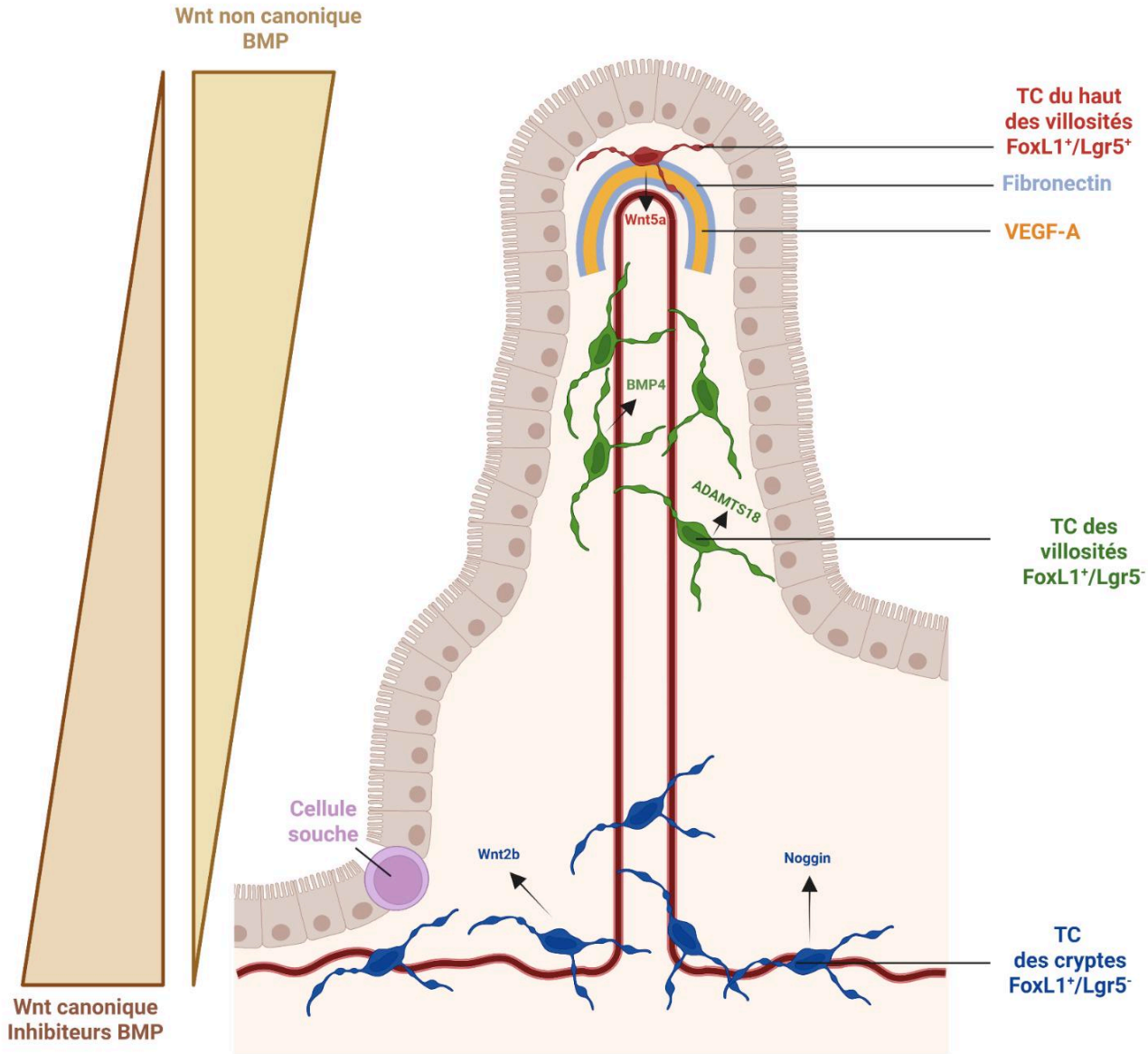


Figure 67: Rôle des TC dans la morphogenèse intestinale et le maintien de l'homéostasie

À la base des cryptes, les TC FOXL1+ maintiennent les cellules souches intestinales en sécrétant des ligands Wnt canoniques (Wnt2b) et des coactivateurs, tout en inhibant la voie des BMP via des antagonistes tels que Noggin. En remontant vers les villosités, leur signalisation évolue vers une voie Wnt non canonique (Wnt5a) et l'activation de la voie des BMP par BMP4, pour favoriser la différenciation et la polarisation des entérocytes. Les TC FOXL1+ Lgr5+ apicaux sécrètent Wnt5a et la protéase ADAMTS18, pour moduler la distribution polarisée du VEGF-A, essentielle à la formation du réseau vasculaire fenestré sous-épithélial. Créé sur Biorender

5.7.2. Angiogenèse

La localisation quasi-systématique des TC autour des vaisseaux et leurs variations morphologiques en région périvasculaire suggèrent une implication complexe et plastique dans la régulation des vaisseaux[426].

Dans divers organes, les TC sécrètent des exosomes contenant des MMP, comme la MMP-9, des facteurs de croissance tels que VEGF-A ou EGF, des cytokines comme l'IL-6 et l'IL-8 ainsi que des ARN non codants tel que miR-12-21-5p[407,427,428]. Ces sécrétions favorisent la dégradation de la lame basale, la prolifération et la migration des EC, tout en inhibant leur apoptose. Dans certains contextes inflammatoires, ils peuvent également polariser les macrophages en un phénotype M2-like pro-angiogénique[429].

En revanche, dans d'autres contextes, les TC semblent exercer un effet anti-angiogénique en produisant activement des protéines de la lame basale telles que le collagène IV, le nidogène, le perlécan et les laminines. Ils pourraient aussi sécréter des facteurs anti-angiogéniques stabilisants comme la thrombospondine-2 et l'angiopoiétine-1[430]. Leur sécrétion de MMP-9 pourrait aussi participer au mécanisme de pruning déjà documenté dans la barrière-hémato-encéphalique[431].

5.7.3. Réparation et régénération tissulaire

Les TC participent à la réparation et à la régénération tissulaire, notamment grâce à leur capacité à interagir avec les cellules souches. Après la naissance, ils demeurent un composant essentiel des niches des cellules souches, comme cela a été observé dans divers organes comme le cœur, les poumons, l'intestin et la peau[432]. En sécrétant des facteurs de croissance et en émettant des synapses stromales, les TC agissent comme des « nurse cells » qui favorisent la survie et la régulation des cellules souches selon les besoins des tissus[433]. Leur réseau 3D formé par leurs télopodes joue aussi un rôle de guidage pour les orienter jusqu'au site lésé, comme cela a été observé dans le cœur après un infarctus du myocarde. Il a d'ailleurs été montré que le réseau de TC est profondément altéré après un infarctus, ce qui est associé à une réparation inefficace et fibrotique[434]. La transplantation de TC cardiaques chez le rat permet en 14 jours, une amélioration de la fonction cardiaque et une réduction de la zone lésée[435]. Ces effets seraient en grande partie médiée par la sécrétion d'exosomes[420,436]. Dans un modèle murin de plaie cutanée, l'administration du TC permet de réduire le stress oxydatif et de protéger les cellules de la peau contre l'apoptose. Ils stimulent la migration des kératinocytes, cellules endothéliales et fibroblastes[437]. De plus, au-delà de leur rôle de soutien aux cellules souches, les TC expriment eux-mêmes plusieurs marqueurs typiques d'un phénotype progéniteur, ce qui suggère

qu'ils pourraient aussi constituer une source cellulaire active dans les processus de régénération après transdifférenciation [438]. Des études ont identifié l'expression de CD34, CD117, Sca-1, ainsi que des facteurs de pluripotence comme Oct4 et Nanog (**Tableau 3**).

Ces propriétés font des TC des acteurs prometteurs en régénération cellulaire, capables non seulement de favoriser la différenciation des cellules souches ou de se différencier eux-mêmes dans un environnement propice. Ils contribueraient à structurer cet environnement notamment via leurs effets pro-angiogéniques, ce qui pourrait lever l'une des principales limites actuelles des thérapies cellulaires[439].

5.7.4. Immunité

Les TC semblent jouer un rôle dans la régulation et la modulation de la réponse immunitaire. Des observations en microscopie électronique révèlent leur proximité fréquente, voire leurs interactions directes avec divers types de cellules immunitaires (**Figure 68**).

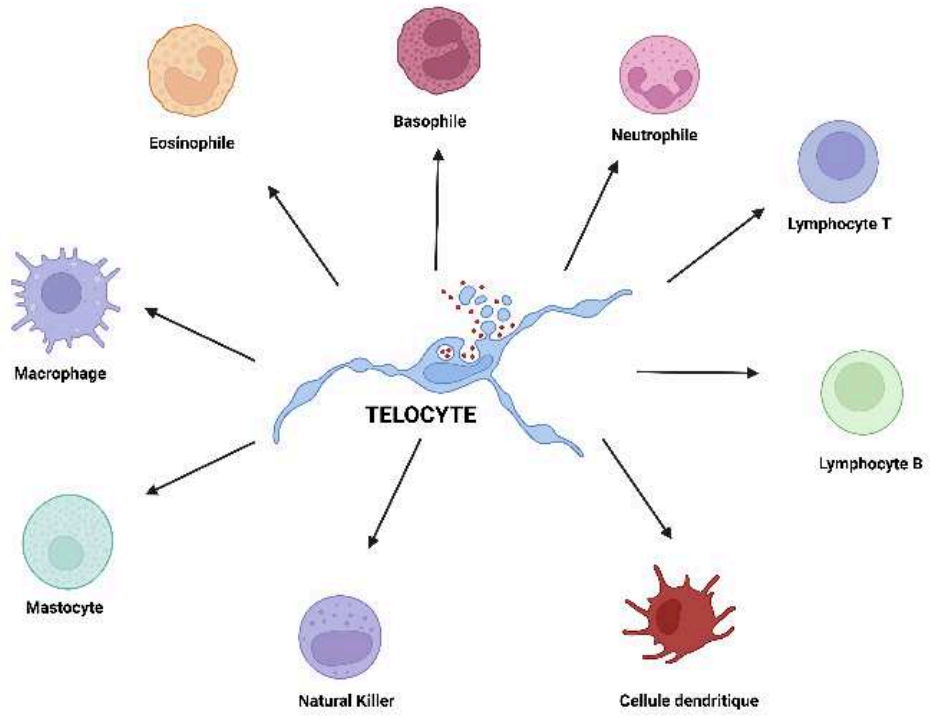


Figure 68: Résumé des cellules immunitaires identifiées comme interagissant avec le TC

Inspiré de Shi et al[440].

De plus, les TC cardiaques expriment plusieurs *Toll Like Receptors* (TLR), notamment TLR2 dont l'expression prédominante suggère une implication active dans l'immunosurveillance[441]. L'activation de ces récepteurs par des PAMPs et DAMPs pourrait induire d'une part, la sécrétion de chimiokines comme CXCL5 et CXCL6, favorisant le recrutement des neutrophiles[407], et d'autre part, un phénotype immunosuppresseur, limitant la suractivation des lymphocytes T. Ces observations corroborent avec la disparition marquée des TC dans des pathologies auto-immunes et inflammatoires chroniques[442–444]. En parallèle, selon le contexte physiopathologique, les TC participent à la polarisation des macrophages[429].

5.8. Dérégulations et pathologies

Si les TC jouent un rôle essentiel dans l'homéostasie tissulaire et la communication intercellulaire, leur dérégulation est impliquée dans divers contextes pathologiques. Cela comprend souvent des altérations de leur nombre, de leur localisation ou de leurs fonctions dans plusieurs maladies notamment les tumeurs ainsi que les affections cutanées.

5.8.1. Processus tumoral bénin et cancéreux

- **Tumeurs bénignes : exemple de l'hémangiome infantile :**

Dans l'HI, les TC sont hyperplasiques et ils pourraient contribuer activement à la régulation de l'environnement vasculaire, notamment via la production de noradrénaline. En effet, ils expriment les enzymes clés de la voie de synthèse des catécholamines ainsi que les structures de stockage compatibles avec une sécrétion régulée. Cette hypothèse est particulièrement pertinente dans le contexte de la phase proliférative de l'HI, marquée par des concentrations élevées de noradrénaline[278]. Les effets de cette production pourraient s'exercer à la fois de manière paracrine sur les EC et les péricytes, mais également de façon autocrine car les TC expriment eux même le récepteur ADRB2[381].

Par ailleurs, les TC dans l'HI présentent un phénotype fonctionnel particulier, marqué par une forte expression d'aquaporine-1 (AQP1), un canal hydrique. L'expression d'AQP1 semble dépendante de la signalisation β-adrénergique. L'inhibition pharmacologique ou génétique d'ADRB2 entraîne une diminution marquée de son abondance cellulaire. Ce phénomène s'accompagne, en modèle de coculture d'une réduction des capacités de tubulogenèse des EC issues d'HI, soulignant leur rôle dans la modulation de l'angiogenèse[381]. Ces éléments suggèrent que les TC, via leur activité

catécholaminergique et leur phénotype AQP1-dépendant, pourraient jouer un rôle central dans le cycle de croissance de l'HI.

- **Tumeurs malignes :**

Les TC jouent un rôle ambivalent dans les cancers, en fonction du type tumoral : ils sont pro- ou antitumoraux. La littérature rapporte des résultats parfois contradictoires, soulignant l'importance du contexte cellulaire.

Par exemple, dans le carcinome hépatocellulaire, les TC sécrètent des MMP, cytokines et facteurs de croissance activant les voies PI3K/Akt ou MAPK/ERK dans les cellules tumorales, favorisant ainsi leur prolifération, leur survie et les métastases[445,446]. Dans certains contextes, ils modulent l'environnement immunitaire, en contribuant à l'immunosuppression, en stimulant l'angiogenèse ou en interagissant avec des fibroblastes associés au cancer (CAF)[445,447].

À l'inverse, dans d'autres types de cancers, les TC semblent exercer un rôle antitumoral, ce qui pourrait expliquer leur diminution progressive au cours du développement de certains cancers. Dans le cancer du sein, une baisse significative du nombre de TC est observée, en particulier dans les formes agressives de cancers du sein triples-négatifs[448]. Certaines données indiquent qu'ils pourraient freiner la dissémination métastatique des cellules tumorales par la sécrétion de miR[449]. Leur disparition pourrait résulter d'une pression exercée par les cellules tumorales elles-mêmes via la création d'un stroma fibreux, peu favorable à leur survie ou par l'induction de leur différenciation. Une étude histologique de 2021 a montré que les TC mammaires $CD34^+$ peuvent progressivement perdre leur phénotype au profit d'un phénotype αSMA^+, suggérant leur transition vers un état de CAF qui seraient réquisitionnés par la tumeur pour soutenir sa croissance[450].

Dans les carcinomes cutanés, cette perte est accompagnée d'une réduction de leurs jonctions hétérocellulaires, suggérant un affaiblissement de leurs capacités à maintenir l'homéostasie tissulaire[451].

5.8.2. Pathologies cutanées

La sclérodermie est une maladie auto-immune rare pouvant affecter la peau et divers organes internes. Elle repose sur quatre altérations majeures : la production d'autoanticorps, une inflammation chronique, une fibrose excessive et une atteinte microvasculaire. Cliniquement, elle se caractérise par un durcissement progressif de la peau, associé à une rigidification et une fibrose des parois capillaires, conduisant à une ischémie tissulaire chronique. Bien que peu documentée à ce jour, une perte progressive des TC a été rapportée au cours de l'évolution de la maladie, en particulier dans les zones

fibrosées[452,453]. Cette diminution s'accompagne d'altérations morphologiques notables comprenant une vacuolisation du corps cellulaire et une fragmentation des télopodes en réponse à l'ischémie et à l'inflammation chronique. La disparition des TC pourrait entretenir un cercle vicieux, en compromettant le soutien des micro-vaisseaux et la régulation de l'angiogenèse. Compte tenu de leur rôle clé dans l'organisation cellulaire et matricielle du tissu, leur perte pourrait profondément désorganiser l'architecture dermique[373]. Enfin, elle pourrait également favoriser l'activation incontrôlée des fibroblastes, aggravant la fibrose cutanée[421]. Des observations similaires ont été rapportées dans le psoriasis, où les TC sont également significativement diminués au sein des lésions cutanées. Ils présentent des signes d'apoptose et de dégénérescence, avec une fragmentation de leurs télopodes et la perte de leurs contacts périvasculaires. Leur densité augmente à nouveau après un traitement local par corticoïdes anti-inflammatoires, retrouvant une distribution comparable à celle observée dans la peau non lésée[444].

RÉSULTATS

Nous avons formulé l'hypothèse que les TC participent activement à la régression de l'HI en induisant un phénomène de remodelage vasculaire, contribuant à la transition d'un état prolifératif vers un réseau plus stable et mature. Nous avons ainsi cherché à déterminer si la régression résultait bien d'un remodelage coordonné et si les TC pouvaient en être des acteurs clés. Pour répondre à ces questions, notre travail s'articule ainsi autour de trois grands axes :

1) Le développement du protocole d'imagerie 3D pour visualiser et quantifier la vascularisation cutanée humaine : en combinant l'optimisation de la transparisation et des pipelines de quantifications bio-informatiques pour la morphométrie.

2) La caractérisation du processus de régression de l'HI et du rôle des TC cutanés dans ce remodelage : en concevant un modèle 3D d'angiogenèse qui inclue des TC dérivés de patients et qui permet une analyse fonctionnelle du remodelage observé lors de l'imagerie 3D des tissus de patients, ainsi qu'en évaluant les acteurs moléculaires.

3) Le profilage protéomique des TC cutanés sains et d'HI en régression pour identifier les marqueurs et les fonctions moléculaires associés à leur activité régulatrice.

PARTIE 1 – Développement d'un protocole d'imagerie 3D compatible avec le tissu cutané humain

Les techniques de transparisation ont profondément transformé l'analyse morphologique des tissus en permettant l'imagerie 3D à haute résolution d'organes entiers et notamment des réseaux vasculaires. Si ces approches ont démontré une efficacité remarquable dans des organes faiblement pigmentés comme le cerveau, leur transposition à la peau demeure complexe. La peau est en effet un tissu dense, riche en MEC et fortement pigmenté, ce qui limite la propagation unidirectionnelle du faisceau lumineux et compromet la pénétration des anticorps. Ces protocoles se révèlent donc peu adaptés. Les biopsies cutanées conservent souvent une pigmentation résiduelle importante, entraînant un bruit de fond fluorescent élevé, une atténuation du signal en profondeur et une altération de la qualité des images.

Pour surmonter ces limitations, nous avons développé une nouvelle génération de protocole de transparisation : Skin-iDISCO^{+}. Les étapes de dépigmentation ont été largement améliorées afin d'obtenir une transparence homogène tout en préservant l'intégrité tissulaire. Les phases de délipidation et de déshydratation ont été ajustées pour minimiser les déformations et rendre la méthode compatible avec une analyse morphométrique quantitative. Nous avons aussi établi un panel d'anticorps validés spécifiquement pour cette approche car compatibles avec les solvants organiques, et permettant la visualisation fine et robuste des composants cellulaires de la vascularisation humaine.

Ces travaux ont fait l'objet d'une publication dans le journal STAR Protocols (Cell Press), le 26 décembre 2024. Il a aussi été republié dans l'édition spéciale annuelle (STAR Protocols Editors Collection 2024) et l'une des images obtenues avec Skin-iDISCO^{+} a été choisie pour faire la couverture de cette édition (**Figure 69**).

Article 1: Skin-iDISCO^{+}: An optimized tissue-clearing and labeling protocol for morphometric analysis of human cutaneous vasculature.

Léa Pechtimaldjian, Muriel Cario, Jérémie Teillon, Sébastien Marais, Sébastien Dupichaud, Hamid-Reza Rezvani et François Moisan.

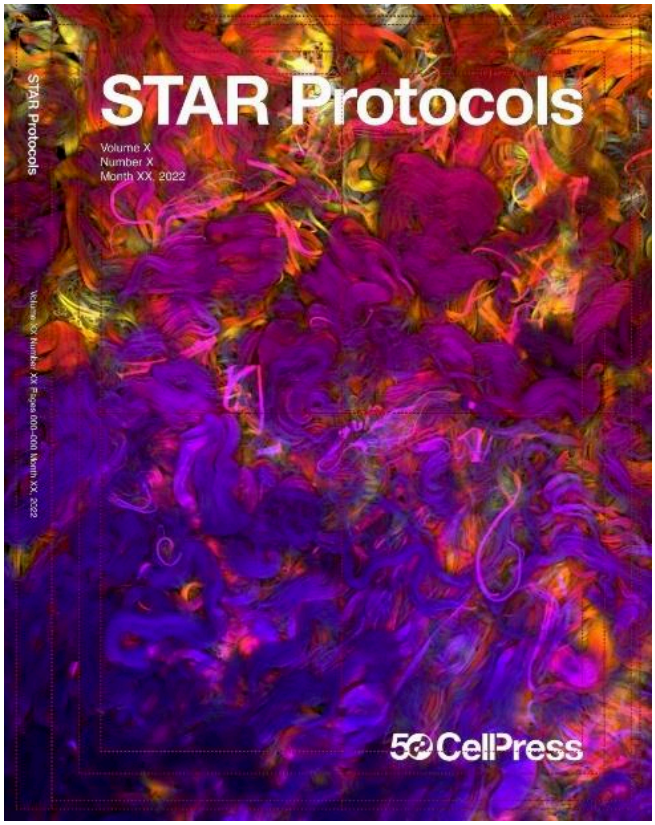


Figure 69: Couverture de l'édition spéciale 2024 de STAR protocols

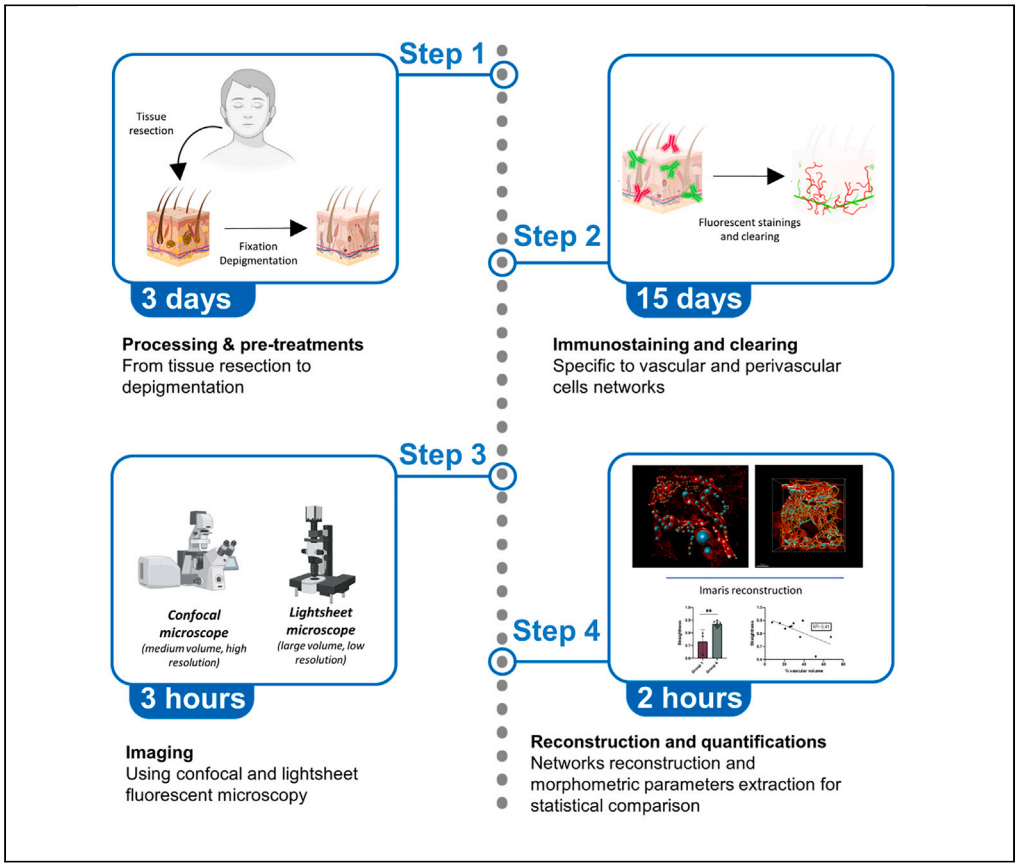
Marquage au Fast Green du collagène d'un prépuce transparisé par Skin-iDISCO^{+}. L'image a été projeté et les couleurs de pixels ont été assignées selon la position dans la pile d'image (color depth coding).

STAR Protocols

CellPress
OPEN ACCESS

Protocol

Skin-iDISCO^{+}: An optimized tissue-clearing and labeling protocol for morphometric analysis of human cutaneous vasculature



Tissue clearing enables deep imaging of long biological structures using light microscopy approaches. Protocols such as iDISCO are not currently available for human skin. Here, we present Skin-iDISCO^{+}, a tissue-clearing and labeling protocol for morphometric analysis of human cutaneous vasculature. We describe steps for processing and pre-treating tissue, immunostaining, clearing, and imaging using confocal and light-sheet fluorescence microscopy. We then detail procedures for the reconstruction of networks and the extraction of morphometric parameters of the skin vasculature.

Publisher's note: Undertaking any experimental protocol requires adherence to local institutional guidelines for laboratory safety and ethics.

Léa Pechtimaldjian, Muriel Cario, Jérémie Teillon, Sébastien Marais, Sébastien Dupichaud, Hamid-Reza Rezvani, François Moisan

lea.pechtimaldjian@u-bordeaux.fr (L.P.)
francois.moisan@u-bordeaux.fr (F.M.)

Highlights

Protocol for efficient decolorization of skin pigments

Faster protocol while limiting architectural and molecular deformations of biopsies

Validated antibody panel revealing every cellular component of human vasculature

Semi-automated analysis pipeline for the study of morphometric parameters of vessels

Pechtimaldjian et al., STAR Protocols 6, 103524
March 21, 2025 © 2024 The Authors. Published by Elsevier Inc.
https://doi.org/10.1016/j.xpro.2024.103524

STAR Protocols

CellPress
OPEN ACCESS

Protocol

Skin-iDISCO$^+$: An optimized tissue-clearing and labeling protocol for morphometric analysis of human cutaneous vasculature

Léa Pechtimaldjian,[1,4,*] Muriel Cario,[1] Jérémie Teillon,[2] Sébastien Marais,[2] Sébastien Dupichaud,[3] Hamid-Reza Rezvani,[1] and François Moisan[1,5,*]

[1]University Bordeaux, Inserm, Bordeaux Institute of Oncology (BRIC), UMR 1312, F-33076 Bordeaux, France

[2]University Bordeaux Imaging Center (BIC), Photonic Microscopy Unit, Bordeaux, France

[3]Carl Zeiss SAS, ZEISS Group, Rueil-Malmaison, France

[4]Technical contact

[5]Lead contact

*Correspondence: lea.pechtimaldjian@u-bordeaux.fr (L.P.), francois.moisan@u-bordeaux.fr (F.M.)
https://doi.org/10.1016/j.xpro.2024.103524

SUMMARY

Tissue clearing enables deep imaging of long biological structures using light microscopy approaches. Protocols such as iDISCO are not currently available for human skin. Here, we present Skin-iDISCO$^+$, a tissue-clearing and labeling protocol for morphometric analysis of human cutaneous vasculature. We describe steps for processing and pre-treating tissue, immunostaining, clearing, and imaging using confocal and light-sheet fluorescence microscopy. We then detail procedures for the reconstruction of networks and the extraction of morphometric parameters of the skin vasculature.

For complete details on the use and execution of this protocol, please refer to Renier et al.[1]

BEFORE YOU BEGIN

This protocol aims to describe the main guidelines of an optimized iDISCO$^+$ protocol,[2] that we named Skin-iDISCO$^+$. It includes 1) Skin processing, 2) Fixation, 3) Pre-treatments, 4) Immunostainings, 5) Tissue clearing, 6) Imaging 7) Vascular reconstruction and quantifications of morphometric parameters.

The protocol is fully adapted to both healthy and pathological skin. Immunostaining has been optimized to reveal both physiological (foreskin) and tumor vasculature (infantile hemangioma).

Use of human specimens: Regulations and policies

All experiments were approved by an appropriate ethics committee and followed institutional and national guidelines.

All samples were obtained after consent from the patients or their family/legal guardians and were anonymized.

Recommended computer configuration

3D imaging generates large datasets, the analysis of which requires significant computational resources. Having a suitable workstation is essential for advanced studies such as the reconstruction of complex networks. The system we used for all analysis presented in the "expected outcomes" section is as follow.

STAR Protocols 6, 103524, March 21, 2025 © 2024 The Authors. Published by Elsevier Inc.
This is an open access article under the CC BY-NC license (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).

1. Processor: Intel Core i5–13400.
2. Memory: 32 GB RAM DDR5.
3. Graphics: NVIDIA Quadro RTX A2000 12 GB.
4. OS: MS Windows 11 × 64.

Alternatives: Please refer to Imaris website (https://imaris.oxinst.com/support/system-requirements) to check the recommended system requirements for version 10.0.

KEY RESOURCES TABLE

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
Chemicals, peptides, and recombinant proteins		
Paraformaldehyde (PFA) 32%	Fisher Scientific	Cat#16337591
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	Merck Millipore	Cat#D5879
Dichloromethane	Merck Millipore	Cat#270997
Hydrogen peroxide (H_2O_2) 30%	Merck Millipore	Cat#H1009-100
Dibenzyl ether (DBE)	Merck Millipore	Cat#33630
Sodium azide	Merck Millipore	Cat#1066880100
Phosphate-buffered saline (PBS) tablet	Merck Millipore	Cat#P4417
Triton X-100	Merck Millipore	Cat#T8787
Skin bovine gelatin (type B)	Merck Millipore	Cat#G9382
Methanol	Fischer Scientific	Cat#11318157
Glycine	Euromedex	Cat#26-128-6405-C
Mounting medium (resin)	Eukitt	Cat#6.00.01.0001.04.01.01
Antibodies		
Anti-αSMA mouse (clone 1A4) (1:1,000)	Abcam	Cat#AB7817; RRID: AB_262054
Anti-αSMA rabbit (clone 5H7) (1:2,000)	Proteintech	Cat#80008-1-RR; RRID: AB_2882938
Anti-aquaporin 1 rabbit (1:1,000)	Merck Millipore	Cat#AB2219
Anti-aquaporin 1 mouse (clone 2E5D6) (1:1000)	Proteintech	Cat#66805-1-Ig; RRID: AB_2882148
Anti-CD31 mouse (clone JC70) (1:100)	Cell Marque	Cat#131M-94; RRID: AB_1516761
Anti-CD31 mouse (1:2,000)	Proteintech	Cat#11265-1-AP; RRID: AB_2299349
Anti-CD34 mouse (clone 4F11H3) (1:1,000)	Proteintech	Cat#60180-2-Ig; RRID: AB_2881354
Anti-GLUT1 rabbit (1:1500)	Proteintech	Cat#21829-1-AP; RRID: AB_10837075
Anti-ICAM1 mouse (clone 2F9A8) (1:1,000)	Proteintech	Cat#60299-1-Ig; RRID: AB_2881414
Anti-tryptase mouse (clone AA1) (1:2,000)	Abcam	Cat#AB2378; RRID: AB_303023
Goat anti-rabbit Alexa 488 (H + L) (1:500)	Invitrogen	Cat#A11008
Goat anti-mouse Alexa 568 (H + L) (1:500)	Invitrogen	Cat#A11011
FlexAble CoraLite Plus 647 anti-mouse IgG2a	Proteintech	Cat#KFA043
TOPRO-3 iodide (1:1,000)	Fisher Scientific	Cat#T3605
Fast green (1:300)	Fisher Scientific	Cat#11407847
Software and algorithms		
BioRender	BioRender	https://www.biorender.com
GraphPad/Prism	Graphpad Software	https://www.graphpad.com/features
Imaris	Oxford Instrument	https://imaris.oxinst.com/products/imaris-for-neuroscientists
ImageJ/Fiji	NIH	https://imagej.nih.gov/ij/ Plugin 3D viewer[3] and Bio-Formats[4]
Other		
1,5 mL polypropylene tubes (Eppendorf)	Fisher Scientific	Cat#10518721
2 mL polypropylene tubes (Eppendorf)	Fisher Scientific	Cat#10241931
Scalpel	VWR	Cat#SWAN9220
Blade	VWR	Cat#SWAN9271
Forceps	VWR	Cat#232–1230
50 mL syringe	Terumo	Cat#SS+50L1
18G needle	Terumo	Cat#AN*1838R1

(*Continued on next page*)

Continued		
REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
3D printer	Alphawise	Cat#U20
Polylactic acid (PLA) 1,75 mm diameter	Dailyfil	Cat#141360
Slide spacer 3 mm	Sunjin Lab	Cat#IS004
Superfrost glass slide	Fisher Scientific	Cat#17234884
Glass coverslip 0.17 mm thickness	VWR	Cat#43210.KG
Tube revolver rotator	Thermo Fisher Scientific	Cat#88881001
Hard glue	Locite	Powerfix super-glue 3
Confocal microscope	Leica	Leica DM6 CFS TCS SP8 (more details in materials and equipment section)
Light-sheet microscope	Carl Zeiss	Light-sheet 7 (more details in materials and equipment section)

MATERIALS AND EQUIPMENT

- **Decolorization solution** (10% H_2O_2): add 3.3 mL of 30% H_2O_2 to 6.7 mL of 1X-PBS.

  Note: Decolorization solution requires an extemporaneous preparation because H_2O_2 is sensitive to light and oxygen.

  ⚠ CRITICAL: H_2O_2 is a strong oxidizer that could create explosive chemical reactions if mixed with some substances. Moreover, with high concentrations it could provoke some skin burns, respiratory and ocular irritations. Please, handle it with adequate equipment such as gloves and lab coat, in a fume hood.

- **Delipidation solution**: add 66 mL of dichloromethane to 34 mL of 100% methanol.

  Note: Solution can be stored a month at room temperature (RT, 18°C–24°C).

  ⚠ CRITICAL: Dichloromethane and methanol are dangerous substances that need to be handled under a fume hood with gloves and goggles. Dichloromethane could lead to headaches, lung irritation and an increased risk of cancer. Methanol causes neurological disorders, blindness, and organs failure.

- PBST solution.

Reagent	Final concentration	Amount
PBS tablet	1X	2 tablets
Triton X-100	0.2%	0.8 mL
ddH_2O	No	399 mL
Total volume	–	400 mL

Note: Triton X-100 is highly viscous, positive-displacement pipette or cutting the edge of your tips is recommended to properly collect volumes. Avoid backflows.

Note: Do not a use solution older than a month at RT.

- **Saturation solution:** add 0.1 g of bovine skin gelatin in 50 mL of PBST solution (please refer to the above table) in a falcon.

Note: Heat the solution for 10 min at 60°C to accelerate the solubilization of the gelatin in a water-bath.

⚠ CRITICAL: Saturation solution requires an extemporaneous preparation because rapid contamination could alter the clarity of signals.

- Permeabilization solution.

Reagent	Final concentration	Amount
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	20%	10 mL
Glycine	5.75% (g/100 mL)	2.88 g
PBST (0,2% Triton)	No	40 mL
Total volume	–	50 mL

⚠ CRITICAL: DMSO is a component that could cause skin irritations and allergies. Manipulate it with suitable gloves.

Note: Store for less than a month at 4°C.

⚠ CRITICAL: All solutions should be complemented by 0,001% of sodium azide, for long storage. Manipulate carefully because of toxicity that could lead to death. Manipulate under a chemical fume hood with lab coat and gloves.

- **Fast green for collagen fibers staining:** add 3 mg of fast green in 5 mL of absolute methanol.

⚠ CRITICAL: Fast green has poor resuspension properties. Consequently, stock solutions should not exceed concentrations of 600 µg/mL. Store aliquots at −20°C.

- Characteristic and settings of confocal microscope.

Illumination	• Continuous 448 nm laser OPSL (20 mW) • Continuous 552 nm laser OPSL (20 mW) • Continuous 638 nm laser (30 mW)
Detection optic/Objective	• **Name:** PL FLUOTAR • **Magnification:** 10X • **Numerical aperture:** 0.3 • **Free working distance:** 11.0 mm • **Immersion:** dry • **Voxels size :** 0.6 × 7 µm (XY × Z) • **Name:** PL APO Corr CS2 • **Magnification:** 20X • **Numerical aperture:** 0.75 • **Free working distance:** 0.66 mm • **Immersion:** oil, glycerol, silicon oil • **Voxels size:** 0.3 × 2.5 µm (XY × Z)
Excitation filters	–
Detection system	• Photomultipliers (PMT)
Dichroic mirror	• Replaced by AOBS (acousto-optical beam splitter) system

- Characteristic and settings of light-sheet fluorescent microscope.

Illumination	• Transmission LED for sample positioning and overview • Class 3B lasers: 488 nm (Alexa 488, green) + 561 nm (Alexa 561 nm, red)
Illumination optic	• **Objective:** 10X/0.2 foc
Camera	• **Name:** sCMOS pco.edge 4.2 CLHS • **Number of pixels:** 1920 × 1920 pixels • **Pixels size:** 6.5 µm × 6.5 µm • **Bit depth:** 15 bits
Detection optic/ Objective	• **Name:** Clr Plan Neofluor • **Magnification:** 20X • **Numerical aperture:** 1.0 • **Free working distance:** 6.4 mm • **Immersion:** clearing immersion (1.53) • **Voxels size:** 0.18 × 5 µm (XY × Z)
Excitation filter	–
Detection system	• Secondary beam splitter • Long pass (LP) 490 nm (Alexa 488, green) • Long pass (LP) 510 nm (Alexa 568, red)
Emission filters	• Band pass (BP) 505–545 nm (Alexa 488, green) • Band pass (BP) 575–615 nm (Alexa 568, red)

- Software details.

Imaris version: 10.01 + Neuroscientist package.

Imaris license with the Neuroscientist package has a cost of around 30 000$ plus 4500$ per year for the assistance and updates.

Alternatives: Local imaging facilities can generate satellite licenses of various durations, allowing the software to be rented.

Alternatives: Imaris is an expensive software, but the most adapted for the reconstructions and analysis presented in the quantification and statistical analysis section. Some open-source softwares could partially replace Imaris, such as 3D Slicer for projection and ITK-SNAP for task automatization and reconstruction.[5]

STEP-BY-STEP METHOD DETAILS

Figure 1 summarizes the main steps of the Skin-iDISCO+ protocol.

Sample processing (dissection, fixation)

Timing: 2 days

Tissue processing is essential for the long-term preservation for the subsequent immunolabeling and imaging.

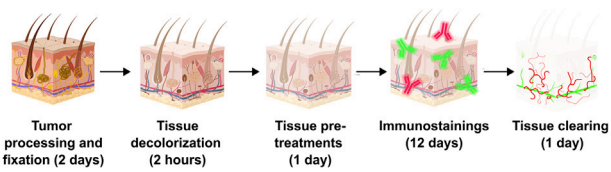


Figure 1. Summary of Skin-iDISCO+ steps

1. Tissue dissection.
   a. Washes: wash your samples twice to remove blood residue in cold PBS.

   Note: Use 10 cm Petri dishes filled with 10 mL PBS. Emerge samples 2 min in each bath with a manual and gentle agitation.

   b. Dissection: remove the fat from hypodermis and areas burned by the cauterizing knife, using a sharp scalpel blade.
   c. Sectioning: cut in smaller parts the initial sample to provide several pieces of tissue that could be used in different experiments and staining.

   Note: We recommend cutting it into cubes of 1–5 mm thick (25–100 mm^3).

   Note: Skin-iDISCO$^+$ has been optimized to work with patient biopsies ranging from 25 to 100 mm^3. For larger samples, the incubation time needs to be extended.

   ⚠ CRITICAL: Working on unfixed human samples requires special attention. Please refer to your institution guidelines. (and)

2. Fixation.
   a. Fix samples in 4%-paraformaldehyde (PFA) diluted in 1X-PBS, for 15–24 h at 4°C, without agitation.

   Note: Do not exceed 24 h of fixation which could alter tissue antigenicity and architecture or increase fluorescent background due to over cross-linking.

   b. Washes: perform 15 washes with 1X-PBS, each 5 min long.

   Note: We observed that multiple short washes are more effective and faster to remove PFA excess, compared to fewer long washes.

3. Samples storage: store samples in a solution of 0.001%-sodium azide diluted in 1X-PBS at 4°C to avoid contamination and tissue degradation.

   Optional: If PBS becomes cloudy and colored, replace it to maintain an optimal sample preservation. We recommend renewing PBS-0.001% sodium azide every two months.

   Alternative: Skin-iDISCO$^+$ is also adapted to paraffin embedded samples (FFPE), if fresh tissue is not available. However, an additional step of dewaxing is needed.

Heat FFPE blocks 2 h at 60°C and incubate them 1.5 h in xylene solution. Wash xylene in 2 baths of 1.5 h of absolute ethanol. Do not forget to rehydrate your samples with increasing ethanol baths for 1 h each. You can refer to Data S1 to see an example of staining on a sample previously embedded in paraffin.

Sample pre-treatments (dehydration, delipidation)

Timing: 1 day

The initial iDISCO$^+$ protocol[6] requires long pre-treatment steps that are crucial to prepare the sample for immunostaining and clearing. Tissue opacity is associated with light absorbance because of pigments and light scattering because of the heterogeneity of refractive index. This section aims to prepare the sample to reduce their murkiness, by removing pigments, lipids, and water.

However, the original protocol does not deliver an efficient decolorization step for pigmented tissue such as skin. To address this limitation, we adapted the tissue depigmentation process to offer a more efficient approach for highly pigmented tissue, while also reducing incubation time.

4. Tempering: Allow samples to reach RT for 10 min.
5. Depigmentation: incubate samples in the decolorization solution, for 2 h at 60°C.

⚠ CRITICAL: To get efficient decolorization, put your samples in tubes without agitation. Bubbles reduce the efficiency of hydrogen peroxide. Make sure to puncture the lid of tubes because heating produces gas.

Refer to Figure 4 which illustrates depigmentation results.

6. Dehydration:
   a. Incubate samples with 20%, 40%, 60%, 80% and 100% methanol, diluted in distilled water, each 10 min long at RT, under rotation.
   b. Incubate samples for a final dehydration with 100% methanol, 20 min at RT, under rotation.

Note: Skin-iDISCO+ protocol has validated shorter incubation times compared to original iDISCO^{+}, that suit smaller sample volumes.

Pause point: Samples may be stored indefinitely in 100% methanol at 4°C.

7. Delipidation:
   a. Delipidation: incubate samples in the delipidation solution for 1 h at RT, under agitation.

⚠ CRITICAL: Remember to fill completely all tubes and bottles to avoid dichloromethane oxygenation that would create tissue oxidation and browning.

   b. Washes: incubate samples twice with 100% methanol, each 30 min long at RT, under agitation.

Pause point: Samples can be stored indefinitely in 100% methanol.

8. Rehydration:
   a. Rehydration: incubate samples with 80%, 60%, 40% 20% methanol and distilled water, each 10 min long at RT, under agitation.
   b. Washes: incubate samples twice in PBST, each 5 min long at RT, under agitation.

Immunostaining (permeabilization, saturation, and antibody incubation)

Timing: 15 days

Finding suitable antibodies and the optimal conditions for the staining are the most time-consuming steps.

9. Permeabilization: incubate samples in the permeabilization solution, 24 h at 37°C, under agitation.
10. Saturation: incubate samples in a fresh mix of saturation solution, overnight (12 h) at 37°C, under agitation.
11. Antibody staining:
    a. Primary antibody: incubate samples with primary antibodies diluted in saturation solution with the correct dilution.

Note: Incubation must be performed for 6 days, at 37°C, under agitation.

Optional: If using Flexable technology, primary antibodies need to be coupled before according to the manufacturer recommendations.

⚠ CRITICAL: Validating the specificity of the antibody is key for accurate outcomes. We recommend preparing control samples with only the primary or the secondary antibody (or with a denaturated antibody).

b. Washes: incubate samples twice in PBST each 1 h long at 37°C, under agitation. The third wash must be performed overnight in PBST, at 37°C, under agitation.
c. Secondary antibody: incubate samples, protected from light with secondary antibodies diluted in saturation solution with the correct dilution.

Note: Incubation must be performed for 6 days at 37°C, under agitation.

Optional: If you wish to stain nuclei, we recommend using TOPRO-3 dye which is more adapted than DAPI for solvent-treated samples. DAPI is indeed not compatible with methanol and dichloromethane and low wavelength excitation lasers do not penetrate thick tissues. Add TOPRO-3 three days before the end of the secondary antibodies' incubation. Refer to Figure 7C to see a nuclear staining.

⚠ CRITICAL: TOPRO-3 is a highly sensitive dye, light protection is critical.

d. Washes: incubate your samples twice in PBST, each 1 h long at 37°C, under agitation. The third wash must be performed overnight in PBST, at 37°C, under agitation.

Tissue clearing (dehydration, delipidation, RI matching)

Timing: 1 day

This section aims to make samples transparent by removing water and lipids that participate to light scattering. Similar to the pre-treatments section, the tissue-clearing part is composed by dehydration and delipidation steps. Finally, refractive indexes (RI) are matched to 1.56, the refractive index of proteins.

12. Dehydration.
    a. Incubate samples with 20%, 40%, 60%, 80% and 100% methanol, each 10 min long at RT, under agitation.
    b. Incubate samples for a final dehydration 20 min in 100% methanol, under agitation.

Optional: To reveal collagen fibers with fast green an additional step of staining is needed.

Incubate samples with 2 µg/mL of fast green 2 h at RT in the dark. Wash twice for 30 min in pure methanol and realize the subsequent steps of the protocol.

Pause point: Samples can be stored in 100% methanol for an unlimited period.

13. Delipidation:
    a. Delipidation: incubate samples in the delipidation solution for 3 h at RT, under agitation.
    b. Washes: incubate samples twice with pure dichloromethane to remove methanol excess, each 15 min long at RT, under agitation.

Optional: To evaluate the absence of tissue deformations by performing hematoxylin and eosin staining samples could be at this step classically include in paraffin.

14. Refractive index matching: incubate samples in solution with RI = 1.56 such as dibenzyl-ether (DBE), under agitation for 1 h maximum at RT.

⚠ CRITICAL: Long agitation oxygenate and oxidize samples which could create tissue browning. Refer to the troubleshooting section to see an example of an oxidize sample. You can also refer to Figure 5 to see an example of efficient tissue clearing.

Alternative: DBE is a corrosive solvent that could have health consequences, notably by provoking eye and skin irritations, neurological and reproductive disorders. Other chemicals with a refractive index of 1.56 could be used, such as ethyl cinnamate (ECi).

15. Storage of cleared samples: store samples in dark tubes filled with DBE at 4°C.

⚠ CRITICAL: DBE dissolves a wide range of plastics. Store samples in polypropylene tubes (Eppendorf or Falcon) and avoid plastic petri dishes. We recommend testing in advance the compatibility of your tubes by filling them with DBE overnight.

Note: No loss of fluorescence was detected after long storage (up to one year). As long as the sample is protected from light and the tubes are filled with DBE, the quality of the staining should not change.

Mounting and imaging

Timing: 3 h (depending on sample size and signal quality)

The choice of the type of microscopy is important and will condition samples mounting. We either worked on confocal or light-sheet fluorescent microscopes (LSFM) to image the sample by optical slicing (stack) stacking portions of the sample. We describe below the two different techniques and their applications.

16. Confocal laser scanning microscope (CSLM).

Note: CLSMs, devices often available in labs, are fully adapted for samples cleared with Skin-iDISCO$^+$.

⚠ CRITICAL: We strongly advise to use microscopes with straight objectives since the mounting systems are not totally watertight. Avoid DBE contact with objectives, as it is highly corrosive and can rapidly degrade them.

a. Sample mounting.
   i. 3D print slide chamber using the model presented in the following link (https://www.thingiverse.com/thing:3068750). Use polylactic acid that is resistant to DBE.
   ii. Glue the chamber on the slide with resin glue such as Eukitt. Hold them together with strong pliers 12 h.

Alternative: Commercial spacers are available. Refer to the key resources table for the reference. Spacers are removable and stackable for large samples.

   iii. Fill the well with 500 µL of DBE.
   iv. Add your sample.

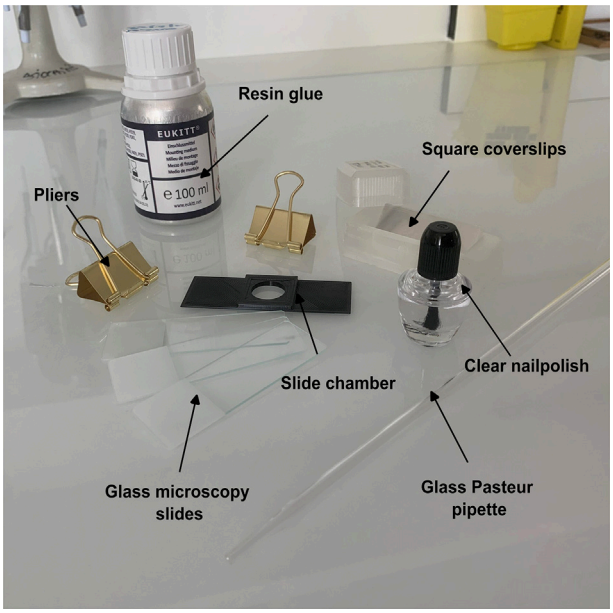


Figure 2. Tools needed to mount samples for confocal microscopy

v. Stick a square coverslip on the dedicated space of the well with nail polish.
vi. Carefully manipulate the slide to avoid bubbles formations.
You can refer to Figure 2 to see the tools needed and Video S1 to follow a tutorial to mount your samples.

Note: Check in our materials and equipment section the detailed description of parameters and characteristics of the microscope and imaging conditions.

⚠ CRITICAL: Keeping the sample for a long time in the mounting system would induce oxygenation and oxidation that would create tissue browning. For this reason, we recommend to systematically disassemble the mounting system immediately after imaging and store the sample in tubes filled with DBE.

b. Sample imaging.
We recommend starting with the x10 magnification to get a wide view of the sample and then increase to x20 oil for small structures.

⚠ CRITICAL: Objectives with high magnification (≥x20) have small working distance. It will limit the z-volume you can image. x10 magnification enable us to image samples up to 1.5 mm thick, while x20 magnification is limited to 500 µm maximum.

Note: Favor oil objectives. Typical immersion oils have a refractive index of 1.51 that is closer to glass (RI = 1.45 to 1.52) or DBE (RI = 1.56) than air (RI = 1.0). Reducing the heterogeneity of refractive indices in the path of the light beam limits its diffraction and thus improve imaging quality.

i. Place the sample on the microscope stage.
ii. Set the appropriate lasers and detector wavelengths (Table 1), the master gain by maximizing signal power and minimizing saturation.
iii. Set the offset to fix to 0 background pixels.
iv. Set the frame average depending on signal quality.

Table 1. Excitation and emission wavelength of fluorophore using the confocal microscope

Fluorophore	Excitation (nm)	Emission range (nm)
Alexa-Fluor 488	488	[500–540]
Alexa-Fluor 568	552	[590–630]
TOPRO-3	638	[660–750]

v. Define the highest and lowest sample stacks to determine the z-volume to be imaged. We recommend using a 1 µm z-step and 1 AU to get a suitable axial resolution.
vi. Start the acquisition.
Please refer to Figures 7A, 7B, 7C, 7D, and 7F to see examples of pictures acquired by a confocal microscope.

Note: CLSMs, devices often available in labs, are fully adapted for samples cleared with Skin-iDISCO$^+$.

⚠ CRITICAL: Export images in native format (.lif) to conserve metadata that enable to have access to all acquisition parameters.

17. Light-Sheet Fluorescent Microscopy (LSFM).
LSFM is designed for volumetric imaging, offering rapid acquisitions, reduced photobleaching and high resolution which can be isotopically adjust. Additionally, it provides a large working distance for an objective with a high numerical aperture. While the Miltenyi ultramicroscope enables the imaging of large samples such as mouse brains, the Zeiss Light-sheet 7 is better suited for medium samples, ranging from organoids to millimeter-thick tissues. We especially used the Light-sheet 7.
a. Sample mounting.
i. Securely stick the sample on *the Smart Sample Holder* with hard glue. Refer to Figure 3 to visualize the Smart Sample Holder.
ii. Fill the tank with DBE.
iii. In the maintain section, inform the software about the objective you selected.
iv. Place the sample holder on the platform.
v. Activate sample loading with the *Docking* button of ZEN software, to automatically load the holder.
vi. Position the sample in front of objectives.

Note: To define the correct position of the sample in front of illumination and detection objectives, we recommend alternating between the *Overview* and *Locate* mode. *Overview* utilizes a camera inside the microscope to provide a global position of the samples. *Locate* uses transmitted light to set the focus with the objectives.

b. Sample imaging.
i. Adjust the waist of the light-sheet to get its thinnest part through the sample.
ii. Set the power of laser, wavelengths and exposure time to achieve the maximal signal and lowest background noise (Table 2).
iii. Define the upper and lower sample stacks to determine the z-volume to be imaged.
iv. Start the acquisition.

Note:

Optional: We recommend activating the *Pivot Scan* to prevent the formation of shadow light during acquisition.

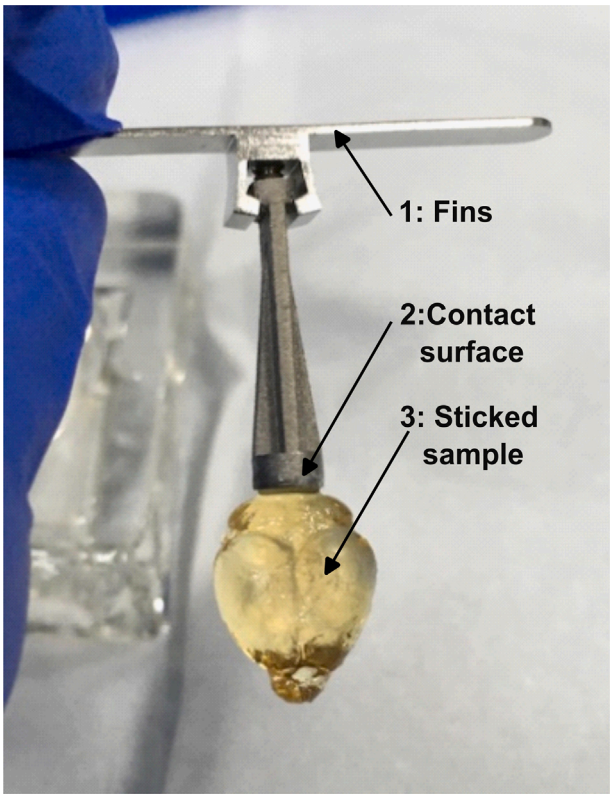


Figure 3. Example of a sample glued on the Smart Sample Holder
Pictured from Zeiss documentation.

⚠ CRITICAL: The z-volume is only limited by sample thickness and the objective focal length.

Please refer to Figure 7E to see an example of a vascular staining imaged by the Light-sheet 7 from Zeiss, with x20 magnification and 2.5 zoom.

⚠ CRITICAL: Export images in native format (.czi) to conserve metadata that enable to have access to all acquisition parameters.

EXPECTED OUTCOMES

Efficient decolorization of pigmented tissues

Tissue clearing methods such as iDISCO$^+$ have been extensively used in the field of neurosciences to enable volumetric imaging of samples. However, these techniques encounter difficulties when applied to colored tissue, which retains a large number of pigments, increasing light absorption and scattering. Recent efforts have attempted to develop molecular biology approaches to overcome this limitation, but they're specific to melanin and not suitable for human sample studies.[7] Otherwise, older papers suggest restricting studies on low phototypes that narrow the work to small and biased sample cohorts. They also propose to work with near-infrared

Table 2. Excitation and emission wavelength of fluorophore using the light-sheet fluorescent microscope

Fluorophore	Excitation (nm)	Emission range (nm)
Alexa-Fluor 488	488	[505–545]
Alexa-Fluor 568	561	[575–615]

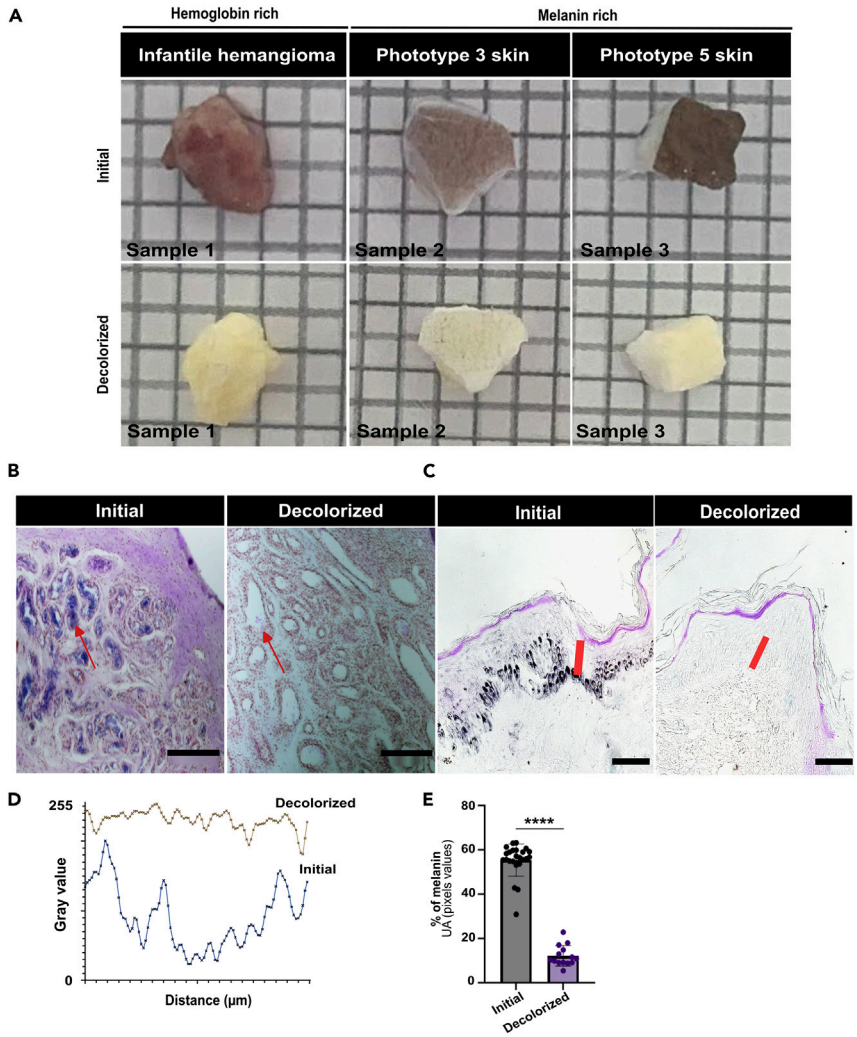


Figure 4. Efficient pigment removal of colored tissue

Comparison of pigmentation on samples before (initial) or after (decolorized) Skin-iDISCO^{+}.

(A) Macroscopic analysis of the decolorization step in hemoglobin or melanin rich tissue. Scale bar = 2 mm per tile.

(B) Hematoxylin-Eosin coloration, illustrating a reduction in hemoglobin coloration. Scale bar = 200 µm.

(C) Fontana-Masson coloration. Scale bar = 50 µm. Red lines are used for quantification in D.

(D) Pixel values along the red lines of C. 0 corresponds to black pixels and 255 to white pixels.

(E) Percentage of melanin according to the analyses of pixels on the pictures shown in C. Data are presented as means ± standard error of mean (SEM), Paired Student's t-test. α = 0.05: **** p<0.0001.

fluorophores to limit tissue absorption, which severely restricts available tools and co-staining approaches.[8]

In contrast, we have introduced a method to efficiently depigment samples through a simple immersion process by heating hydrogen peroxide, for a short period of time. Our approach maximizes tissue decolorization, as evident in macroscopic observation (Figure 4A) and histological assessments (Figures 4B and 4C). Furthermore, relative pigments quantifications (Figures 4D and 4E) demonstrate a stunning level of decolorization. This depigmentation technique, compatible with any pigments and tissue, offers promising results and addresses the limitations faced when working on pigmented tissues and human samples.

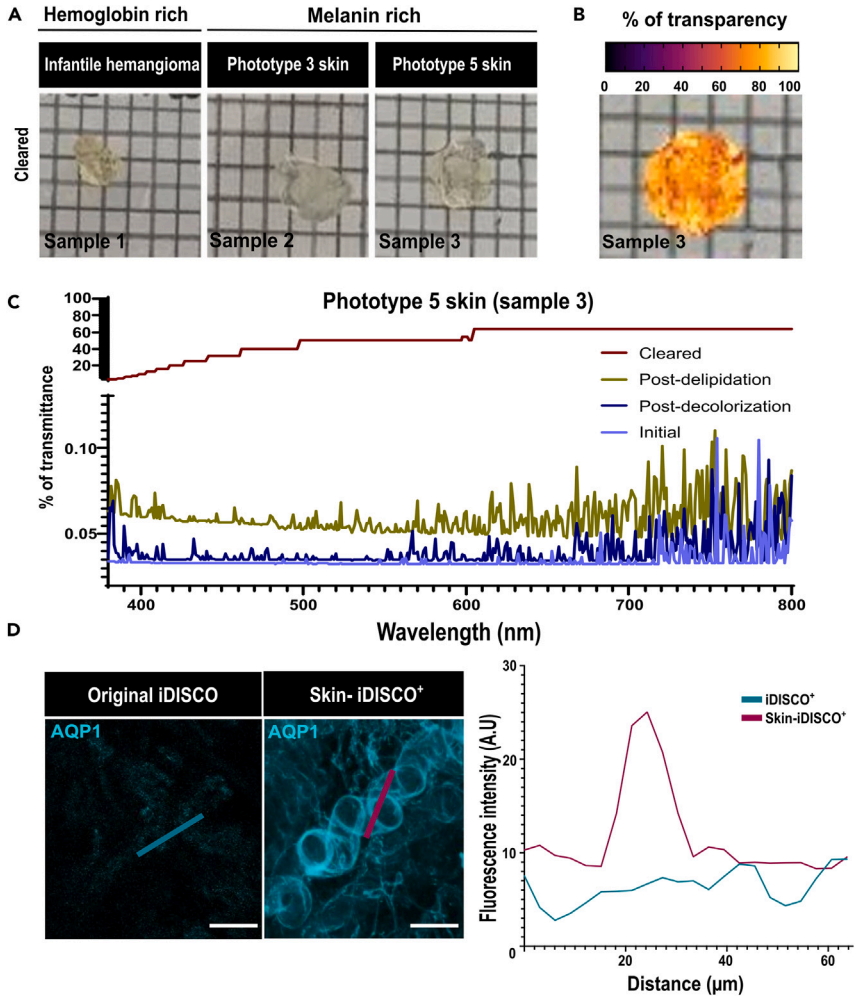


Figure 5. Efficient tissue-clearing for a better fluorescent signal

(A) Macroscopic analysis of tissue after Skin-iDISCO$^+$. Scale bar = 2 mm per tile.

(B) Transparency map of sample 3 with values derived from pixel analysis (C) Light transmittance measurement of sample 3. Light beam passage was quantified across the visible spectrum using absorbance, converted to transmittance (Transmittance = $10^{-absorbance}$).

(D) Signal quality assessment based on maximum projection images. In the left display, original iDISCO$^+$ gives weak AQP1 intensity while Skin-iDISCO$^+$ gives strong AQP1 intensity and well-defined structures. The right graph illustrates fluorescent signal quality along traced lines for samples processed with initial iDISCO$^+$ (cyan) versus Skin-iDISCO+ (purple).

Efficient tissue clearing

The ultimate goal of the tissue clearing protocol is to achieve transparency in samples, allowing the passage of the light beam for volumetric imaging. However, the effectiveness of these protocols can vary due to the heterogeneous composition of tissues. In particular, skin presents a complex challenge for clearing due to its matrix composition and pigmentation.

Macroscopic analysis (Figure 5A) demonstrates the high transparency achieved in the tissue, which is further confirmed through quantitative analysis of pixels (Figure 5B) and transmittance (Figure 5C).

A noteworthy finding is that improving tissue transparency directly improves signal quality (Figure 5D). This indicates that as the tissue becomes clearer, the imaging signal becomes stronger and more reliable, leading to better results. By effectively tackling the challenges related to

transparency, the described tissue clearing approach holds great potential for enabling volumetric imaging of complex tissues, as skin, thereby providing deeper fluorescence and a better understanding in both research and clinical application.

Low architectural deformations

iDISCO$^+$ is an aggressive protocol composed of cycles of dehydration, rehydration and delipidation, which may alter tissue integrity. Although it has been shown to be safe for preserving brain architecture, it is advised to compare the general organization of your tissues before and after tissue clearing to ensure accurate representation of native organization and appropriate quantitative imaging. As depicted in Figures 6A, 6B, and 6C no significant architectural deformations were observed at the structural level. This indicates that Skin-iDISCO$^+$ is well-suited for quantitative imaging.

Additionally, in contrast with previous applications of tissue-clearing on skin,[8,9] we proposed here the first protocol which does not use acid-denaturation of cutaneous collagen fibers (Figure 6D). Optimizing effective decolorization of pigments allows us to overcome the diffraction properties of collagen fibers. Skin-iDISCO$^+$ is thus designed to preserve the main matrix scaffold of skin appendages such as vessels, leading to reduced networks distortion.

Staining of the skin vasculature

Working on vasculature requires a comprehensive view of samples to track trajectory of vessels and to understand the supra-organization of peri-vascular cells, which is challenging to grasp in 2D. With Skin-iDISCO$^+$, we propose a robust vascular staining method that highlights the three main components of vessels: endothelial cells, pericytes and telocytes. Please refer to Figure 7 to see examples of human skin vasculature. You can also check Video S2 to see 3D projections of vessels in infantile hemangioma.

For detailed information on the staining protocol and optimized conditions you can refer to our materials and equipment to check references and concentrations.

These references provide valuable insights into the techniques used, enabling the achievement of reliable and standardized results in vascular studies.

> ***Note:*** The Supplemental Table S1 refers to antibodies not compatible with Skin-iDISCO$^+$.

QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS

Quantitative imaging is a discipline that complements descriptive imaging by facilitating the extraction of morphometric parameters, leading to more precise characterizations of structures.

You can find above a robust pipeline (Figure 8) using the Imaris software to reconstruct both vascular and perivascular cell networks, thereby enabling the extraction of their respective bio-architectural parameters. This approach empowers us to obtain quantitative data and gain deeper insights into the structural characteristics of these networks, enhancing our understanding of their biological significance.

> ***Note:*** Before the quantification, you need to convert your native image into the Imaris format called ims. You can either install the free Imaris converter or convert it manually in the Arena of Imaris software.

Image processing and corrections

The reconstruction of networks required clean images with the lowest background since it is mostly based on automatic detection. To maximize the intensity of the specific signal you can follow the bellow steps. Refer to Figure 9A to see an example of efficient picture processing.

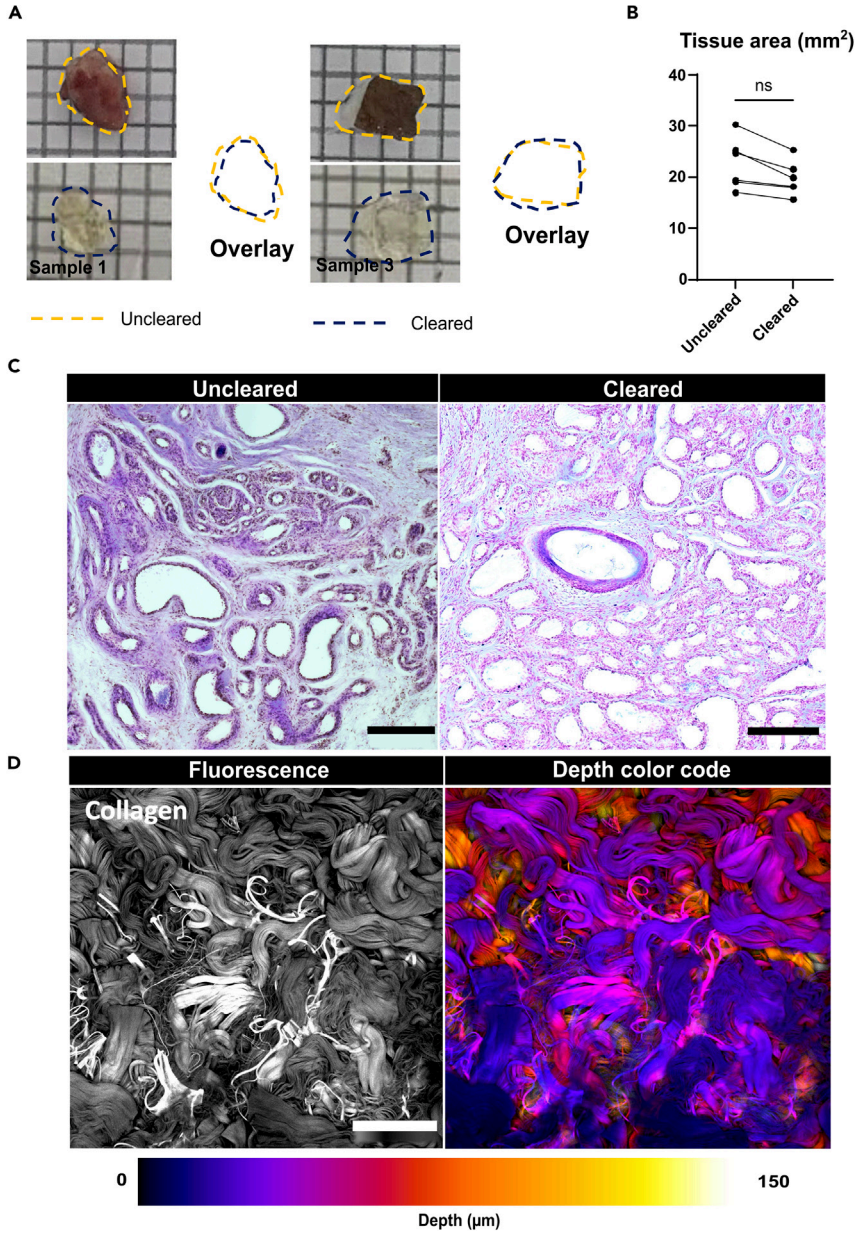


Figure 6. Low architectural and molecular deformations induced by Skin-iDISCO+

(A) Comparative analysis of macroscopic deformations in samples before (yellow) and after (dark blue) Skin-iDISCO+. Scale bar = 2 mm per tile.

(B) Global area variations of samples before and after tissue clearing. Paired Student t-test. α = 0.05; ns = non significant.

(C) Hematoxylin-Eosin staining demonstrates the absence of structural deformations in vessels between uncleared and cleared samples.

(D) Fast green staining highlights well-curved collagen fibers in cleared skins. The left panel correspond to fluorescence signal. The right panel corresponds to depth color coding, where pixels are assigned to colors based on depth.

1. Click on the Image *Proc* tool.
2. Apply background subtraction: to subtract the pixel values of the background from the pixels of the whole image. In the settings, enter the size of the biggest structure highlighted by your staining to limit the subtraction of specific signal (Figure 9B).

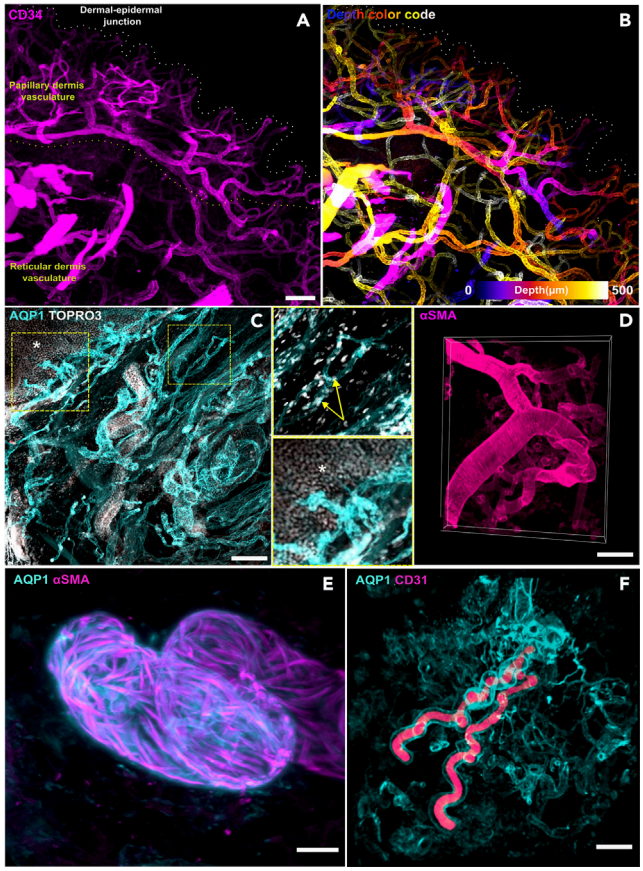


Figure 7. Spatial immunostaining of the cellular component of infantile hemangioma

(A) Physiological skin vasculature (foreskin) stained with CD34 (magenta). The white dotted line represents the dermal-epidermal junction separating the epidermis and the dermis. The yellow dotted line separates the papillary and reticular vasculature. Acquired with a confocal microscope (x10). Maximum projection (ImageJ). Scale bar = 50 µm.

(B) Temporal color code of image A) where pixels are assigned to a color according to their depth (C) Aquaporin-1 vascular staining (AQP1, cyan) and nucleus (TOPRO-3, white). The right pictures correspond to zooms of the yellow frames. White asterisks highlight the epidermis. Yellow arrows point to cell nucleus. IH sample, Acquired with a confocal microscope (x20). Maximum projection (ImageJ). Scale bar = 100 µm.

(D) Imaging of vascular networks showing smooth muscle cells (α SMA, magenta). IH sample, Acquired with confocal microscopy (x10). 3D reconstruction (Imaris). Scale bar = 200 µm.

(E) Eccrine duct imaging showing telocyte sheet (AQP1, cyan) and smooth muscle cells (α SMA, magenta). IH sample, Acquired with a light-sheet microscope. (x20, zoom 2,5) Scale bar = 20 µm. Maximum projection (ImageJ).

(F) Endothelium (CD31, magenta) and perivascular telocytes (AQP1, cyan) networks. IH sample, Acquired with a confocal microscope (x10). 3D reconstruction (Imaris). Scale bar = 100 µm.

Note: You can go to 2D slice and click on the two edges of your sample. The distance between the two points will appear on the right part of the software.

3. Median filter: to replace the value of a pixel by the median of the values of its neighborhood. In the setting, keep the automatic settings 3 × 3 × 1 (Figure 9B).

Optional: If the specific signal is low, we recommend adding a gamma filter that will increase the intensity of pixels with a low signal by applying a gamma function. Please note that the gamma function causes a non-linear change in pixel intensity, making it unsuitable for quantifying fluorescence intensity.

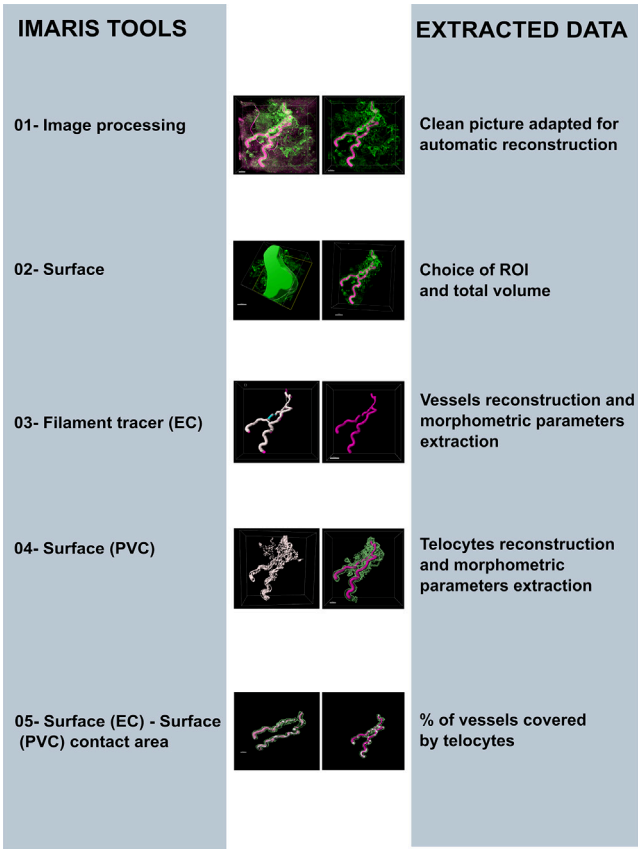


Figure 8. Summary of the different steps for network reconstructions

The left panel correspond to the tools used on Imaris. The right panel to extracted data.

Optional: If the image remains noisy after all those corrections you may apply masks. To do so you'll need to create a surface around the structures of interest and set the outsider pixels to 0. Use this tool carefully not to lose information.

Selection of a region of interest

3D imaging generates heavy pictures that could contain unneeded areas. We advise to determine region of interest (ROI) regions rich in information which will greatly improve the fluidity of the analysis. Moreover, for very complex vascular networks, we recommend sub-segmenting the picture in several ROI to facilitate reconstruction. We generally split complex acquisitions into at least 3 ROI to stay representative. To create a ROI on Imaris you must follow these steps.

4. Choose the *Surface Tool*.
5. Skip the automatic creation and edit manually.
6. Choose the channel of interest.
7. On the *Contour* button you will create a personalized shaped by:
   a. Activating the *Draw* mode in the *Board*.
   b. Choosing your drawing type in the *Mode*. We usually choose the mode that spaces seeds according to the distance covered with your mouse.
   c. Drawing the contour of your samples stack by stack.
   d. Creating a surface.
8. In the pen tool of *Surface* click on the *Mask selection* and set the outsider pixel to 0 on both channels.

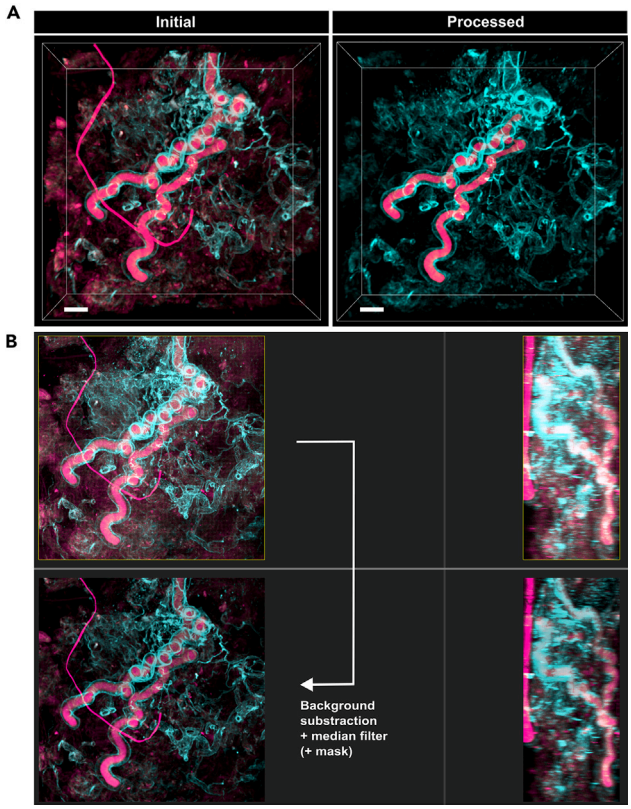


Figure 9. Picture processing and cleaning

(A) Comparison of the same picture before (initial) and after (processed) processing. Techniques applied include background noise subtraction (50 μm), a 3 × 3 × 1 median filter and masking.

(B) Visual differences in image quality between the original (top panel) and processed (bottom panel) versions following the described process.

9. In the statistic tool of *Surface* retrieve the volume of the selected ROI for later normalization.

Vascular reconstruction

The *Filament Tracer* tool was initially developed to reconstruct the neuronal networks of the brain but is now adapted for vascular network reconstruction. Figure 10A summarizes the main steps of the reconstruction. Figure 10B details the steps and settings for our example of reconstruction.

10. Choice of algorithm: we usually choose the fifth algorithm where no origin needs to be detected in the interconnected networks (1/6).
11. Choice of the right fluorescent channel (endothelial cell staining) (2/6).
12. Choice of the type of network (homogenous or heterogeneous diameter): if the vessels diameters are homogenous enter the value. If diameters vary enter the highest and lowest value.

⚠ CRITICAL: Measure accurately the diameters of vessels because these values are determinant for the further automatic steps during reconstruction.

Note: To rapidly complete diameter you can adjust the thinnest diameter using ctrl+ middle mouse wheel and the largest diameter using ctrl + alt + middle mouse wheel.

13. Seeding: using automatic detection, seeds can be deposited on the networks for use in subsequent steps. Adjust the threshold to modulate the amount of seeding (3/6).

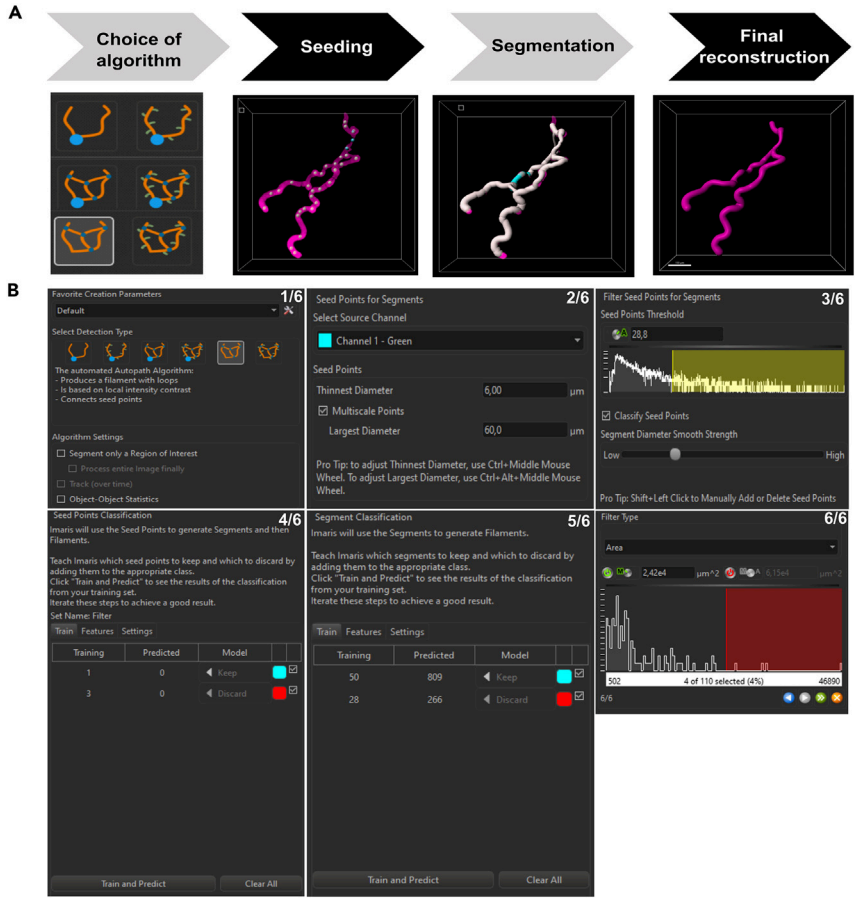


Figure 10. IMARIS module: Filament tracer

(A) Summary of steps for composing Filament Tracer mode.

(B) Detailed reconstruction procedure using the filament tracer tool.

Note: Shift + left wheel allows you to manually add or remove seeds.

14. A machine learning tool allows you to accurately define the seeding by teaching it to recognize well-placed or poorly-placed points (4/6).
15. Segmentation: this step enables the formation of filaments by connected seeds. For the final segmentation, machine learning allows you to determine the correct or incorrect connections for an accurate reconstruction (5/6).
16. Validation (6/6).

Optional: (6/6): Before validating the reconstruction, you can apply a wide range of filter such as diameter, area, length to remove outsider or aberrant reconstruction.

Note: We recommend version of Imaris (10.01 or above) since older versions do not propose a *Filament Tracer* tool adapted for complex vascular networks.

Perivascular cell network reconstruction

Perivascular cells (PVCs) form layers around capillaries. We took the example of telocyte reconstruction, but other perivascular cells such as pericytes or astrocytes could be reconstructed using the same methods based on the use of *Surface*.

17. Click on the *Surface* icon.
18. Choose the right fluorescent channel.

    Optional: You can tick the "Classify structure" to utilize the machine learning tool in Imaris for classifying you further reconstructions. You can also tick "Object to Object statistic" if you want to extract parameters related to the distance between reconstructed surfaces or filaments.

19. Determine the threshold based on the *Absolute intensity* (steps 3/ 4) to maximize the automatic reconstruction of surface.
20. Determine the threshold based on the number of voxels to include or exclude reconstructed structures.

    Note: Do not hesitate to temporary increase fluorescence intensity to accurately adjust the threshold.

21. Validate the reconstruction.

    Note: To validate the quality of reconstruction pay attention on the percentage of overlay between surfaces and the fluorescent staining.

    Optional: If the surface mode generates an interconnected surface and you prefer to create an individual one, you can use the *Cut Surface* tool.

After *Surface* reconstruction, click on the *Pen icon*. Create your cutting axis by clicking on the *shift + left button*. Click then on *Cut surface*.

Check Video S3 to see the example of reconstruction you can get with the described pipeline.

Coverage of vessels by perivascular cells

PVC form layers around capillaries that can differentially cover vessels. Vessel coverage has already been shown to be involved in the regulation of angiogenesis, making it an interesting parameter to quantify.

Imaris software offers a plug-in, available with MATLAB to measure the *Surface-to- Surface contact area*, representing coverage due to their close contact. You must.

22. Create a Surface based on vessel staining using: the same steps described in the perivascular cell (PVC) network reconstruction section.

    Note: Currently, this extension only works by comparing 2 surfaces. Vessels reconstructed with Filaments will not be adapted for it.

23. Activate *Surface-Surface tool contact area*.
    a. Join MATLAB extension: in the *Gear* icon of one of the two surfaces, you want to compare.
    b. Select *Surface-Surface contact area*.

    Note: You need to connect Matlab with Imaris in advance. After the installation, Matlab could take several minutes to open.

    c. Select the first surface you want to compare.
    d. Select the second surface you want to compare.

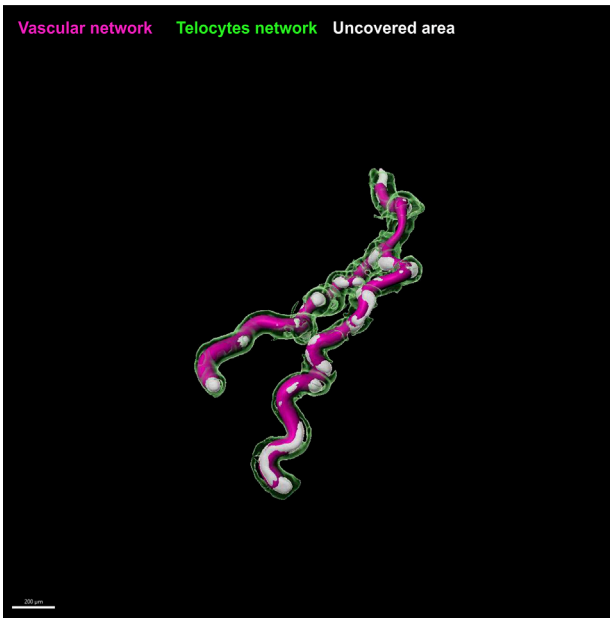


Figure 11. Final reconstruction

Magenta tubes correspond to the skin vasculature built with *Filament Tracer*. Green surfaces correspond to telocyte networks built with *Surface*. *White regions correspond to the uncovered area of vessels by TC built with Surface-Surface contact area.*

24. Statistical extraction: join the new surface created corresponding to the regions of contact. In the statistic icon, extract related parameters.

Note: We usually compare the total *Surface* volume of vessel to the *Surface-to -Surface contact area volume* to deduce the percentage of coverage of the vessel. You can consult Figure 11 to see an example of a final reconstruction containing contact area.

Extraction of morphometric parameters

All reconstruction methods allow the extraction of morphometric parameters. However, they do not provide the access to the same quantity and type of values. Refer to Figure 12 to find out which data can be accessed with which reconstruction module.

While the *Surface module* (Table 3) is more restricted parameters such as length, area and volume, the *Filament Tracer* module (Table 4) offers additional parameters such as straightness, branching, diameter, and others.

Statistical analysis

Working with human samples and tumoral vascularization will highlight significant intra and inter individual heterogeneity, emphasizing the need for numerous samples to represent the whole population accurately. Figure 13 represents our statistical methods of quantification. Briefly, at least 10 patients per group are included in the study to account for inter-patient heterogeneity. Each resection is sectioned into 3 samples to independently stain and clear them, thereby limiting any technical bias. Each portion is then image at 3 different locations. On average, 75% of the total resection is imaged to widely reconstruct and quantify networks.

LIMITATIONS

Skin-iDISCO$^+$ is an adapted protocol of the original iDISCO$^+$, designed to enable its application on pigmented tissue for large vascular staining's studies. However, some limitations persist. The

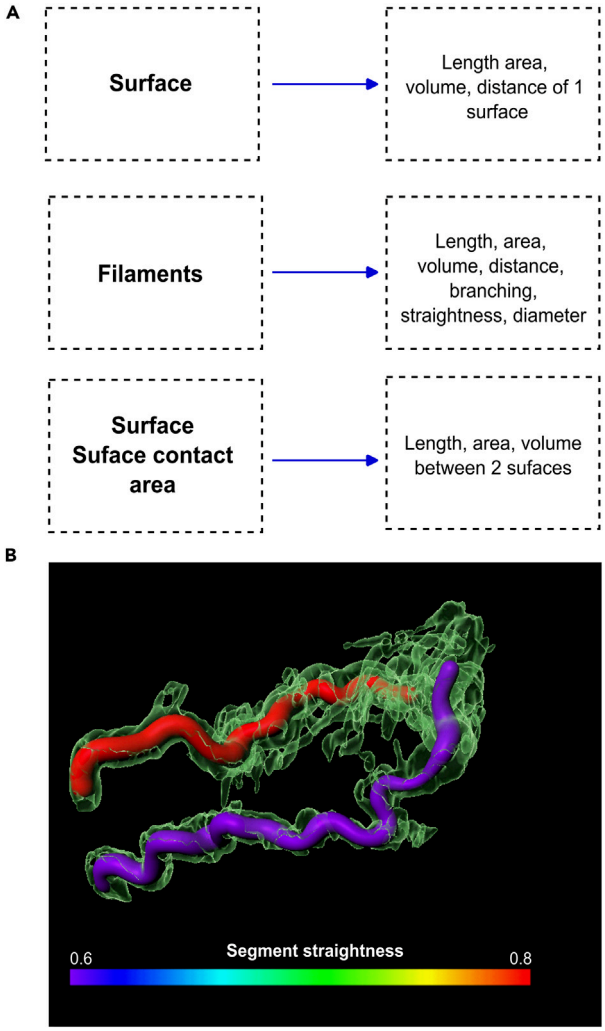


Figure 12. Data extraction

(A) Modules used in reconstruction and their associated extracted data.

(B) Color-coding picture. Surfaces were colored according to the value of their straightness.

primary drawback is the incompatibility of solvents with several antibodies and dyes, which can severely increase optimization time. In addition, the protocol involves the use of toxic chemicals that require careful handling and complicate the procedures. Lastly, Skin-iDISCO$^+$ remains a time-consuming protocol that needs to be performed over multiple weeks.

TROUBLESHOOTING

Problem 1

My sample is cloudy after Skin-iDISCO$^+$ protocol.

Potential solution

After the Skin-iDISCO$^+$ protocol, samples should be totally transparent, as presented in Figure 5. Lack of transparency is thus the consequence of insufficient step such as dehydration. So, we recommend extending methanol incubation time (steps 6 and 12). Start to double the incubation time and increase if needed.

Table 3. Morphometric data extracted from perivascular networks, reconstructed with the *Surface module*

Nature of parameter	Min	Max	Mean	Summary (total)	Unit
Surface Area of PVC (sum)	818532	818532	818532	818532	(μm^2)
Surface Volume of PVC	9527690	9527690	9527690	9527690	(μm^3)
Surface Area of contact	21682	1351210	648524	1073920	(μm^3)

Problem 2

My sample is amber-colored after Skin-iDISCO$^+$ protocol.

Potential solutions

Our optimized protocol should provide totally transparent samples as shown in Figure 14A. An amber color could be explained by several parameters that need to be improved like.

- Over fixation (step 2): don't exceed 24 h of fixation.
- Oxidation (steps 7, 13 and 14): at delipidation stages, make sure tubes are completely filled. In the same way, tubes of DBE must be filled.

Problem 3

My sample is harder and smaller at the end of the protocol.

Potential solutions

The Skin-iDISCO$^+$ protocol is an aggressive protocol notably composed of dehydration and delipidation steps that could explain the collapse and shrinking of tissue. We showed in Figure 6, that deformations remain minimal and that the structural and molecular architecture of the tissue are preserved. However, each tissue may respond differently, so we recommend that you carry out tissue response studies with the Skin-iDISCO$^+$ protocol, notably if you want to perform quantitative imaging.

Problem 4

The fluorescence is decreasing in depth (steps 9 and 11).

Potential solution

The main goal of 3D staining is to get an intense staining in depth without a decrease in light. This problem could be explained by two phenomena: poorly optimized immunolabeling conditions or a laser that does not penetrate deep into the tissue.

To optimize antibody conditions, we recommend checking following issues.

- The efficiency of permeabilization (step 9): it could be increased to 72 h at 37°C. Be sure that the permeabilization solution is still efficient because some reduction in efficacy has been noticed after a month.

Table 4. Morphometric data extracted from the tumoral skin vasculature of infantile hemangioma, reconstructed with the *Filament Tracer module*

Nature of parameter	Min	Max	Mean	Summary (total)	Unit
Filament area	149668	1978388	173753	347506	(μm^2)
Filament Length	987	1410	1198	2396	(μm)
Filament volume	1818650	2260100	2039380	4078750	(μm^3)
Straightness	0,69	0,76	0,73	1,45	No
Branching	0	0	0	0	No
Mean diameter	44,70	48,46	43,85	87,70	(μm)

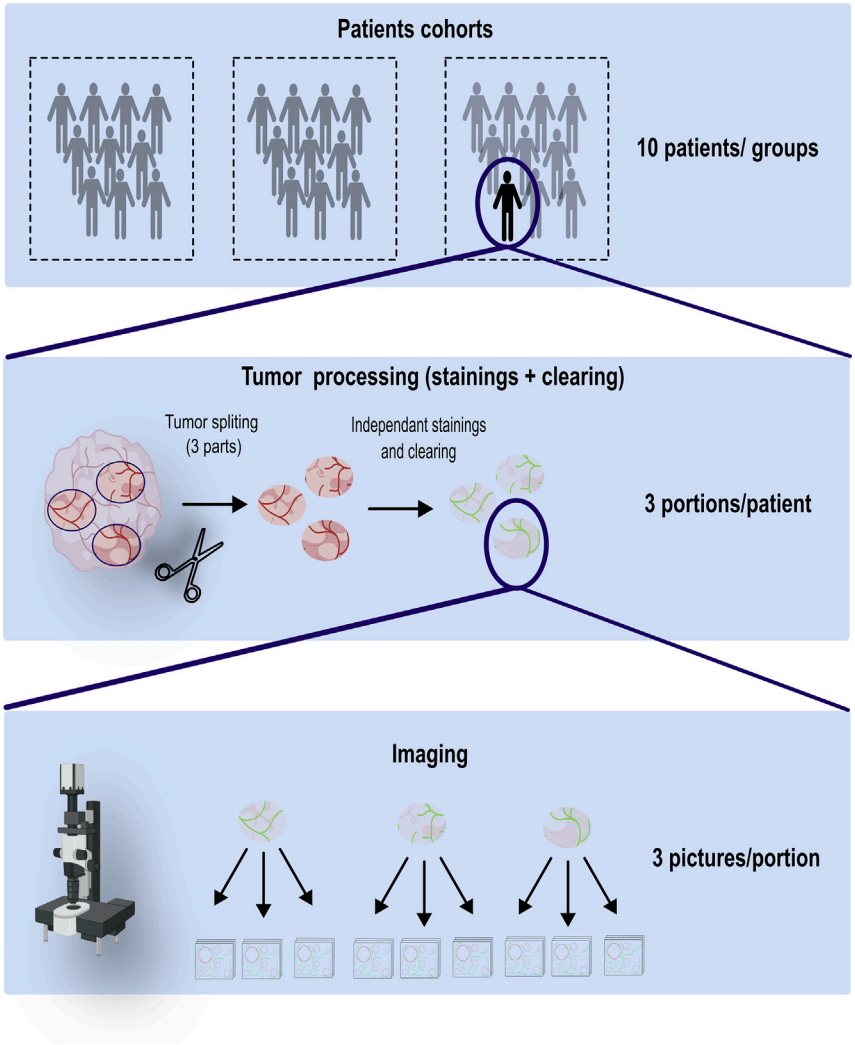


Figure 13. Statistical pipeline of quantification

For each group, at least 10 patients were included in the study. Each resection was divided into three different portions, each independently stained and cleared. Every portion was imaged, and at least three regions of interest were acquired. A minimum of 90 images per groups were captured, representing an average of 75% of the total tumor volume.

- Primary antibody concentrations (step 11): antibody concentrations could be managed on both sides. If you detect a decrease in signal in depth without a "ring-like" effect the concentration should be increased. In contrast, if this decrease is accompanied by a ring-like effect, the concentration should be decreased. You can consult Figure 14B to see an example of a picture with a ring-like staining.
- Antibody incubation duration: if you can detect a gradient of fluorescent signal with the depth you may increase the incubation time with antibody.
- Choice of secondary antibody (step 11): secondary antibodies are easier to optimize than primary ones because their concentrations are not as critical to the success of the experiment. In opposition, the choice of fluorophore is important since DBE can quench fluorescence. We recommend using Alexa fluorophores which are highly stable.

To bypass the limitations of laser diffusion in depth we recommend thinking about the following choices.

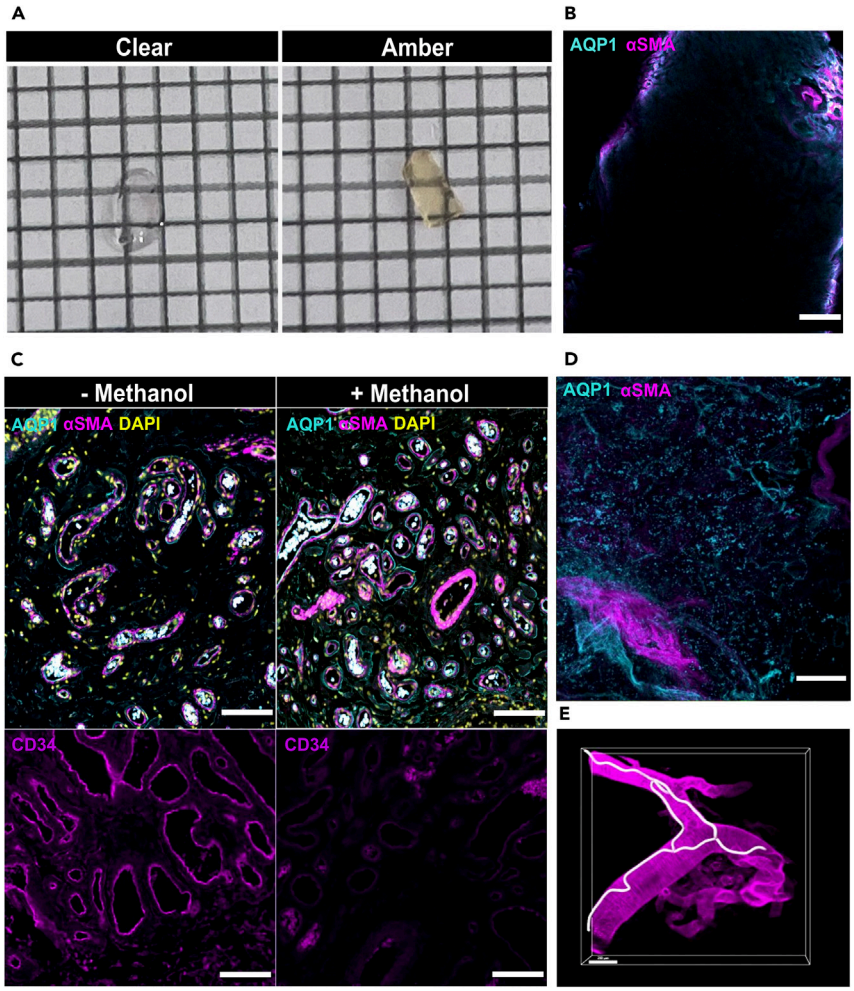


Figure 14. Troubleshooting

(A) Example of an amber-colored sample (right panel) in comparison with a cleared one (left panel).

(B) Poorly optimized immunostaining with a "ring-like" effect.

(C) Testing the compatibility of antibodies with methanol. Before staining samples were incubated (+methanol) or not (-methanol) with methanol. The top panel represents compatible antibodies (Green: AQP1 (Merck Millipore AB2219) and anti-rabbit Alexa-488 (Invitrogen A11008). Red: α SMA (Abcam Ab7817) and anti-mouse Alexa 568 (Invitrogen A11011)). The bottom panel represents incompatible ones (Red: CD34 (Invitrogen MA1-10202) and anti-mouse Alexa 568 (Invitrogen A11011).

(D) Noisy picture with strong background noise because of erythrocytes.

(E) Example of a wrong vascular reconstruction on a thick vessel.

- Choice of secondary antibodies: choose the fluorophores that can be excited at high wavelengths because some lasers have better penetrance properties. We advise you to use fluorophores that can be excited at least at 488 nm.
- Choice of the laser settings: we often notice a strong fluorescence at the surface layers of the tissue that gradually decreases with depth. In the laser settings of many microscopy devices, you could choose to progressively increase the laser power with depth.
- Choice of microscopy: some light-sheet fluorescent microscopes offer a double sheet of light, illuminating both sides of the sample. This process halves the thickness between the two sheets.

Problem 5

I cannot detect any fluorescence (step 11).

Potential solution

The iDISCO protocol uses solvents such as methanol and DCM that could be incompatible with many primary antibodies. Our recommendations are as follow.

- Check the lists of antibodies used in iDISCO. You can refer to our materials and equipment section.

iDISCO website provide a list of tested antibodies mainly in mouse tissue (https://idisco.info/validated-antibodies/).

- Before buying an antibody check in the data sheet whether it has been tested with methanol. Some suppliers indicate whether the product is compatible or not.
- Test their compatibility in conventional immunohistochemistry: to test quickly (2 days) the compatibility of primary antibodies with methanol, we recommend performing a conventional immunohistochemistry. However, prior to rehydration, incubate your slides for 3 h with pure methanol. Refer to Figure 14C to see examples of compatible and incompatible antibodies with our protocol.

Problem 6

I detect fluorescence with a strong background.

Potential solution

The phenomenon of noise (Figure 14D) could be explained by two issues: problems during sample processing or poorly optimized antibody conditions. A weak signal and poor processing would be in favor of autofluorescence responsible of the background noise.

Concerning the troubles of sample processing, our recommendations are as follow.

- Rinse thoroughly the sample before fixation: poorly washed tissue could retain red blood cells which could decrease transparency and form fluorescence dots in the whole picture.
- Avoid fixation longer than 24 h: over fixation could decrease sample antigenicity, which would be in favor of autofluorescence.[10]

To reduce the background noise, you could also manage the immunostaining steps.

- Saturation solution: make sure that the gelatin is well dissolved in PBST. The solubilization of gelatin could be time-consuming. Sample saturation could be also increase to 24 h.
- Optimized primary antibodies concentrations: by adjusting the primary antibody concentrations and the incubation time, you could increase specific signal. Indeed, a poor signal will force you to increase laser power or gain which will in parallel raise background fluorescence.

Problem 7

For large vessels, the filament reconstruction is not accurate. Rather than forming one single large filament, Imaris builds filaments surrounding the vessel walls (Figure 14E).

Potential solution

Initially, the Filament Tracer tool of Imaris has been developed to quantify networks formed by neurons or the dendrites (filled filaments). Its performance has made it possible to extend its use to the fine capillary vasculature, with small lumen. However, it is less adapted for large vasculature with wide lumen.

To circumvent this problem, we recommend blurring your picture with a Gaussian filter to limit the lumen space. Do not hesitate to create a very fuzzy image, to be used only for reconstruction.

RESOURCE AVAILABILITY

Lead contact

Further information and requests for resources and reagents should be directed to and will be fulfilled by the lead contact: François Moisan, available at francois.moisan@u-bordeaux.fr.

Technical contact

Further technical information should be directed to and will be fulfilled by the technical contact: Léa Pechtimaldjian, available at lea.pechtimaldjian@u-bordeaux.fr or lea24.pechti@gmail.com.

Materials availability

This study did not generate new materials.

Data and code availability

This study did not generate code or data set.

ACKNOWLEDGMENTS

F.M. gratefully acknowledges support from Region Nouvelle-Aquitaine AAPR2022-2021-17153910 and Département Sciences Biologiques et Médicales. Collaborator/core facilities: Zeiss, BIC (Bordeaux Imaging Center, Université de Bordeaux). The authors wish to thank Jean-Luc Morel and Antoine Bernasqué for helpful discussions.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

L.P. established this protocol. L.P. performed the experiments. L.P. wrote the initial draft and prepared all figures in this protocol. L.P., F.M., M.C., and H.-R.R. revised subsequent drafts. F.M. acquired project funding and supervised the work. F.M., M.C., and H.-R.R. provided all resources for this study. J.T., S.M., S.D., M.C., and H.-R.R. revised and advised on this work. All authors granted final approval of the article.

DECLARATION OF INTERESTS

The authors declare no competing interests.

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental information can be found online at https://doi.org/10.1016/j.xpro.2024.103524.

REFERENCES

1. Renier, N., Wu, Z., Simon, D.J., Yang, J., Ariel, P., and Tessier-Lavigne, M. (2014). IDISCO: A simple, rapid method to immunolabel large tissue samples for volume imaging. Cell *159*, 896–910. https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.10.010.

2. Renier, N., Adams, E.L., Kirst, C., Wu, Z., Azevedo, R., Kohl, J., Autry, A.E., Kadiri, L., Umadevi Venkataraju, K., Zhou, Y., et al. (2016). Mapping of Brain Activity by Automated Volume Analysis of Immediate Early Genes. Cell *165*, 1789–1802. https://doi.org/10.1016/J.CELL.2016.05.007.

3. Schmid, B., Schindelin, J., Cardona, A., Longair, M., and Heisenberg, M. (2010). A high-level 3D visualization API for Java and ImageJ. BMC Bioinf. *11*, 274. https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-274/FIGURES/5.

4. Linkert, M., Rueden, C.T., Allan, C., Burel, J.M., Moore, W., Patterson, A., Loranger, B., Moore, J., Neves, C., MacDonald, D., et al. (2010). Metadata matters: access to image data in the real world. J. Cell Biol. *189*, 777–782. https://doi.org/10.1083/JCB.201004104.

5. Amla, Z., Parminder, S.K., Mathialagan, A., and Lugez, E. (2024). Review of the Free Research Software for Computer-Assisted Interventions. J Digit Imaging *37*, 386–401. https://doi.org/10.1007/s10278-023-00912-y.

6. Renier, N., Wu, Z., Simon, D.J., Yang, J., Ariel, P., and Tessier-Lavigne, M. (2014). iDISCO: A Simple, Rapid Method to Immunolabel Large Tissue Samples for Volume Imaging. Cell *159*, 896–910. https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.10.010.

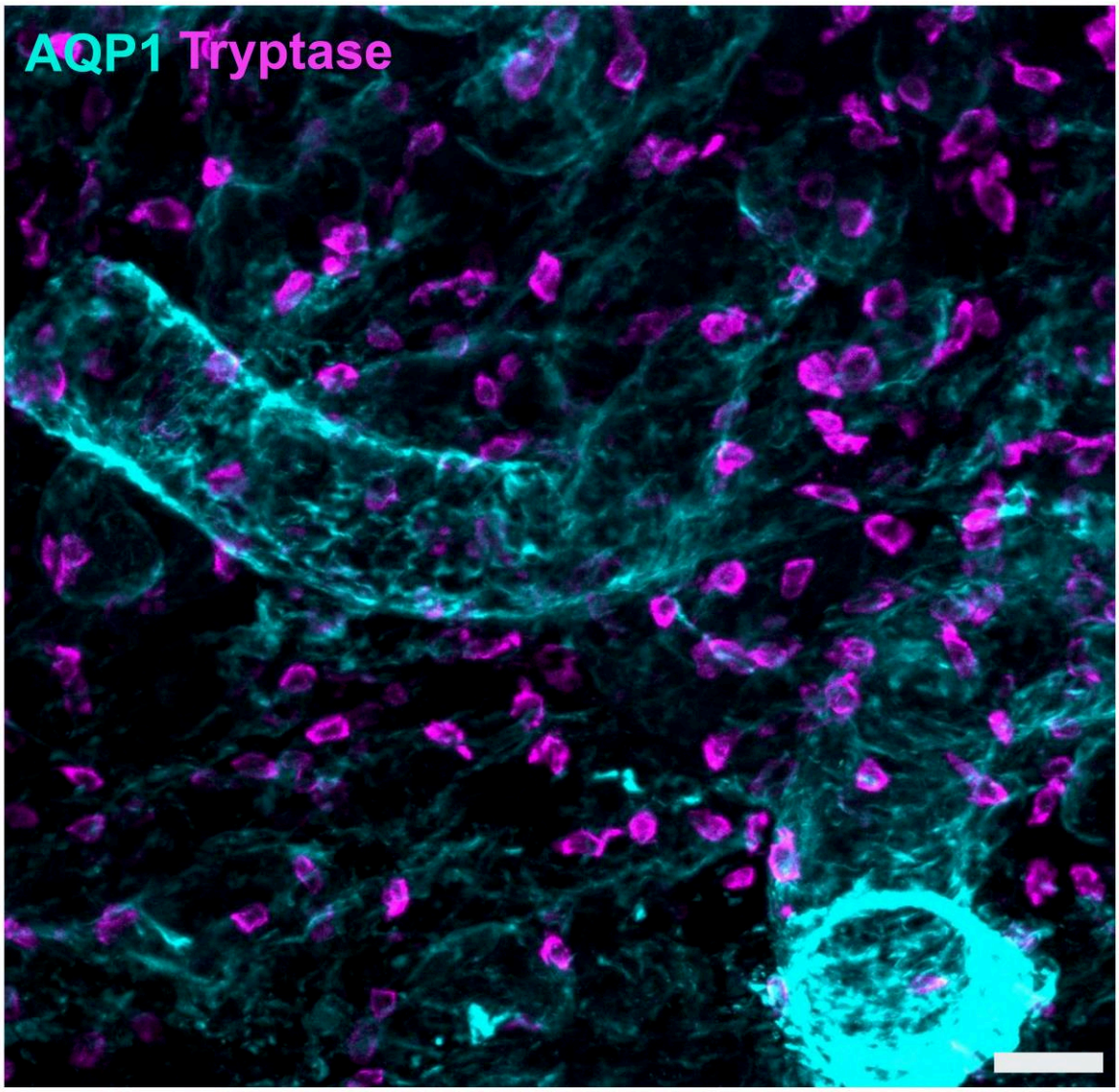
7. Schubert, R., Bae, T., Simic, B., Smith, S.N., Park, S.H., Nagy-Davidescu, G., Gradinaru, V., Plückthun, A., and Hur, J.K. (2023). CRISPR-clear imaging of melanin-rich B16-derived solid tumors. Commun. Biol. *6*, 370. https://doi.org/10.1038/S42003-023-04614-7.

8. Tan, Y., Chiam, C.P.L., Zhang, Y., Tey, H.L., and Ng, L.G. (2020). Research Techniques Made Simple: Optical Clearing and Three-Dimensional Volumetric Imaging of Skin Biopsies. J. Invest. Dermatol. *140*, 1305–1314.e1. https://doi.org/10.1016/J.JID.2020.04.014.

9. Yeh, A.T., Choi, B., Nelson, J.S., and Tromberg, B.J. (2003). Reversible dissociation of collagen in tissues. J. Invest. Dermatol. *121*, 1332–1335. https://doi.org/10.1046/J.1523-1747.2003.12634.X.

10. Alrafiah, A., and Alshali, R. (2019). The effect of prolonged formalin fixation on the staining characteristics of archival human brain tissue. Folia Morphol. *78*, 230–236. https://doi.org/10.5603/FM.a2018.0099.

Supplementary data S1: [**Immunostaining of a dewax IH sample showing telocytes (AQP1, cyan) and mast cells (tryptase, magenta).** Confocal (x10). Scale bar= 20µm].



Supplementary Table 1: [**Incompatible antibodies with Skin-iDISCO^{+}**]

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
Uncompatible antibodies		
Rabbit anti- αSMA	Abcam	Ab5694
Goat anti- αSMA	Abcam	Ab21027
Goat anti-αSMA	Biotechne	NB-300-978
Mouse anti-CD31	In vitrogen	14-0311-82
Rabbit anti-CD31	Abcam	Ab182981
Mouse anti-CD34	Invitrogen	MA1-10202
Rabbit anti-CD34	Proteintech	14486-1-AP
Mouse anti-CD90	Proteintech	66766-1-Ig
Mouse anti-GLUT1	Merck	MABS132
Rabbit anti-GLUT1	Thermo	Pa1-21041
Mouse anti-ITGB1	In vitrogen	MA5-17103
Mouse anti-Ki67	Leica	NCL-L-Ki67-MM1
REA Ki67 Vio 667	Miltenyi	130-120-421
Rabbit anti-Ki67	Proteintech	27309-1-AP
Goat anti-PDGFRα	Biotechne	AF-307

Table S1: Uncompatible antibodies

PARTIE 2 – Rôle critique des télocytes cutanés au cours de la régression de la vascularisation tumorale de l'hémangiome infantile

1. Les télocytes cutanés ont un rôle anti-angiogénique normalisant sur la vascularisation tumorale de l'hémangiome infantile

L'HI est caractérisé par une évolution biphasique, avec une phase proliférative marquée par une néo angiogenèse intense, suivie d'une phase de régression spontanée, au cours de laquelle les vaisseaux se raréfient progressivement. Si la dynamique vasculaire de l'HI est bien décrite sur le plan clinique, les mécanismes cellulaires et moléculaires qui sous-tendent la régression demeurent encore mal compris. Des travaux récents de l'équipe ont mis en évidence un rôle du propranolol, traitement de référence de l'HI, sur les TC, suggérant que ces cellules stromales pourraient contribuer activement à la phase de régression tumorale.

Afin de mieux comprendre les mécanismes associés à cette régression, nous avons combiné imagerie 3D de résections tumorales et approches fonctionnelles à partir de cellules dérivées de patients. L'application du protocole Skin-iDISCO+ sur des résections tumorales d'HI à différents stades évolutifs a permis une visualisation 3D inédite et précise de la vascularisation et de son remodelage. Parallèlement, nous avons adapté un modèle d'angiogenèse de bourgeonnement, intégrant pour la première fois des TC. Ce modèle a permis d'évaluer le potentiel angiogénique des TC. Ces observations ont été consolidées par des analyses fonctionnelles portant sur la prolifération, la survie et la migration des EC, ainsi que par un screening semi-dirigé du sécrétome. Enfin, des approches de validation génétique (perte de fonction) et protéiques (gain de fonction par recombinants) ont permis de confirmer l'implication directe d'une cible clé, la pentraxine-3 dans le contrôle du phénotype angiogénique des TC.

Ces travaux ont fait l'objet d'une publication soumise et en révision dans le journal *Proceedings ot the National Academy of Sciences* (PNAS).

Article 2: Telocytes-derived pentraxin-3 enables vascular pruning as a key driver in infantile hemangioma regression.

Léa Pechtimaldjian, Marie-Laure Jullié, Yamina Idrissi, Maya Loot, Muriel Cario, Sorilla Prey, Alain Taieb, Christine Leauté-Labrèze, Thomas Mathivet, François Moisan.

Article 2 : en révision, PNAS.

PNAS

Main Manuscript for

Telocytes-derived pentraxin 3 enables vascular pruning as a key driver in infantile hemangioma regression

Léa Pechtimaldjian[1], Marie-Laure Jullié[2], Yamina Idrissi[1], Maya Loot[3], Muriel Cario[1,5,6], Sorilla Prey[1,4,5], Alain Taieb[1], Christine Leauté-Labrèze[1,4, 5], Thomas Mathivet[1], François Moisan[1*]

1: Univ. Bordeaux, Inserm, Bordeaux Institute of Oncology (BRIC), UMR 1312, F-33076 Bordeaux, France

2: Service de Pathologie, CHU de Bordeaux, F-33000 Bordeaux, France

3: Service de Chirurgie Pédiatrique, CHU de Bordeaux, F-33000 Bordeaux, France

4: Service de dermatologie pédiatrique et adulte, CHU de Bordeaux, F-33000 Bordeaux, France

5: Centre de Référence MAGEC « Sud » des Maladies Rares de la Peau, F-33000 Bordeaux, France

6 : Aquiderm, Bordeaux, F-33000 Bordeaux, France

*** Corresponding author:** François Moisan

Postal address: INSERM U1312, 146 Rue Léo Saignat, Bordeaux, F-33000 France

Phone number: +33557571374

Email: francois.moisan@u-bordeaux.fr

Author Contributions: L.P. designed and performed the experiments, analyzed the data, wrote the manuscript and prepared all figures; Y.I performed some experiments. T.M., M.C.A. and A.T. contributed to analysis and provided constructive comments; S.P., C.L.L and M.L. helped for clinical samples, contributed to analysis and provided constructive comments; M.L.J provided constructive comments, helped for clinical samples and histology image analysis; F.M. acquired project funding, designed the experiments, analyzed the data, wrote the manuscript and supervised the work.; L.P., M.L.J, M.C., S.P., C.L.L., A.T., and T.M. revised subsequent drafts. All authors approved the final version of the article.

Competing Interest Statement: None of the authors have any other financial interests related to this work.

Classification: Cell Biology

Keywords: Hemangioma; telocyte; angiogenesis; FGFR signaling, tumor vasculature

This PDF file includes:

Main Text
Figures 1 to 7
SI Figures S1 to S10
SI Tables S1 to S3

Abstract

The natural course of infantile hemangioma (IH), a benign vascular infantile tumor, is marked by the initial rapid proliferation of dystrophic capillaries, followed by an involution phase, which is either spontaneous or induced by the first line treatment propranolol. Although endothelial cells have been at the center of most studies, the role of stromal cells in this vascular remodeling has remained unclear. Telocytes (TC), which are stromal cells that may be targeted by propranolol, are involved in tissue organization and angiogenesis, suggesting their role in vascular remodeling during the involution of IH. To assess changes in vascular architecture of IH and the role of TC, we used Skin-iDISCO+ 3D sample imaging and in vitro models with patient-derived TC. Perivascular TC exhibited increased dendricity during involution, indicating their activation. TC secretome profiling revealed a complex inhibitory program, with pentraxin-3 (PTX3) emerging as a central effector. 3D multicellular disease models demonstrated a paracrine effect blocking endothelial FGFR signaling via FGF2-pentraxin 3 interaction, thereby strongly regulating endothelial proliferation, sprouting, and activation. In vitro mechanistic study and collagen IV staining analysis revealed that vascular regression is at least partially due to vascular pruning. These findings highlight the pivotal role of TC in orchestrating vascular remodeling during IH regression, and it opens new perspectives for inducing vascular normalization in pathological angiogenesis, including cancer.

Significance Statement

Inhibiting tumor vessel formation is a major challenge for anti-cancer therapy. Here we show that perivascular cell named telocyte acquires the capacity to inhibit angiogenesis during the natural regression phase of infantile hemangioma, associated with tumor resolution. We show how their morphology is switched between growth and regression phases in patient samples and the associated molecular mechanism in vitro. Proangiogenic FGF2 is trapped by TC-secreted pentraxin 3, inhibiting endothelial FGFR1 activation. Results show a specific activated vascular regression mechanism called pruning. This process could be activated to treat cancer in a more efficient way than antiangiogenic drugs.

Main Text

Introduction

Infantile hemangioma (IH) is the most prevalent infantile tumor, affecting approximately 5% of newborns. Although benign, up to 10% of cases may result in complications that require medical intervention. IH typically follows a biphasic unique cycle (1). The proliferative phase occurring within the first weeks of life is marked by the rapid expansion of GLUT1$^+$ endothelial cells (EC), forming a dense micro-vessel mass(2, 3). The initial hypoxia stimulus, further fueled by defective perfusion of the growing lesion, drives the production of pro-angiogenic mediators such as VEGF, FGF-2, IGF-2 as well as noradrenaline(4–6). These factors collectively promote EC proliferation, survival and migration. For unknown reasons, proliferation subsides by the end of the first year, and the tumor enters a slow and gradual involution phase that lasts several years. It is partially replaced by fibro-adipose tissue, with persistent GLUT1$^+$ endothelium(7). Propranolol, the first-line treatment of IH, accelerates involution within 6-12 months, with good safety profile(8, 9). While the cellular and molecular cues driving the change in involution remain unknown, evidence points to a shift toward an anti-angiogenic microenvironment. Interestingly, vessel morphology evolves during this cycle and the slight increase in apoptosis as well as the onset of adipogenesis are concomitant, suggesting that the remodeling activity is driven. Indeed, the number of apoptotic cells during involution remains limited (mean of 15.6 apoptotic cells / 1000 nuclei) and spread across the involution period (between ages 1 to 4 years)(10), suggesting a combined mechanism such as vascular remodeling.

IH telocytes (TC) have been identified as potential contributors to IH regression and propranolol was shown to target aquaporin-1 (AQP1)$^+$ TC to limit EC angiogenic activity in a tubulogenesis assay(11). TC are mesenchymal stromal cells that are different from fibroblasts(12). They have been shown to regulate tissue homeostasis in the context of stem cell niche, angiogenesis and inflammation(13–16). They have a small cell body and very long moniliform processes called telopodes(17, 18). Originally described in organs such as the heart, lung, intestine and skin, they are increasingly recognized for their role in extracellular vesicle communication with EC, immune cells, fibroblasts and tumor cells (19–22). In IH, their role remains to be fully understood. Given their strategic perivascular localization and signaling capacities, we hypothesized that TC may contribute to the remodeling process during involution, potentially guiding vessel normalization and tissue organization.

We combined a 3D tissue study and *in vitro* models, based on IH surgical samples. In the 3D tissue study, we found involution-associated modifications in the vascular and TC networks. The *in vitro*

study evaluated the potential of TC isolated from involuting IH to act upon endothelial cells. We evaluated TC morphological changes with regard to involution and vascular remodeling. We then investigated the paracrine angiogenic effect of TC linked to these changes. Overall, our results reveal a signaling mechanism by which TC-derived pentraxin-3 (PTX3) trap FGF-2, promote growth arrest and vascular reorganization by mechanisms commonly described in vascular pruning.

Results

IH regression is associated with vascular remodeling

To characterize the vascular architecture throughout the IH cycle, we compared the morphology and organization of vessels in proliferating or involuting IH as well as in physiological skin. We used the Skin-iDISCO+ protocol, enabling the large-volume imaging of skin vasculature to accurately evaluate the whole vascular network architecture(23). We stained, cleared, imaged and reconstructed the vasculature of 13 cutaneous resections, including 3 physiological skin samples, 3 proliferative IH samples, and 7 involuting IH samples, as listed in Table S1. CD31 and αSMA staining, respectively markers of EC and pericytes in IH, revealed the 3D morphology of IH lesional vasculature, highlighting the tortuous architecture of vessels among typical IH lobules (Fig. 1A). Since the systematic coverage of αSMA-positive pericytes surrounding IH vessels provides a continuous and robust signal compared to membrane markers, we used it to facilitate 3D vessel reconstruction with the IMARIS software.

Volumetric imaging and quantitative analysis of a set of morphometric parameters normalized to physiological skin values showed that the vasculature of proliferative IH exhibited the hallmarks of tumor vasculature (Fig. 1B). The whole network was dense, disorganized and composed of long, tortuous (Fig. S1A) and heterogenous vessel diameters, in sharp contrast to the hierarchical structure of foreskin vessels used as controls (Fig. 1B, 1C, S1B). We also evidenced high intra-tumoral heterogeneity, with high standard deviations and extreme minimal and maximal values of vessels for most parameters, which decreased in the involution phase. Despite this vascular abundance, proliferative IH consistently exhibited a limited number of vessels with low branching levels (Fig. S1C), suggesting an abnormal organization rather than hyperbranching. The numerous lumina typically observed in conventional 2D histology reflected cross-sectional artifacts of folded capillaries (Fig. S1D). In the vasculature of involuting IH, these aberrant values were decreased and aligned with those of normal skin (Fig. 1B, 1C). Comparison of each parameter across the IH lifecycle revealed that the mean vessel length decreased from 80,000µm in the proliferating phase to 10,000µm during involution, ultimately approaching physiological values (Fig. 1D). We also

observed the homogenization of vessel diameters, as evidenced by the progressive reduction in their standard deviation (Fig. 1E). In the proliferating phase, the diameters were very heterogenous ranging from 4 to 45 µm (Fig. S1E, S1F). In contrast, their diameters were around 25 µm the involution phase, with the loss of very large and very small vessels. Additionally, the vessels were straighter (Fig. 1F). Collectively, these morphological changes contributed to the reduction of the tumor vascular burden with a vascular volume decreasing from 70% to 20% throughout involution (Fig. 1G). A contributing factor appeared to be vessel linearization, as demonstrated by a moderate inverse correlation between vascular volume and vessel linearity ($R = -0.65$; $R^2 = 0.20$; p-value ≤ 0.0001) (Fig. 1H).

Taken together, these results showed that IH regression involves the active coordinated remodeling of tumor vasculature. The shift from a chaotic and disorganized network toward a more structured physiological vascular architecture, aka as vessel normalization, emerged as a key feature of the involution process.

Remodeling of IH vasculature is associated with morphological switch of perivascular TC

In a previous work, we suggested that perivascular TC play a critical role in the dynamics of IH, including its lifecycle and treatment response (11). To identify the association between their phenotype and IH growth, we assessed their morphology and perivascular organization across the two phases of IH, as well as in physiological tissue.

3D imaging of physiological skin and proliferative IH samples showed that TC exhibit a flattened morphology, forming a continuous sheath that envelop the vessels with a high coverage of around 60% (Fig. 2A, 2B). In contrast, during involution, TC adopt a distinct dendritic morphology (Fig. 2A), in a meshwork characterized by a markedly reduced vessel coverage of about 20% (Fig. B). Importantly, quantitative analysis showed no significant difference in the number of TC between the proliferative and involution phases (Fig. 2C). This suggests that their involvement in IH regression is not related to changes in cell abundance through proliferation or apoptosis, but rather via phenotypic modulation or activation.

To further explore whether TC changes play a role in IH vasculature, we investigated the relationship between TC morphology and vascular remodeling previously described (Fig. 1). Correlation analyses demonstrated a significant association between TC coverage and key vascular remodeling features, such as vessel straightening and vascular volume (Fig. 2D, 2E). Specifically, reduced TC coverage, corresponding to a more dendritic TC phenotype, was correlated with straighter vessels and decreased vascular volume (Fig. S2). These findings suggest

a coordinated dynamic between TC morphology and vascular network remodeling throughout the IH lifecycle.

We then wondered whether the morphology observed in the tissue could also be evidenced in cell cultures of TC extracted from IH or foreskin. Using an *in vitro* 3D morphologic assay, we found that TC embedded in fibrin hydrogels maintained their specific morphology. TC from physiological foreskin exhibited their spindle-shape morphology (sTC) with limited telopode arborization (Fig. 2F), as reflected by their large cell area (Fig. 2G) and lower dendritic complexity with fewer branches and nodes (Fig. 2H, 2I). Conversely, TC isolated from involuting IH were thinner, displaying an elaborate telopode network (Fig. 2F) characterized by a smaller cell area and larger branch and node counts (dTC), consistent with their dendritic phenotype *in situ* (Fig 2G, 2H, 2I).

Taken together, these results demonstrated the tight interplay between TC dynamics and IH vascular remodeling. The morphological shift toward a dendritic phenotype during involution suggests that they might acquire angiogenic properties that modulate the vascular architecture. *In vitro* models confirmed that dTC retain these features in culture, paving the way for further functional and mechanistic studies.

TC from involuting IH exhibit a paracrine antiangiogenic phenotype during involution

To assess whether the dTC from the involuting phase of IH were drivers in the reorganization of vessels, we investigated their angiogenic potential and their ability to modulate EC behavior *in vitro*, in comparison with sTC from foreskin or IH fibroblasts.

Using a well-established 3D fibrin-based sprouting assay, we developed a co-culture model embedding HUVEC and primary TC (dTC or sTC) within the gel. Primary IH fibroblasts, which are known to secrete a broad range of pro-angiogenic factors including VEGF-A and FGF-2 (24), were seeded on top of the gel to act through paracrine signaling. As expected, fibroblasts stimulated EC sprouting relative to EC monoculture controls (Fig. 3A). They significantly increased the mean length of sprouts by 200% (Fig. 3B), their cumulated length by 165% (Fig. 3C) and their number by 200% (Fig. S3A). In contrast, co-culture with sTC did not significantly alter EC sprouting compared to EC monoculture controls either in terms of sprout number and length, suggesting that they have a neutral effect on angiogenesis in this *in vitro* setting. Furthermore, adding sTC to fibroblast-EC conditions did not modify fibroblast-induced angiogenesis, indicating that they neither enhanced nor suppressed fibroblast pro-angiogenic activity.

Remarkably, dTC inhibited EC sprouting, leading to a 60% reduction in both mean and cumulated sprout length compared to EC monoculture controls (Fig. 3B, 3C), and also significantly decreased the number of sprouts formed (Fig. S3A). Importantly, when dTC were added with fibroblasts, they counteracted the fibroblast pro-angiogenic effects. EC sprouting under these tri-culture conditions returned to levels comparable to those seen with EC monoculture controls. This suggested that dTC exerted an anti-angiogenic effect that is able to neutralize complex pro-angiogenic signals carried by fibroblasts.

We then investigated whether the anti-angiogenic effect of dTC was mediated through paracrine or juxtacrine mechanisms. To do so, TC were either embedded within the fibrin gel, allowing both direct contact and secretions, or seeded on top of the gel, thereby limiting communication with secreting factors. In both configurations, sTC from normal skin had no significant effect on EC sprouting (Fig. 3D), as shown by similar cumulative and mean sprout lengths (Fig. 3E, 3F) and the number of sprouts (Fig. S3B). In contrast, dTC seeded on top of the gel still reduced sprouting by 50% compared to a 60 to 70% reduction when embedded in the gel. These results suggest that approximately 70% of their anti-angiogenic effect is mediated by paracrine signaling.

Supporting this finding, frequent membrane budding events consistent with ectosome release were observed on dTC surfaces in 3D models (Fig. S3C). Transmission electron microscopy on involuting IH resection revealed exosome production and exocytosis processes (Fig. S3D), showing that active secretion is a contributor to their anti-angiogenic activity.

dTC alter EC proliferation and stimulate migration, with low impact on their viability

To understand the influence of TC on EC, we investigated their impact on key cellular mechanisms involved in angiogenesis, including proliferation, survival and migration of EC.

Angiogenesis critically depends on EC expansion, particularly the proliferation of stalk cells driving directional vessel growth. We therefore hypothesized that dTC might exert their anti-angiogenic effects by inhibiting EC proliferation. To test this idea, we incorporated 5-ethynyl-2′-deoxyuridine (EdU) into the previously described 3D sprouting co-culture assay, maintaining EC in culture with either sTC from normal skin or dTC from involuting IH, for 48 hours. Co-culture with dTC led to a strong reduction in EC proliferation, with EdU-positive nuclei dropping from 20% to 4%, representing a 5-fold decrease compared to the sTC condition (Fig. 4A, 4B). To confirm these results, we used the 2D colorimetric sulforhodamine B (SRB) assay which enables high-throughput assessment of EC growth kinetics. EC cultured in complete sTC-conditioned medium exhibited similar growth curves, whereas those cultured in dTC-conditioned medium displayed reduced

growth (Fig. 4C). This reduction in proliferation was reflected by a 2-fold decrease in the specific growth rate (k) (Fig. 4D). Consequently, the EC doubling time increased from 35 to 70 hours, highlighting a strong anti-proliferative and paracrine effect of dTC (Fig. S4A).

Given the importance of EC survival for vessel elongation and stabilization, and their sensitivity to survival-promoting cytokines, we next assessed whether dTC might impact EC viability. In the same sprouting assay model, EC were cultured for 48 hours with sTC or dTC. LIVE/DEAD staining. Calcein (viable cells) and ethidium homodimer-III (damaged and dead cells) revealed a significant but modest decrease in EC viability (< 8%) in the presence of dTC (Fig. 4E, 4F). Although significant, this slight reduction is unlikely to account for the strong inhibition of sprouting observed, suggesting that reduced viability is not the primary mechanism underlying the anti-angiogenic effect of dTC.

Lastly, given the central role of EC migration in angiogenesis and vascular remodeling, we assessed whether TC-derived factors could influence EC motility. We performed a scratch assay on EC cultured in complete medium, sTC- or dTC-conditioned medium, and tracked wound closure over 24 hours. Interestingly, both types of conditioned media accelerated EC migration compared to EC in complete medium. Notably, EC exposed to dTC-conditioned medium showed the fastest closure (Fig. 4G, S4B). While EC in monoculture closed 90% of the wound within 18 hours, those cultured with sTC-conditioned medium achieved a similar closure in 16 hours, and EC in dTC-conditioned medium completed it in just 10 hours (Fig. 4H). This corresponds to a doubling of migration speed from 12µm per hour under basal conditions to 25µm per hour in the presence of dTC-conditioned medium (Fig. S4C).

Altogether, these results suggest that dTC inhibits EC activity by a major negative impact on proliferation and a positive effect on migration. Meanwhile, a minor effect on viability is observed.

dTC are a major source of pentraxin-3

Given the pronounced anti-angiogenic phenotype observed with dTC, especially on EC proliferation, we sought to identify a trophic factor responsible for this effect. Using semi-directed proteome profiling, we analyzed the conditioned media of sTC from 4 different foreskin control samples and dTC from 8 different involuting IH samples. Among the 55 candidate proteins, 13 were detected in at least one sample (Fig. 5A, S5A). Among them, high levels of thrombospondin-1, TIMP-1, Serpin E5 and Serpin F1 were secreted in both sTC and dTC. Differential analysis confirmed the anti-angiogenic signature of dTC (Fig. S5B). Statistical analysis identified two proteins that were differentially expressed between sTC and dTC: pentraxin-3 (PTX3) and insulin-

like growth factor-binding protein 3 (IGFBP-3) (Fig. 5B). PTX3, a known FGF-2 trap, emerged as the most consistently and significantly over-secreted protein in patients (Fig. S5C)(25). Given that FGF-2 is a key mitogen for EC and is particularly enriched during the proliferative phase of IH (Fig. S5D), PTX3 appeared as a strong candidate implicated in the involution process. qRT-PCR confirmed a 2-fold increase in PTX3 mRNA expression in dTC (Fig. 5C), and ELISA assays validated a 4-fold increase in protein secretion, rising from 0.3ng/mL in sTC to 1.4ng/mL in dTC supernatant (Fig. 5D). Furthermore, a monoculture of TC from proliferative IH secreted an average of 0.5ng/mL of PTX3, while IH-derived EC secreted around 0.35ng/mL, so dTC likely constitutes a source of PTX3 in involuting IH (Fig. S5E). Interestingly, an inverse correlation was detected between PTX3 concentrations in dTC-conditioned medium and the cumulative length of EC sprouts obtained in the same dTC-conditioned medium (Fig. 5E). The coefficient of determination (R-squared) indicated that approximately 50% of the reduction in sprout growth induced by dTC-conditioned medium was associated with the PTX3 concentration.

PTX3 is pivotal to antiangiogenic phenotype of dTC by blocking FGF2-FGFR1 axis in EC

To address the potential anti-angiogenic role of paracrine PTX3, we assessed EC sprouting in standard FGF-2 conditions (i.e. ECGM2 complete medium containing 10ng/mL of FGF2), which is relevant to the average concentration of IH samples. Here, we added increasing concentrations of recombinant PTX3 (rPTX3). Concentrations comparable to those secreted by dTC [1.0 to 5.0 ng/mL] were already sufficient to reduce sprouting, with a maximal effect observed at 10ng/mL. Concentrations typical of sTC [0.1 to 0.5ng/mL] were not effective (Fig. 6A). A double-log correlation curve further supported a dose-dependent relationship between rPTX3 concentrations [0.1 to 10ng/mL] and EC sprout length (Fig. 6B). Then, to functionally confirm the role of PTX3 in mediating the anti-angiogenic properties of dTC, we knocked-down PTX3 expression in dTC from 3 different patients with involuting IH using lentiviral transduction of a control shRNA (shCT) or specific shRNA targeting PTX3 (shPTX3) (Fig. S6A, S6B, S6C). shPTX3-dTC exhibited a reduced inhibitory effect on EC sprouting compared to shCT-dTC, as evidenced by a 50% increase in cumulated and mean sprout length (Fig. 6C, 6D, S6D). Moreover, the addition of 10ng/mL of rPTX3 restored the anti-angiogenic phenotype, confirming the specificity of the PTX3-dependent mechanism. These results underscore the pivotal role of PTX3 in the anti-angiogenic activity of IH TC.

Given the previously reported ability of PTX3 to act as an FGF-2 trap, we then hypothesized that PTX3 secreted by dTC could inhibit FGF-2 signaling via its main endothelial receptor in IH, FGFR1 (Fig. S6E, S6F). To test this idea, serum-starved EC were stimulated either with recombinant FGF-

2 (10ng/mL, as positive control), with conditioned medium from sTC, or from dTC silenced for PTX3. Western blot analysis of FGFR1 phosphorylation, an early event in FGF signaling, showed that sTC-conditioned medium had no inhibitory effect, as indicated by robust FGFR1 phosphorylation, similar to recombinant FGF2-stimulated EC (Fig. 6E, 6F). In contrast, dTC-conditioned medium nearly abolished FGFR1 phosphorylation with an 80% inhibition. This effect was largely dependent on PTX3, as PTX3 silencing in dTC significantly restored the phospho-FGFR1 level to 60% of control. Supporting these findings, immunofluorescence on FFPE sections of IH biopsies demonstrated the quasi absence of phospho-FGFR1 staining in CD34-positive EC from involuting IH compared to the proliferative phase (Fig. S6G).

We next explored the functional consequences of this inhibition on key endothelial behavior and downstream pathways dependent on FGF-2-FGFR1 axis. Consistent with FGF-2 being a major driver of EC proliferation, the blocking of the axis by PTX3 may drastically reduce endothelial growth. Indeed, PTX3 depletion in dTC restored EC proliferation to levels similar to those of controls, as reflected by an increased specific growth rate (k) (Fig. 6G) and decreased doubling time (Fig. S6H). At the molecular level, this inhibition correlated with reduced MAPK signaling, as shown by decreased ERK1/2 phosphorylation in EC exposed to shCT-dTC conditioned medium, a reduction that was reversed upon PTX3 depletion (Fig. 6H, I). PTX3 depletion also modestly improved EC survival (Fig. 6J), although no significant effect was observed on the activation of the Akt pathway (Fig. 6K, 6L). Likewise, EC migration dynamics were not significantly altered by PTX3 silencing (Fig. S6I).

Taken together, these findings demonstrated that dTC-derived PTX3 acts as a key anti-angiogenic effector by trapping FGF-2, thereby blocking the activation of FGFR1 and downstream MAPK signaling, ultimately leading to reduced endothelial proliferation and sprouting.

dTC-derived PTX3 participates in pruning of IH vasculature

Given the strong properties of FGF-2 to promote vascular development and shaping vessel architecture, we hypothesized that its inhibition by PTX3 could trigger active regression of the IH tumor vasculature. In the involuting phase of IH, vascular pruning emerged as a potent mechanism, as it is associated with low apoptosis, enhanced EC migration, reduced EC proliferation and a gradual decline in vascular density. We therefore investigated whether dTC-derived PTX3 contributes to the hallmark features of vascular pruning including EC inactivation, VE-cadherin junctional remodeling, sprout destabilization and the presence of pruned vessels in patient biopsies.

Endothelial inactivation involves reduced proliferation and a shift toward a less activated phenotype. To assess this, we measured ICAM1 expression, a marker of EC activation after 48 hours of culture in complete medium (control), sTC- or dTC-conditioned media. Flow cytometry showed that shCT-dTC medium significantly reduced 6-fold the number of ICAM1-positive cells, and decreased their relative fluorescence intensity (Fig. 7A, S7A). This effect was reversed upon PTX3 depletion, suggesting that dTC-derived PTX3 promotes EC inactivation. Moreover, in 3D imaging of patient samples, dysmorphic vessels presented high levels of ICAM1 staining while the normalized portion exhibited significantly lower intensity (Fig S2). Then, because pruning also requires EC migration and junctional remodeling, we analyzed VE-cadherin distribution. In control and sTC media, VE-cadherin displayed a continuous linear pattern covering 400µm^2 per cell (Fig. 7B, 7C). In contrast, EC exposed to shCT-dTC medium exhibited disrupted punctate VE-cadherin with a reduced staining that averaged 200µm^2 per cell (Fig. 7C). PTX3 depletion partially restored junctional organization with a mean surface per cell of 350µm^2. This indicates that dTC-derived PTX3 contributes to inter-endothelial junction destabilization, potentially enhancing EC motility.

We next investigated the effect of dTC-derived PTX3 on established endothelial sprouts using our 3D *in vitro* sprouting assay. EC were first cultured for 24 hours in complete medium to initiate sprouting. They were then exposed to conditioned media for 48 hours. Continuous sprout evolution was monitored and quantified over time (Fig. S7B). In control and sTC conditions, sprouts elongated progressively to reach 170µm on average (Fig. 7D, 7E). In contrast, shCT-dTC medium impaired sprout growth, as shown by elongation arrest at 24 hours, and signs of sprout constriction (Fig. S7C). After 48 hours, their mean length dropped respectively to 45µm with a fragmented network structure (Fig. 7D, 7E, S7D). PTX3 depletion partially rescued sprout integrity, increasing their mean length to 100µm. Sprout numbers remained stable across conditions (Fig. S7D). Altogether, these results implicate dTC-derived PTX3 in the regression of pre-formed sprouts and support its role in promoting vascular pruning.

Finally, to determine whether vessel pruning occurs in IH biopsies, we analyzed the presence of collagen IV empty sleeves, a hallmark of pruned vessels. We performed immunofluorescence on both proliferating and involuting IH resection by staining CD34 and collagen IV. In proliferative samples, vessels exhibited a dual CD34-positive layer corresponding to EC (inner) and TC (outer), separated by the basement membrane (collagen IV) (Fig. 7F). In contrast, involuting samples contained some tubular structures lacking the inner CD34 staining but retaining collagen IV and outer CD34-positive TC labeling. These observations are consistent with EC-depleted pruned vessels, features that were exclusively observed in involuting samples (Fig. 7F).

Discussion

In the present study we show that TC paracrine activity may drive the regression of IH. There are two main findings: i) TC vascular coverage change is associated with the progressive normalization of aberrant vasculature formed during the proliferative phase (Fig. 8); ii) the TC of involuting IH have specific anti-angiogenic properties that are powerful enough to orchestrate the gradual regression of IH observed in clinical practice and which function as a pruning mechanism.

In the proliferative phase, IH vasculature is typical of pathological angiogenesis, being dense and dysmorphic, i.e. indicative of an inefficient network (Fig. 1B, C). EC are hyperproliferative (Fig. S8C) and activated(26, 27), driven by elevated levels of pro-angiogenic factors. Nonetheless, VEGF levels remain inconsistently associated with IH phases across studies, some studies finding phase-associated levels, others detecting no statistical differences(28–31). Data suggests that the FGF pathway might be a pivotal actor of excessive vascular growth, as we and others found FGF-2 to be elevated in the proliferative phase (32–34) (Fig. S5D). During that phase, TC unwrap lesional vessels as a continuous sheet (Fig. 2A, 2F), without alteration of EC behaviors measured *in vitro*, similar to TC from healthy skin. This suggests an inactive phenotype for the parameters of interest here.

Strikingly, morphometric analyses in the involution phase revealed a clear transition toward a simplified, linear and organized vascular architecture (Fig. 1B, 1C), which are signs of a coordinated process of vascular normalization. Vascular normalization is organized in two steps(35): (i) endothelial stabilization, characterized by EC proliferation arrest and inactivation, ending the formation of dysmorphic vessels; and (ii) vascular remodeling involving selective regression of aberrant and low-perfused vessels to restore a more functional architecture of an already formed vascular network. We found that this transitional phase is accompanied by a 2-fold shift in FGF-2 levels (Fig. S5D). This observation is concordant with previous studies showing that FGFR inhibition contributes to vascular normalization by counteracting aberrant angiogenic signaling (36).

Moreover, our data show that TC undergo a marked morphological change between phases, adopting a dendritic phenotype and forming a complex perivascular meshwork (Fig. 2A, 2F). This phenotype is reminiscent of the activation of other perivascular cells, such as astrocytes in the blood-brain barrier. While they enhance dendritic morphology, they suppress angiogenesis and stabilize vessels, suggesting that dendritic TC (dTC) may fulfill similar roles, in this singular GLUT1/AQP1 context of barrier endotheliums(37, 38).

Recent findings suggest that TC in cardiac tissue secrete a range of molecules capable of stimulating angiogenesis(39–41). In involuting IH, we uncovered their strong anti-angiogenic

paracrine activity, effectively inhibiting endothelial sprouting in basal culture conditions (Fig. 3D) as well as in fibroblast-driven angiogenesis (Fig. 3A). Cytokine profiling revealed a multifaceted inhibitory secretome (e.g., IGFBP-3, TSP1, PTX3, serpin-F1, endothelin-1) (Fig. 5A, 5B, S5B). Among them, pentraxin-3 (PTX3) emerged as a key effector, being secreted by TC from involuting IH at levels 4-fold higher (p-value= 0.038) (Fig. 5C, 5D). PTX3 belongs to the long pentraxin subfamily and acts as a natural antagonist of FGF-2(42). Octameric PTX3 bind two FGF-2 molecules with high affinity(43), preventing their interaction with both FGFRs and heparan sulfate proteoglycans, an essential step for FGF-2 pro-angiogenic signaling(44, 45). This molecular trapping inhibits tumor growth(46) and leads to reduced neovascularization, as previously demonstrated in a Matrigel plug and aorta ring assay, chorioallantoic membrane, zebrafish models and multiple myeloma xenografts(44, 45). Astrocyte-derived PTX3 was also found to be a normalizing cytokine, promoting blood-brain/retina-barrier integrity in retinal disease models and cerebral ischemia(47–49). Our data show that dTC-derived PTX3 contributes to 50% of their anti-angiogenic effect primarily through suppression of FGF-2-mediated EC proliferation and activation, marked by increased ERK phosphorylation and the loss of ICAM-1 (Fig. 6, Fig.7A). These findings suggest that PTX3 secretion by dTC contributes to the stabilization phase of IH, a prerequisite for vessel normalization that seems to carry IH transition from the proliferative phase to the involution phase.

Active vascular regression can thus occur through two distinct mechanisms: (i) vascular involution, a rapid process characterized by a synchronous wave of endothelial apoptosis leading to the elimination of large vascular segments, or (ii) vascular pruning, a slower selective mechanism involving redistribution of EC toward more functional vessels and apoptosis of isolated ECs(50). Our data support the involvement of dTC in this regression, as their secretions significantly fragmented preformed endothelial sprouts and reduced the overall network density (Fig. 7D, 7E). Importantly, dTC significantly but slightly affected EC viability (Fig. 4E, 4F), in agreement with previous studies reporting an extended period of minor EC apoptosis during natural or propranolol-induced IH involution phase(10, 51). Instead, by inhibiting FGF-2, a stabilizer of cell junctions, we found that PTX3 contributes to the dismantling of VE-cadherin junctions, thereby facilitating EC detachment (Fig. 7B, 7C)(52, 53). dTC enhanced EC motility in a wound healing assay (Fig.4G), a property already reported with skin cells(54). On the other hand, PTX3 depletion did not alter the wound closure assay, suggesting that while PTX3 increases the permissiveness of movement, other factors are required to actively induce motility (Fig. S6I). Thus, this effect could be mediated by the secretion of the detected pro-migratory cytokines (e.g., IL-8, IGFBP-3, IGFBP-1, TSP1, EGF) (Fig.5A). Among these, *Insulin-like Growth Factor Binding Protein 3* (IGFBP-3), a key protein in the *Insulin Growth Factor* (IGF) pathway, emerged as a strong candidate, being secreted 15-fold (p-value= 0.048) more by dTC. Indeed, an IGF-2 concentration has been reported within a single

interstitial cell layer, potentially TC, surrounding IH-EC(5). This accumulation of IGF might be the consequence of sequestration by IGFBP-3(55). IGFBP-3 exerts its influence by managing the bioavailability of IGF, while IGBFP-3 has been shown to enhance EC migration through the activation of Rho GTPases such as RhoA, Rac1, and Cdc42, which orchestrate cytoskeleton remodeling and the formation of filopodia and lamellipodia (55).

Lastly, immunohistofluorescence of involuting IH revealed the presence of collagen IV-positive empty sleeves, a hallmark of pruned vessels (Fig. 7F)(56–58). Moreover, doppler imaging of involuting IH showed heterogenous blood flow reduction, with regions exhibiting absent or minimal perfusion (59, 60). This altered hemodynamic environment might be linked to vascular remodeling and is compatible with pruning activity.

Collectively, these findings support the existence of an active rearrangement and low-apoptotic pruning mechanism.

Further studies could reveal the molecular and epigenetic mechanisms by which TC from involuting IH acquire their distinctive and protective anti-angiogenic phenotype. Additionally, although PTX3 stands out as a critical mediator, the multifaceted and pleiotropic secretome of TC certainly involves multiple interactions that remain to be elucidated.

Our findings highlight the unique phenotype of dTC in involuting IH, thereby opening new avenues for vascular research. Understanding the molecular and environmental cues that drive this phenotypic switch could lead to novel approaches to induce vascular normalization in pathological contexts via the direct modulation of a cell type present in most organs. Given the capacity of TC to orchestrate vessel stabilization and pruning, these properties are especially appealing for oncology, where vascular normalization is a recognized strategy to improve the efficacy of anticancer treatments.

Materials and Methods

Human samples

All studies were conducted in accordance with the Helsinki Declaration. Human samples were collected from patients treated at Bordeaux University Hospital, with all donors providing written consent. The Ethics Committee of Bordeaux University Hospital (N° CER-BDX 2025-270) approved the study. Clinical diagnosis was confirmed by immunohistochemistry of GLUT1, AQP1, αSMA and CD34 (Fig. S8, Tab. S1). Classification of IH samples into phases was based on the proportion of Ki67-positive EC across the entire biopsy (Fig. S8), Tab. S1. Foreskin samples were obtained from individuals aged from 3 months to 12 years.

Tissue dissociation

Freshly resected samples were washed twice in cold 1X PBS. Chopped dermis was incubated for 90 minutes in 250U/mL of collagenase type I from *Clostridium histolyticum* (Sigma) and 2mg/mL of dispase from *Bacillius polymyxa* (Sigma) diluted in sterile PBS with $Ca^{2+,}$ Mg^{2+}. Cell suspensions were filtered through 70µm cell strainers. Heterogenous populations of cell were amplified in culture in endothelial Cell Growth Medium II (ECGM2) (Promocell) for a week.

IH Cell Sorting

After cell culture amplification, cells were purified with triple and sequential sorting using a column-based magnetic cell separation method. EC, TC, PER and fibroblasts were isolated according to the manufacturer's recommendations using the following panel: anti-CD31 (EC), anti-CD34 (TC) and anti-CD146 (PER) coupled to magnetic beads (Fig. S9A)(61). Validation of cell sorting quality was performed by morphological and molecular controls (Fig. S9B, S9C).

Cell culture

Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC) (PCS-100-013, ATCC) and IH EC were cultivated in ECGM2. TC and fibroblasts were cultivated in Dubelcco's Modified Eagle's Medium (Gibco) supplemented with 10% FBS (Fisher Scientific). All media were complemented with 1% of penicillin-streptomycin (Millipore Sigma) and all cultures were tested every 2 weeks for mycoplasma contamination by qPCR.

Cell transduction

10^5 cells were plated in a 6-well plate overnight in the appropriate medium. The following day, lentiviral suspensions were diluted in cell medium to the optimal *Multiplicity of Infection* (MOI) and incubated with cells for 6 hours. If needed, 72 hours post-transduction, successfully transduced cells were selected by the addition of 0.5µg/mL of puromycin for 10 days.

Immunohistochemistry and fluorescence

Formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) sections were dewaxed, rehydrated, and antigens were retrieved by citrate buffer in a PT-link instrument ® (Dako, Agilent). The sections were incubated overnight with primary antibodies at 4°C (Tab. S2). The following day, slices were incubated for 1 hour with Alexa- conjugated secondary antibodies (Tab. S2) and nuclei were counterstained with hematoxylin or 4',6'-diamino-2-phenylindole (DAPI).

Tissue-clearing

3D imaging was conducted according to the protocol described previously(23). In brief, samples were fixed, depigmented, delipidated, immunostained and cleared. Samples were imaged by confocal microscopy and 3D pictures were reconstructed from stacks using Imaris software (Oxford Instrument, Neuroscientists package).

Microbeads carrier assay

EC were coated onto collagen-coated Cytodex-3 beads (Sigma). Briefly, $1x10^6$ EC were incubated with 2,500 beads in 1.5mL of ECGM2 in FACS tubes. The suspension was gently agitated every 20 minutes for 4 hours to prevent bead sedimentation. The following day, beads were suspended in a solution of 2.5mg/mL of fibrinogen (Sigma) complemented with 50µg/mL of aprotinin (Sigma), at a final concentration of 500 beads/mL. Fibrinogen polymerization into fibrin was carried out by adding 25U/mL of thrombin (Sigma) directly onto a 48-well plate (Fig. S10A). For co-culture experiments, fibroblasts (1,000 cells/well) were seeded on top of the fibrin gel. In the experiment with TC, 6,000 cells/well were either embedded within the gel or seeded on top. Medium was refreshed by half every day. Models were imaged using the *Cell discoverer 7* (Zeiss) in 3D widefield mode (z-stack = 300µm, objective 5X, zoom 0.5) to cover 60% of the well surface (Fig. 10B). Images were deconvolved using the fast and iterative algorithm in ZEN blue software (Zeiss) and processed using ImageJ. Sprouting parameters including mean sprout length, cumulative sprout length and sprout number were quantified using the Wimsprout algorithm (Wimasis, Onimagin Technologies) (Fig. S10C). For pruning experiments, only continuous portion of sprouts emerging from directly from beads were included in the analysis.

Telocyte morphology

GFP^{+}-TC were embedded within fibrin hydrogels as previously described, at a concentration of 20,000 cells per well in ECGM2 medium. After 3 days of culture, samples were imaged using the widefield mode of the Cell Discoverer 7 system (Zeiss) (z-stack = 200µm, objective 5X, zoom 1). Images were deconvolved using the fast-iterative algorithm in ZEN Blue software (Zeiss). Cell area was quantified using fluorescence thresholding and dendricity parameters were analyzed using the *Skeletonize* plugin in ImageJ (Fig. S10D).

Immunocytofluorescence

40,000 cells were seeded on a coverslip in 12-well plates. The following day, cells were fixed in 4% paraformaldehyde, permeabilized in 0.2% Triton X-100 and saturated in 3% of bovine serum albumin (Sigma). Samples were incubated overnight in primary antibodies listed in Tab.S2. Alexa-conjugated secondary antibodies were incubated for 1 hour at room temperature and nuclei were counterstained with DAPI. Stainings were imaged using the NIS-Elements Software (Nikon) coupled with a Leica epifluorescence microscope. Images were processed using ImageJ software.

Supernatent screening

TC were cultivated for 48 hours in cytokine-free ECGM2 but supplemented with 1% FBS. Supernatants were collected, centrifuged for 10 minutes (3,500 rpm) and were screened using the Angiogenesis Profiler array (Biotechne) according to the manufacturer's recommendations. Signal intensity was measured automatically using an open-source ImageJ macro (https://tinyurl.com/3cwjwm7c)(62). The intensity of each dot was normalized according to the negative and positive reference points. Targets with an intensity that did not exceed 20% of the negative reference points were considered as negative.

ELISA

Human FGF2 (Proteintech) and PTX3 (Proteintech) were assayed according to the manufacturer's recommendations. For tissue lysate (n=25), proteins were previously extracted from frozen resections using a combined mechanical (Precellys) and chemical extraction with RIPA buffer (25mM of Tris-HCl pH 7.6, 150mM NaCl, 1% NP-40, 1% sodium deoxycholate (SDS), 1mM phenylmethanesulfonylfluoride (PMSF) and protease and phosphatase inhibitor cocktail (Sigma)).

Proliferation assays

EdU incorporation assay was performed according to the manufacturer's recommendations (Click-IT, Invitrogen) by incubating 10µM of EdU in cell culture media for 24 hours. Models were imaged using the confocal mode of *Cell Discoverer 7* (Zeiss).

For the sulforhodamine B (SRB) assay(63), 1,500 EC were seeded in 96-well plates and fixed at 24, 48 and 72-hours with 10% trichloroacetic acid. Plates were incubated in 4% SRB for 30 minutes and washed 5 times in 1% acetic acid. SRB dye was released by the addition of 10mM of Tris-base. Absorbance was read at 510nm with a microplate reader. Specific growth factor (k) and doubling time were calculated using exponential growth non-linear regression in Graphpad Prism.

FGF2 activation of EC and protein extraction

EC were starved overnight in cytokine-free ECGM2 supplemented with 1% FBS. The following day, cells were further starved for 3 hours in ECGM2 lacking both cytokines and FBS. For stimulation, EC were incubated for 10 minutes with ECGM2 containing 22.5µg/mL of heparin and 10 ng/mL of FGF-2 as positive control. Conditioned media (CM) from TC were collected after 48 hours of culture with 800,000 TC in ECGM2 supplemented only with heparin (22.5ng/mL) and FGF2 (10ng/mL). CM was centrifuged at 3,500 rpm for 10 minutes to remove cellular debris. EC were then stimulated for 10 minutes with 100% of TC-derived CM. Proteins were extracted directly from 10-cm dishes using 300µL of RIPA lysis buffer. Protein concentrations were measured using the Pierce™ BCA Protein Assay kit (Thermo Fisher), according to the manufacturer's instructions.

Western blot

20µg of proteins were denatured by boiling in Laemmli sample buffer (Thermo Fisher) for 5 minutes at 95°C. Proteins were separated by migration in 10% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Migrated proteins were transferred with a liquid system to a nitrocellulose membrane (E-blot). Saturation was performed for 1 hour in 5% nonfat dry milk 0.1% Tween-20 TBS. Membranes were incubated for 90 minutes at room temperature with primary antibody (Table S2) and 60 minutes with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (Table S2). Bands were revealed using chemiluminescent ECL reagent (Biorad). Images were obtained using I- bright device and quantified using ImageLab software (Biorad).

RNA extraction and retrotranscription

RNA from cell pellets were extracted using the NucleoSpin RNA kit (Macherey Nagel). 500ng of RNA were retrotranscribed in cDNA using the PrimeScript RT Master Mix kit (Takara) following the manufacturer's recommendations.

PCR

Polymerase Chain Reaction (PCR) was performed using the Brilliant III Ultra-Fast SYBR Green qRT-PCR master mix (Agilent) according to the manufacturer's guidelines. Refer to Tab. S3 for primer sequences.

Cell viability assay

The evaluation of cell viability was performed using the Live/Dead Cell Staining Kit II (Promocell) according to the manufacturer's recommendations. Briefly, 3D co-cultures of EC and TC were incubated for 2 hours with 2µM of calcein and 4µm of ethidium homodimer III (EthD-III). Cultures were imaged with the semi-automatic confocal *Cell Discoverer 7* (Zeiss) using fluorescein and propidium iodide excitation and detection settings.

Migration assay

Endothelial cells (30,000 cells/well) were seeded in 96-well tissue culture plates in complete ECGM2 medium and incubated overnight at 37°C, 5% CO_2 to allow monolayer formation. Uniform scratches were generated using the Incucyte® WoundMaker 96-pin tool (Sartorius) on confluent monolayers. Detached cells were removed by three gentle washes of PBS containing Ca^{2+} and Mg^{2+} and cells were incubated with TC-derived CM. Plates were equilibrated in the Incucyte ®Live-Cell Analysis system for 15 minutes prior to image acquisition. Phase-contrast images were acquired every 30 minutes in the Incucyte ®Live-Cell Analysis system for 24 hours. Wound closure was quantified using the Incucyte® Scratch Analysis software module, which calculates wound width and plots migration curves.

Transmission electron microscopy

Transmission electron microscopy was performed at the Bordeaux Imaging Center, University of Bordeaux, which is part of the France Bioimaging infrastructure. IH biopsies were fixed for 1 hour in 2.5% glutaraldehyde prepared in 0.1M phosphate buffer (pH 7.4), and post-fixed for 2 hours in the dark using 1% osmium tetroxide in phosphate buffer. A graded ethanol dehydration series was applied, followed by incubation for 2 hours in a 1:1 mixture of absolute ethanol and Epon 812 epoxy resin (Delta Microscopy). Samples were embedded overnight in 100% epoxy resin and polymerized at 60°C for 24 to 48 hours. Ultrathin sections (65nm) were obtained using a diamond knife (Diatome) mounted on an ultramicrotome (EM UC7, Leica Microsystem). Sections were collected on copper grids and contrasted with uranyl acetate and lead citrate. Observations were performed with a Hitachi H7650 transmission electron microscope (Tokyo, Japan) operating at 80kV.

Flow cytometry

100,000 EC were seeded on 6-well plates and cultured overnight in complete ECGM2 medium. The next day, the medium was replaced with a 1:1 mix of ECGM2 and TC-derived conditioned medium. EC were incubated for 48 hours under these conditions. Cells were then detached using PBS containing 1mM EDTA, and stained with 5µL of APC-conjugated anti-ICAM1 antibody for 20 minutes at 4°C. After staining, cells were fixed in 0.2% of paraformaldehyde and 25,000 cells were analyzed using an Accuri flow cytometer. Data were processed with FlowJo 10.10 software.

Statistical analysis

Data normality was tested with the Shapiro-Wilk statistical test. Homoscedasticity was checked with the Fisher test. Data with Gaussian distribution were analyzed by using parametric tests such as Student's t-test or ANOVA. Data that did not fit with normal distribution were analyzed with non-parametric tests such as the Mann-Whitney or Kruskal-Wallis tests. Comparison of data with unequal variances was analyzed using adapted Welch statistical tests. A p-value < 0.05 (*) was considered significant. Results are presented as mean ± standard error of mean (SEM).

Acknowledgments

F.M. gratefully acknowledges support from the Région Nouvelle Aquitaine (AAPR2022-2021-17153910), from the Société de Recheche en Dermatologie and from the Société Française de Dermatologie and Laboratoire BMS.

Imaging studies were conducted at the Bordeaux Imaging Center - Bordeaux University, a core facility of the national infrastructure "France BioImaging" (ANR-10-INBS-04 FranceBioImaging). We thank VectUb of Bordeaux University for preparing lentiviral particles. We are also grateful to R. Cooke for copyediting the manuscript.

References

1. C. Léauté-Labrèze, J. I. Harper, P. H. Hoeger, Infantile haemangioma. *The Lancet* 390, 85–94 (2017).

2. P. E. North, M. Waner, A. Mizeracki, M. C. Mihm, GLUT1: A newly discovered immunohistochemical marker for juvenile hemangiomas. *Hum Pathol* 31, 11–22 (2000).

3. E. Boye, *et al.*, Clonality and altered behavior of endothelial cells from hemangiomas. *J Clin Invest* 107, 745–52 (2001).

4. S. Aydin Köker, *et al.*, Evaluation of GLUT1, IGF-2, VEGF, FGF 1, and angiopoietin 2 in infantile hemangioma. *Archives de Pédiatrie* 28, 296–300 (2021).

5. A. Picard, *et al.*, IGF-2 and FLT-1/VEGF-R1 mRNA Levels Reveal Distinctions and Similarities Between Congenital and Common Infantile Hemangioma. *Pediatric Research 2008 63:3* 63, 263–267 (2008).

6. P. Kaulanjan-Checkmodine, *et al.*, Is Infantile Hemangioma a Neuroendocrine Tumor? *Int J Mol Sci* 23 (2022).

7. C. Léauté-Labrèze, S. Prey, K. Ezzedine, Infantile haemangioma: Part I. Pathophysiology, epidemiology, clinical features, life cycle and associated structural abnormalities. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* 25, 1245–1253 (2011).

8. C. Léauté-Labrèze, *et al.*, Propranolol for severe hemangiomas of infancy. *N Engl J Med* 358, 2649–51 (2008).

9. C. Léauté-Labrèze, *et al.*, A randomized, controlled trial of oral propranolol in infantile hemangioma. *N Engl J Med* 372, 735–746 (2015).

10. M. J. RAZON, B. M. KRÄLING, J. B. MULLIKEN, J. BISCHOFF, Increased Apoptosis Coincides with Onset of Involution in Infantile Hemangioma. *Microcirculation* 5, 189–195 (1998).

11. F. Moisan, *et al.*, Critical role of Aquaporin-1 and telocytes in infantile hemangioma response to propranolol beta blockade. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 118, e2018690118 (2021).

12. Y. Kang, *et al.*, Skin telocytes versus fibroblasts: two distinct dermal cell populations. *J Cell Mol Med* 19, 2530–9 (2015).

13. M. Shoshkes-Carmel, *et al.*, Subepithelial telocytes are an important source of Wnts that supports intestinal crypts. *Nature* 557, 242–246 (2018).

14. K. Bahar Halpern, *et al.*, Lgr5+ telocytes are a signaling source at the intestinal villus tip. *Nature Communications 2020 11:1* 11, 1–12 (2020).

15. L. Iliopoulou, *et al.*, Different fibroblast subtypes propel spatially defined ileal inflammation through TNFR1 signalling in murine ileitis. *Nature Communications 2025 16:1* 16, 1–17 (2025).

16. Y. Zheng, *et al.*, Human lung telocytes could promote the proliferation and angiogenesis of human pulmonary microvascular endothelial cells in vitro. *Mol Cell Ther* 2, 3 (2014).

17. M. C. Rusu, *et al.*, Skin telocytes. *Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger* 194, 359–367 (2012).

18. L. M. Popescu, M.-S. Faussone-Pellegrini, TELOCYTES - a case of serendipity: the winding way from Interstitial Cells of Cajal (ICC), via Interstitial Cajal-Like Cells (ICLC) to TELOCYTES. *J Cell Mol Med* 14, 729–740 (2010).

19. J. Yang, Y. Li, F. Xue, W. Liu, S. Zhang, Exosomes derived from cardiac telocytes exert positive effects on endothelial cells. *Am J Transl Res* 9, 5375–5387 (2017).

20. R. Albulescu, *et al.*, The secretome of myocardial telocytes modulates the activity of cardiac stem cells. *J Cell Mol Med* 19, 1783–1794 (2015).

21. L. Díaz-Flores, *et al.*, "Telocyte Behaviour During Inflammation, Repair and Tumour Stroma Formation" in (Springer, Singapore, 2016), pp. 177–191.

22. D. Song, *et al.*, Roles of transforming growth factor-β and phosphatidylinositol 3-kinase isoforms in integrin β1-mediated bio-behaviors of mouse lung telocytes. *J Transl Med* 17, 1–14 (2019).

23. L. Pechtimaldjian, *et al.*, Skin-iDISCO+: An optimized tissue-clearing and labeling protocol for morphometric analysis of human cutaneous vasculature. *STAR Protoc* 6, 103524 (2024).

24. A. C. Newman, M. N. Nakatsu, W. Chou, P. D. Gershon, C. C. W. Hughes, The requirement for fibroblasts in angiogenesis: Fibroblast-derived matrix proteins are essential for endothelial cell lumen formation. *Mol Biol Cell* 22, 3791–3800 (2011).

25. M. Presta, E. Foglio, A. C. Schuind, R. Ronca, Long Pentraxin-3 Modulates the Angiogenic Activity of Fibroblast Growth Factor-2. *Front Immunol* 9, 2327 (2018).

26. V. Verkarre, *et al.*, ICAM 3 and E-selectin endothelial cell expression differentiate two phases of angiogenesis in infantile hemangiomas. *J Cutan Pathol* 26, 17–24 (1999).

27. B. M. Kräling, *et al.*, E-selectin is present in proliferating endothelial cells in human hemangiomas. *Am J Pathol* 148, 1181 (1996).

28. A. Rotter, X. T. Lima, Z. N. P. Oliveira, Evaluation of plasma and urinary levels of vascular endothelial growth factor and matrix metalloproteinase-9 in patients with infantile hemangioma. *Int J Dermatol* 60, 1263–1269 (2021).

29. A. Rešić, N. Benco Kordić, J. Obuljen, M. Bašković, Importance of Determining Vascular Endothelial Growth Factor Serum Levels in Children with Infantile Hemangioma. *Medicina 2023, Vol. 59, Page 1914* 59, 1914 (2023).

30. S. Aydin Köker, *et al.*, Evaluation of GLUT1, IGF-2, VEGF, FGF 1, and angiopoietin 2 in infantile hemangioma. *Archives de Pediatrie* 28, 296–300 (2021).

31. Y. Fu, Z. G. Yang, L. Y. Zhao, Angiogenesis characteristics of infantile hemangioma and feasibility observation of transplantation model of human hemangioma on mice. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 21, 1276–1280 (2017).

32. H. G. Tanyildiz, *et al.*, Serum Basic Fibroblastic Growth Factor Levels in Children with Infantile Hemangioma. *Indian J Pediatr* 83, 937–940 (2016).

33. L. Zhang, *et al.*, Role of urinary basic fibroblast growth factor in differentiating hemangiomas from vascular malformation. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi* 44, 186–188 (2006).

34. C. Dosquet, M. C. Coudert, M. Wassef, O. Enjolras, L. Drouet, [Importance of bFGF ("basic fibroblast growth factor") for diagnosis and treatment of hemangiomas]. *Ann Dermatol Venereol* 125, 313–316 (1998).

35. S. Goel, *et al.*, NORMALIZATION OF THE VASCULATURE FOR TREATMENT OF CANCER AND OTHER DISEASES. *Physiol Rev* 91, 1071 (2011).

36. H. Huynh, *et al.*, Infigratinib Mediates Vascular Normalization, Impairs Metastasis, and Improves Chemotherapy in Hepatocellular Carcinoma. *Hepatology* 69, 943 (2019).

37. S. Cambier, *et al.*, Integrin αvβ8-Mediated Activation of Transforming Growth Factor-β by Perivascular Astrocytes: An Angiogenic Control Switch. *Am J Pathol* 166, 1883 (2005).

38. L. M. Delgado-García, *et al.*, Dissecting reactive astrocyte responses: lineage tracing and morphology-based clustering. *Biol Res* 57, 54 (2024).

39. J. Yang, Y. Li, F. Xue, W. Liu, S. Zhang, Exosomes derived from cardiac telocytes exert positive effects on endothelial cells. *Am J Transl Res* 9, 5375 (2017).

40. Z. Liao, *et al.*, Cardiac telocytes inhibit cardiac microvascular endothelial cell apoptosis through exosomal miRNA-21-5p-targeted cdip1 silencing to improve angiogenesis following myocardial infarction. *Theranostics* 11, 268 (2021).

41. T. Aschacher, *et al.*, Telocytes in the human ascending aorta: Characterization and exosome-related KLF-4/VEGF-A expression. *J Cell Mol Med* 25, 9697 (2021).

42. M. Rusnati, *et al.*, Selective recognition of fibroblast growth factor-2 by the long pentraxin PTX3 inhibits angiogenesis. *Blood* 104, 92–99 (2004).

43. A. Inforzato, *et al.*, The angiogenic inhibitor long pentraxin PTX3 forms an asymmetric octamer with two binding sites for FGF2. *Journal of Biological Chemistry* 285, 17681–17692 (2010).

44. M. Presta, E. Foglio, A. C. Schuind, R. Ronca, Long Pentraxin-3 Modulates the Angiogenic Activity of Fibroblast Growth Factor-2. *Front Immunol* 9, 2327 (2018).

45. R. Ronca, *et al.*, Pentraxin 3 inhibits the angiogenic potential of multiple myeloma cells. *Cancers (Basel)* 13, 2255 (2021).

46. R. Ronca, *et al.*, Long-Pentraxin 3 Derivative as a Small-Molecule FGF Trap for Cancer Therapy. *Cancer Cell* 28, 225–239 (2015).

47. B. Bonsack, M. Borlongan, E. Lo, K. Arai, Brief overview: Protective roles of astrocyte-derived pentraxin-3 in blood-brain barrier integrity. *Brain Circ* 5, 145 (2019).

48. A. Shindo, *et al.*, Astrocyte-derived pentraxin 3 supports blood-brain barrier integrity under acute phase of stroke. *Stroke* 47, 1094–1100 (2016).

49. Y. Jiang, *et al.*, Protective effect of pentraxin 3 on pathological retinal angiogenesis in an in vitro model of diabetic retinopathy. *Arch Biochem Biophys* 725, 109283 (2022).

50. M. Ouarné, A. Pena, C. A. Franco, From remodeling to quiescence: The transformation of the vascular network. *Cells and Development* 168 (2021).

51. J. J. Y. Kum, Z. A. Khan, Propranolol inhibits growth of hemangioma-initiating cells but does not induce apoptosis. *Pediatr Res* (2013). https://doi.org/10.1038/pr.2013.231.

52. X. Pan, *et al.*, Fibroblast growth factor-2 alleviates the capillary leakage and inflammation in sepsis. *Molecular Medicine* 26 (2020).

53. K. Hatanaka, A. A. Lanahan, M. Murakami, M. Simons, Fibroblast Growth Factor Signaling Potentiates VE-Cadherin Stability at Adherens Junctions by Regulating SHP2. *PLoS One* 7, e37600 (2012).

54. L. Wang, *et al.*, Telocytes inhibited inflammatory factor expression and enhanced cell migration in LPS-induced skin wound healing models in vitro and in vivo. *J Transl Med* 18, 1–14 (2020).

55. S. Varma Shrivastav, A. Bhardwaj, K. A. Pathak, A. Shrivastav, Insulin-Like Growth Factor Binding Protein-3 (IGFBP-3): Unraveling the Role in Mediating IGF-Independent Effects Within the Cell. *Front Cell Dev Biol* 8, 526100 (2020).

56. E. Boriushkin, I. S. Fancher, I. Levitan, Shear-Stress Sensitive Inwardly-Rectifying K+ Channels Regulate Developmental Retinal Angiogenesis by Vessel Regression. *Cell Physiol Biochem* 52, 1569 (2019).

57. F. Baffert, *et al.*, Cellular changes in normal blood capillaries undergoing regression after inhibition of VEGF signaling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 290, 547–559 (2006).

58. N. Simonavicius, *et al.*, Pericytes promote selective vessel regression to regulate vascular patterning. *Blood* 120, 1516–1527 (2012).

59. A. M. Kutz, L. Aranibar, N. Lobos, X. Wortsman, Color Doppler Ultrasound Follow-Up of Infantile Hemangiomas and Peripheral Vascularity in Patients Treated with Propranolol. (2015). https://doi.org/10.1111/pde.12596.

60. A. A. Ding, X. Gong, J. Li, P. Xiong, Role of ultrasound in diagnosis and differential diagnosis of deep infantile hemangioma and venous malformation. *J Vasc Surg Venous Lymphat Disord* 7, 715–723 (2019).

61. E. Romano, *et al.*, A Two-Step Immunomagnetic Microbead-Based Method for the Isolation of Human Primary Skin Telocytes/CD34+ Stromal Cells. *Int J Mol Sci* 21, 1–16 (2020).

62. A. H. Klemm, Semi-automated analysis of dot blots using ImageJ/Fiji. *F1000Research 2020 9:1385* 9, 1385 (2020).

63. V. Vichai, K. Kirtikara, Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nat Protoc* 1, 1112–1116 (2006).

Figures and Tables

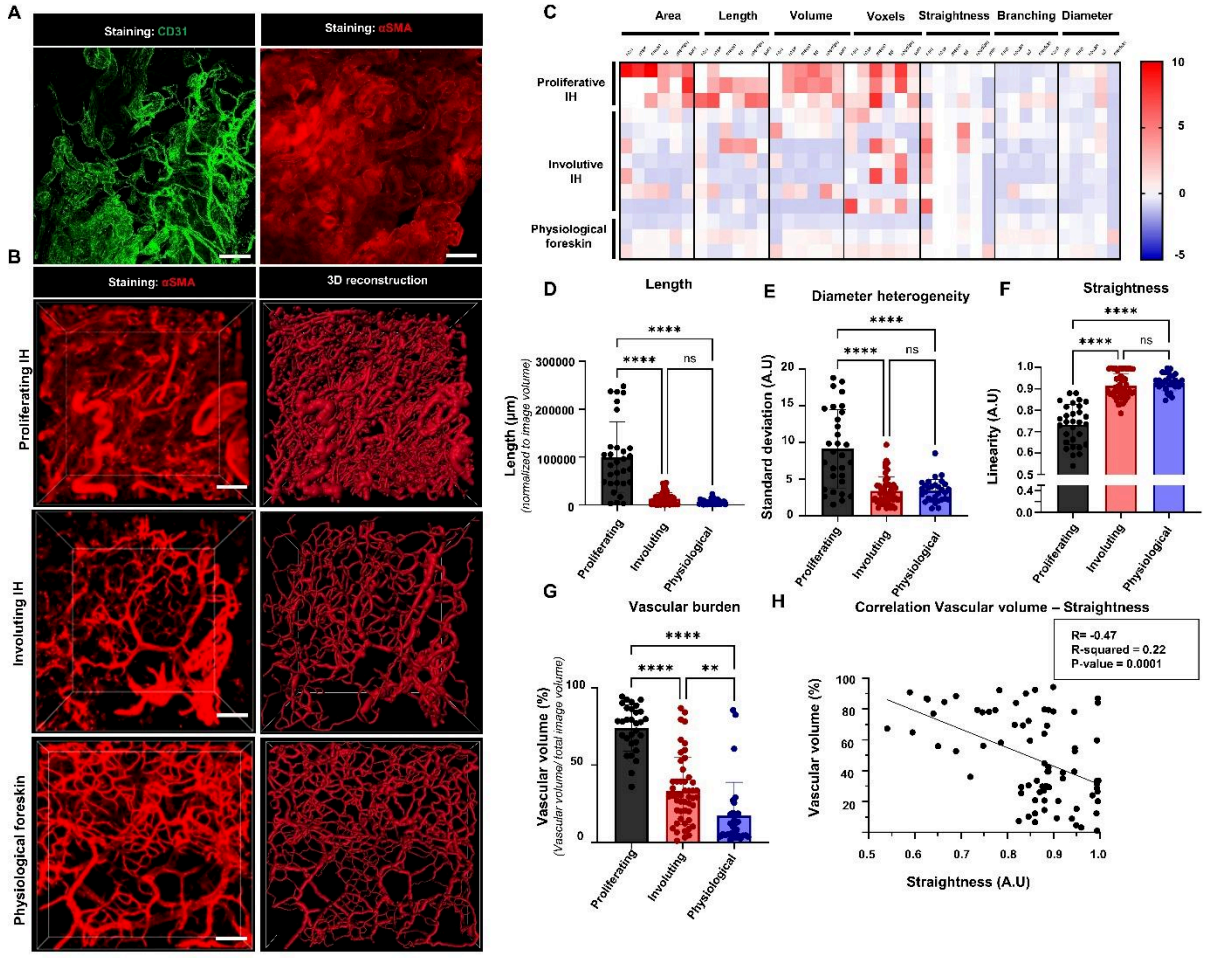


Figure 1: IH vasculature normalizes during regression. ***A)*** *Immunofluorescence on cleared proliferating IH showing CD31 (green) and αSMA (red). Maximum intensity projection of an 800µm z-stack. Scale bar, 200µm.* ***B)*** *3D projection of immunofluorescence (left) and 3D reconstruction (right) of αSMA in cleared proliferating, involuting IH and physiological foreskin samples. Scale bar, 200µm.* ***C)*** *Quantification and comparison of morphometric parameters in cleared proliferative (n=3), involuting (n=7) and physiological foreskin (n=3). Each column represents a morphometric parameter; each row shows the mean of 10 fields and reconstruction per patient.* ***D-G)*** *Quantitative comparison between proliferating IH, involuting IH and foreskin samples for* ***D)*** *total vessel length;* ***E)*** *intra-patient standard deviation of vessel diameter;* ***F)*** *mean vessel straightness and* ***G)*** *vascular volume (%). Data are presented as mean ± SEM. Kruskal-Wallis test, α= 0.05. ns = not significant; p ≤ 0.001 (**) and p ≤ 0.001 (****).H) Correlation between vascular volume (%) and vessel straightness (A.U). Pearson correlation test.*

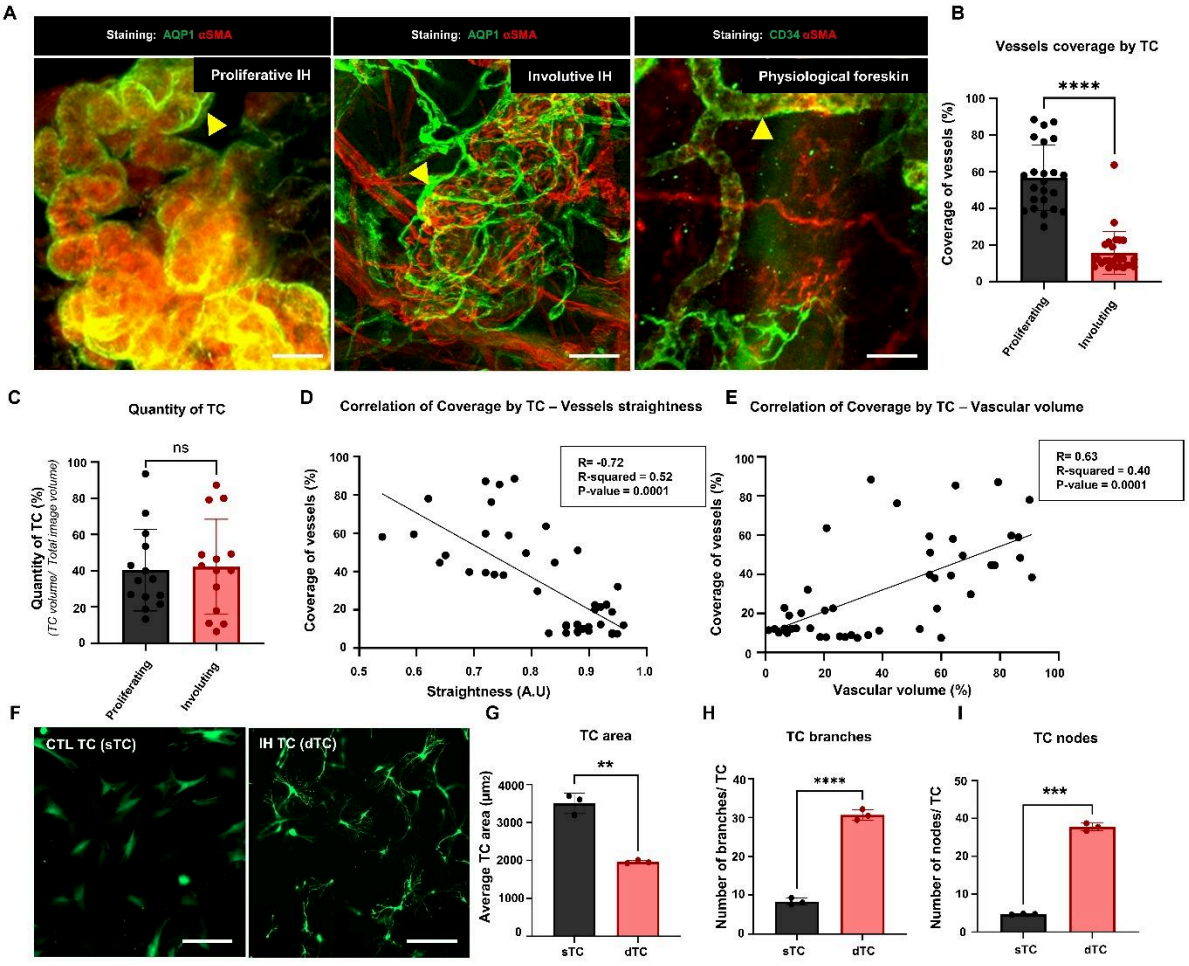


Figure 2: Morphological TC switch during IH remodeling. ***A)*** *Immunostaining of cleared proliferating IH (n=3), involuting IH (n=7) or physiological foreskin (n=3) showing pericytes (αSMA, red) and TC (AQP1 in IH and CD34 in foreskin, green). Yellow arrowheads indicate TC. Scale bar, 50µm.* ***B)*** *Quantification of percentage of vessels covered by TC. Mann-Whitney test. α= 0.05, **** = p-value ≤ 0.0001.* ***C)*** *Comparison of TC proportions between proliferating IH (n=3) and involuting IH (n=7). Mann-Whitney test, α= 0.05, ns= not significant.* ***D)*** *Correlation between TC coverage (%) and vessel straightness (A.U). Pearson correlation test.* ***E)*** *Correlation between TC coverage (%) and vascular volume (%). Pearson correlation test.* ***F)*** *Confocal images of 3D-cultured TC embedded in fibrin hydrogel, showing spindle-shaped TC (sTC) from foreskin and dendritic TC (dTC) from involuting IH. Scale bar, 100µm.* ***G-I)*** *Quantification of TC morphological features shown in panel F) including* ***G)*** *Mean cell area;* ***H)*** *mean number of branches and* ***I)*** *Mean number of nodes. n=3; N =3 including sTC from 3 foreskin and dTC from 4 IH. Mann-Whitney test, α= 0.05; ** = p-value ≤ 0.01, *** = p-value ≤ 0.001 and **** = p-value ≤ 0.0001.*

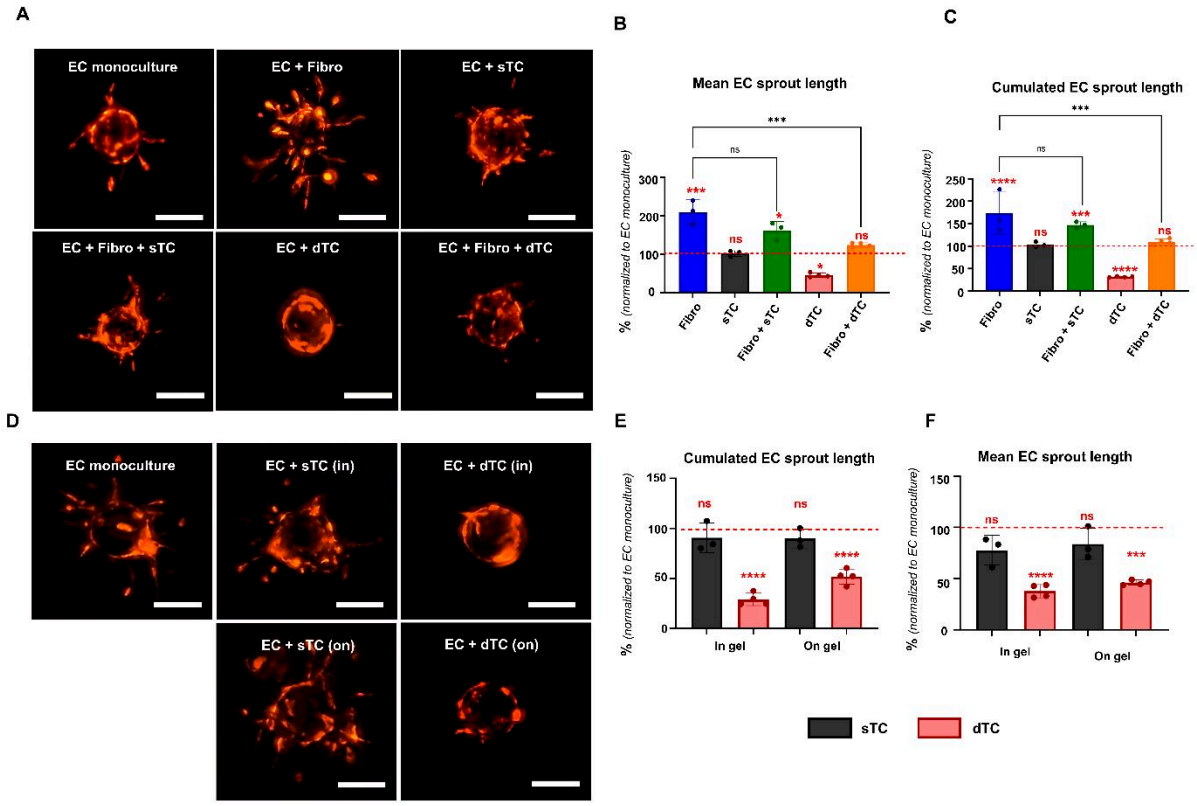


Figure 3: dTC exhibits a paracrine anti-angiogenic effect. ***A)*** *EC (Td-Tomato, red) sprouting in co-culture with fibroblasts, sTC or dTC embedded in fibrin hydrogel. Maximum intensity projection of a 300µm z-stack. Scale bar, 100µm.* ***B-C)*** *Quantification of EC sprout length from images shown in panel A), including* ***B)*** *mean sprout length and* ***C)*** *cumulated sprout length. Red dotted line indicates EC monoculture (control).* ***D)*** *EC (Td-Tomato, red) sprouting in co-culture with sTC or dTC either embedded in hydrogel or seeded on top. Maximum intensity projection of a 300µm z-stack. Scale bar, 100µm.* ***E-F)*** *Quantification of EC sprouting from panel D), including* ***E)*** *cumulative sprout length and* ***F)*** *mean sprout length. Red dotted line indicates EC monoculture (control). n=3, N=3 including sTC from 3 foreskin and dTC from 4 IH. Kruskal-Wallis test, α= 0.05. Red p-values symbols indicate comparison to EC monoculture. ns= not significant; p-value ≤ 0.05 (*); p-value ≤ 0.01 (**); p-value ≤ 0.001 (***); p-value ≤ 0.0001 (****).*

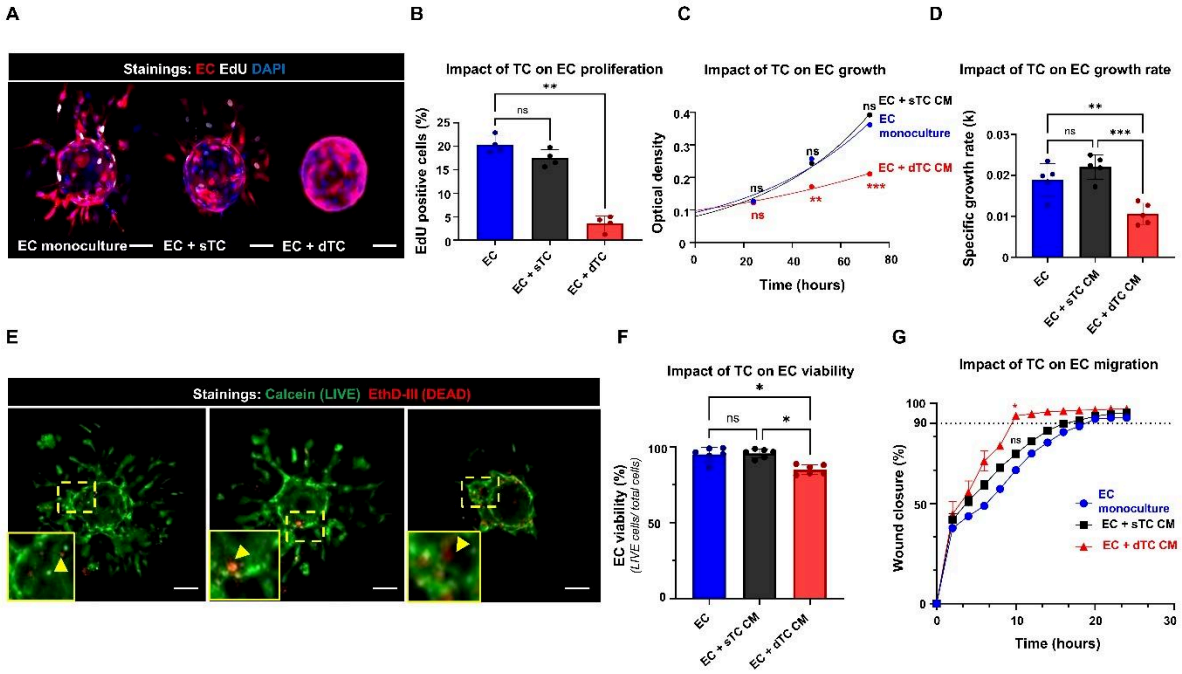


Figure 4: Impact of dTC on endothelial cells behavior. ***A)*** *EC proliferation in co-culture with sTC or dTC. EC are marked by endogenous Td-Tomato (red), total nuclei by DAPI (blue), and proliferating EC by EdU (white). Maximum intensity projection of a 300µm z-stack, acquired by confocal microscopy. Scale bar, 50µm.* ***B)*** *Quantification of EC proliferation from panel A). sTC were isolated from 3 foreskin donors (n=3) and dTC from 4 involuting IH (n=4). Kruskal-Wallis test; α= 0.05; p-value ≤ 0.01 (**).* ***C)*** *Exponential growth curve of EC cultured with conditioned medium (CM) from sTC or dTC. sTC from 4 donors and dTC from 5 donors. n=4; N=5.Two-way ANOVA; α= 0.05. Statistical comparisons are to EC monoculture (control). ns= not significant; p-value ≤ 0.01 (**); p-value ≤ 0.001 (***).* ***D)*** *Quantification of specific growth rate (k) calculated from exponential curve in C). Kruskal-Wallis, α= 0.05; p-value ≤ 0.01 (**); p-value ≤ 0.001 (***).* ***E)*** *EC viability after 48 hours of culture with sTC or dTC CM. Live cells are stained with calcein (green) and dead cells with EthD-III (red). Maximum intensity projection of a 300µm z-stack acquired in confocal mode. Scale bar, 50µm.* ***F)*** *Quantification of EC viability shown in panel E). Kruskal-Wallis test, α= 0.05, ns = not significant, p-value ≤ 0.05 (*).* ***G)*** *Quantification of EC wound closure in complete medium or CM from sTC or dTC. Black dotted line indicates 90% of closure. Two-way ANOVA, α= 0.05; ns = not significant; p-value ≤ 0.05 (*).*

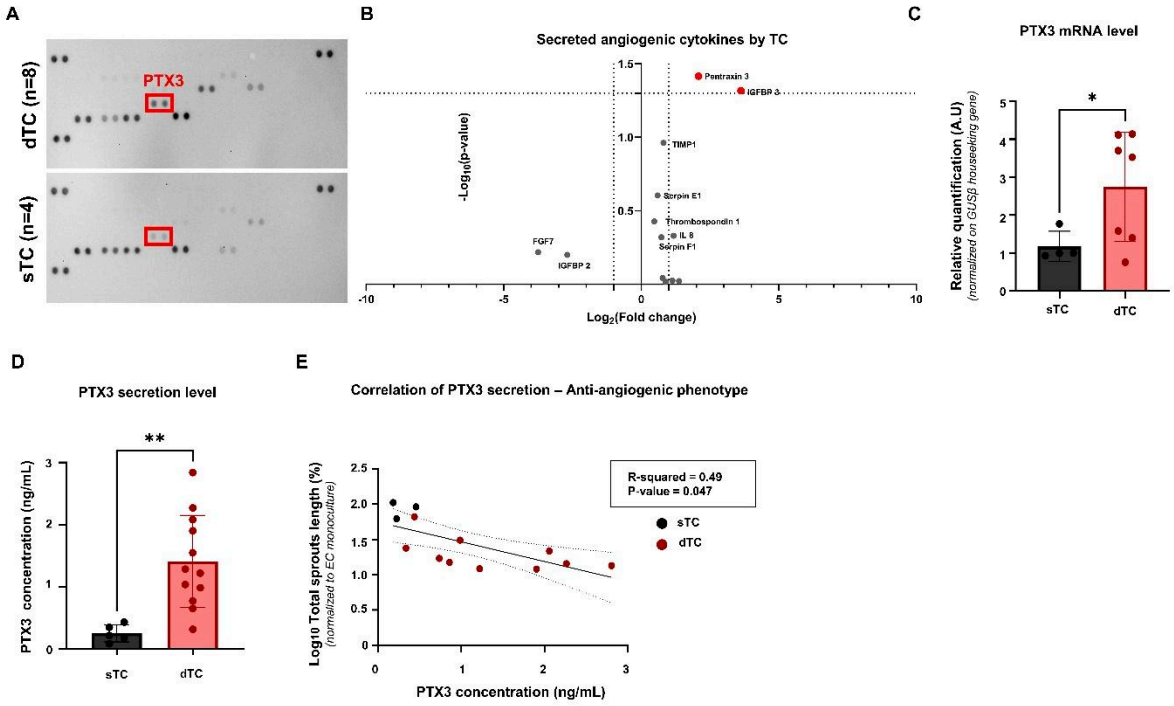


Figure 5: dTC over-secretes pentraxin-3 (PTX3). ***A)*** *Representative membranes from proteome profiler arrays performed on TC CM. Top membrane shows dTC samples (n=8) and bottom membrane sTC samples (n=4). Each cytokine is spotted in duplicate. Red rectangle highlights PTX3.* ***B)*** *Volcano plot showing differentially secreted cytokines between sTC and dTC. Black dotted lines indicate thresholds of fold-change > 2 or < 0.5 and p-value ≤ 0.05. p-values were calculated with multiple t-test comparison with α= 0.05.* ***C)*** *Quantification of PTX3 mRNA levels by qRT-PCR in sTC (n=4) and dTC (n=7). Mann-Whitney test, α= 0.05; p-value ≤ 0.05 (*).* ***D)*** *Quantification of PTX3 protein secretion by ELISA in sTC (n= 5) and dTC (n=11) CM. Mann-Whitney test, α= 0.05; p-value ≤ 0.01 (**).* ***E)*** *Negative correlation between PTX3 concentration and cumulative EC sprout length in culture treated with PTX3-dosed CM. Pearson correlation test.*

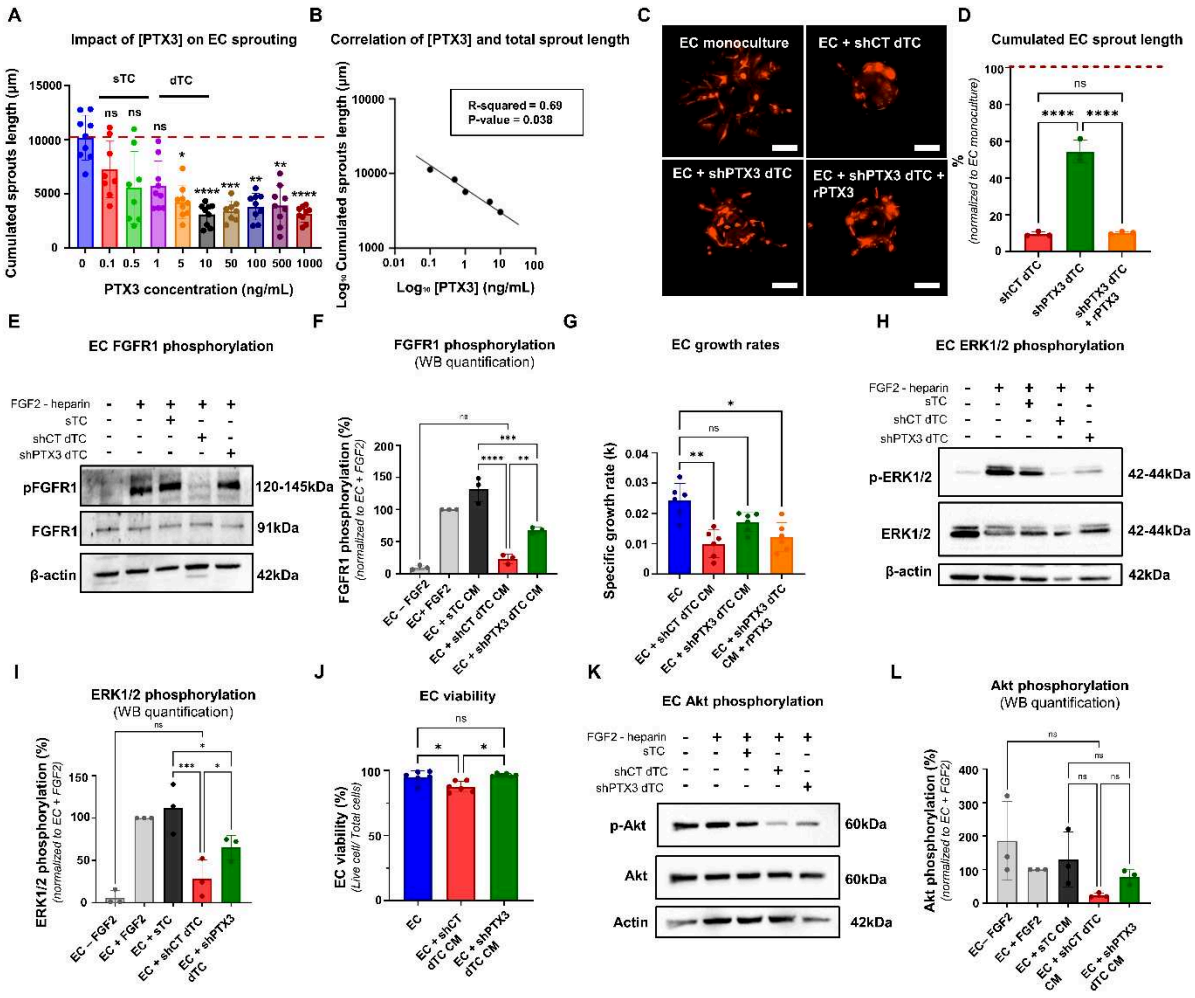


Figure 6: dTC-derived PTX3 inhibits FGF2-FGFR1 in EC. ***A)*** *Quantification of cumulated EC sprouting in presence of increasing concentrations of recombinant PTX3 (rPTX3). Red dotted line indicates EC sprouting in medium without rPTX3 (control condition for statistics). Kruskal-Wallis test; α= 0.05; p-value ≤ 0.05 (*), p-value ≤ 0.01 (**); p-value ≤ 0.001 (***); p-value ≤ 0.0001 (****).* ***B)*** *Correlation between PTX3 concentrations ranging from 0.1ng/mL to 10ng/mL and cumulative EC sprout length. Pearson correlation test.* ***C)*** *Representative images of EC (Td-Tomato, red) sprouting in co-culture with dTC transduced with control shRNA (shCT) or PTX3-targeting shRNA (shPTX3), ± 10ng/mL of rPTX3. Maximum intensity projection of a 300µm z-stack. Scale bar, 100µm.* ***D)*** *Quantification of EC sprouting shown in C). Red dotted line corresponds to EC monoculture. Kruskal-Wallis test; n=3, N=3; α= 0.05; ns= not significant; p-value ≤ 0.0001 (****).* ***E, H, K)*** *Representative Western blots showing FGFR1 (E), ERK1/2 (H) and Akt (K) phosphorylation in starved-EC cultured 10 minutes with medium depleted (-) or complemented (+) with 10ng/mL FGF2 + 22.5µg/mL heparin, or CM from sTC, shCT-dTC or shPTX3-dTC. n=3; N=3.* ***F, I, L)*** *Quantifications of blots shown in E, H, K). Phospho-signals were normalized to total FGFR1, ERK or Akt and β-actin. Kruskal-Wallis test; α= 0.05; ns= not significant; p-value ≤ 0.01 (**); p-value ≤ 0.001 (***); p-value ≤ 0.0001 (****).* ***G)*** *Specific growth rate (k) of EC cultured in CM from shCT or shPTX3-dTC ± 10ng/mL of rPTX3. Kruskal-Wallis test, α = 0.05; ns= not significant; p-value ≤ 0.01 (**).* ***J)*** *EC viability after 48 hours of culture in CM from shCT, shPTX3-dTC ± 10ng/mL of rPTX3. Kruskal-Wallis test, α= 0.05; p-value ≤ 0.05 (*).*

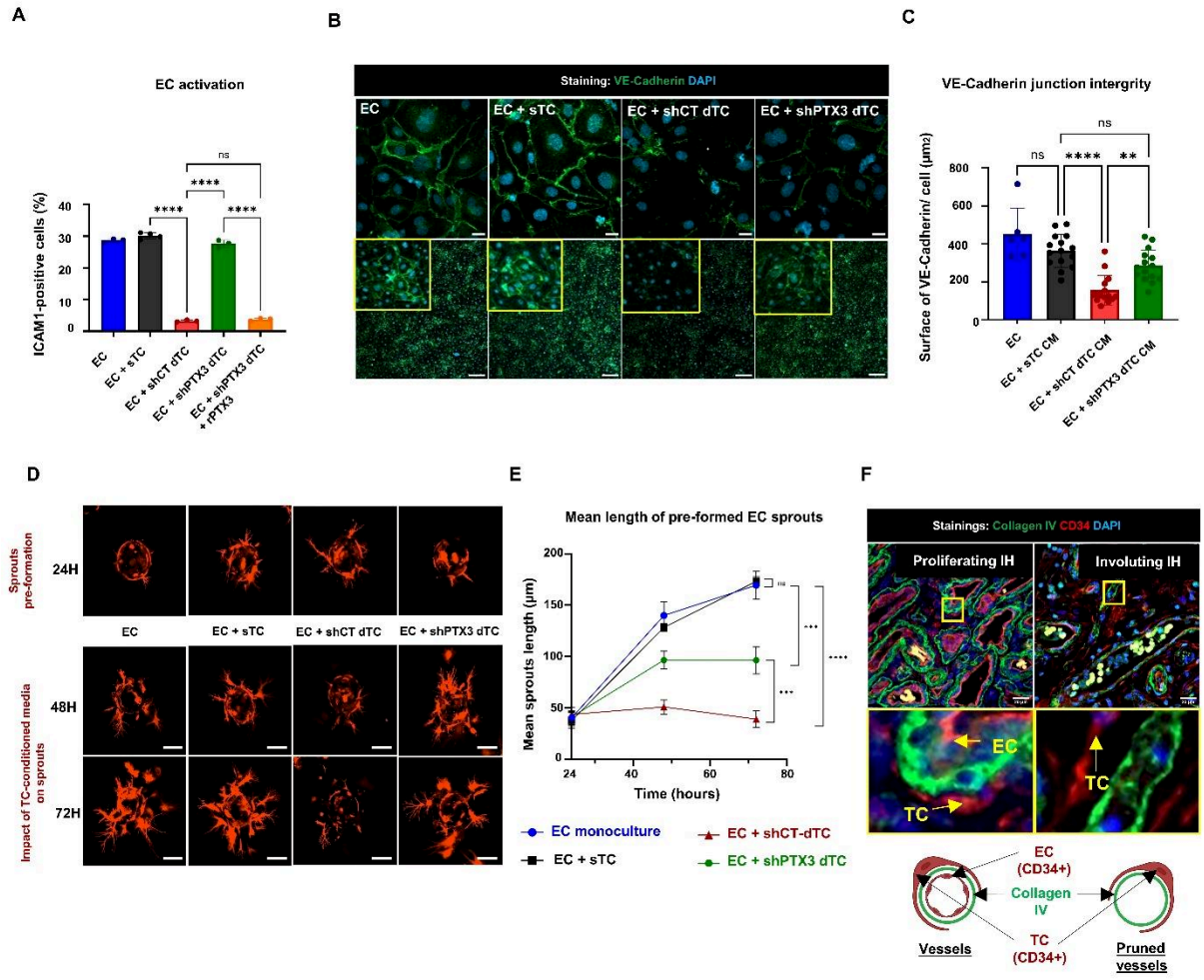


Figure 7: dTC-derived PTX3 contributes to hallmark features of vascular pruning. ***A)*** *Flow cytometry and quantification of ICAM1-positive EC after 48 hours in CM from sTC, shCT-dTC or shPTX3-dTC dTC ± 10ng/mL of rPTX3. n=3; N=3. N=3. Kruskal-Wallis test, α= 0.05; ns = not significant; p-value ≤ 0.0001 (****). **B)** Immunofluorescence of VE-cadherin (green) and nuclei (DAPI, cyan) in EC cultured 48 hours in CM from sTC, shCT-dTC or shPTX3-dTC. Yellow rectangles show zoomed region. Maximum intensity projection of 50µm z-stacks. Top: high magnification, scale bar= 20µm. Bottom: low magnification, scale bar = 200µm. **C)** Quantification of VE-cadherin surface per cell from images shown in B). n=3; N=3. Kruskal-Wallis test, α= 0.05; ns = not significant; p-value ≤ 0.01 (**); p-value ≤ 0.0001 (****). **D)** Representative images of EC (Td-Tomato, red) pre-formed sprouts cultured for 48 hours in CM from sTC, shCT-dTC or shPTX3-dTC. Maximum intensity projection of a 300µm z-stack acquired by confocal microscopy. **E)** Quantification of mean continuous sprout length emerging from beads. Two-way ANOVA, α= 0.05; ns = not significant; p-value ≤ 0.001 (***); p-value ≤ 0.0001 (****). **F)** Immunofluorescence of FFPE IH tissue sections from proliferative (n=3) and involuting (n=3) stages, stained for basement membrane (collagen IV, green); EC and TC (CD34, red) and nuclei (DAPI, blue). Yellow rectangles indicate zoomed-in areas, yellow arrows indicate TC or EC. Scale bar=20µm.*

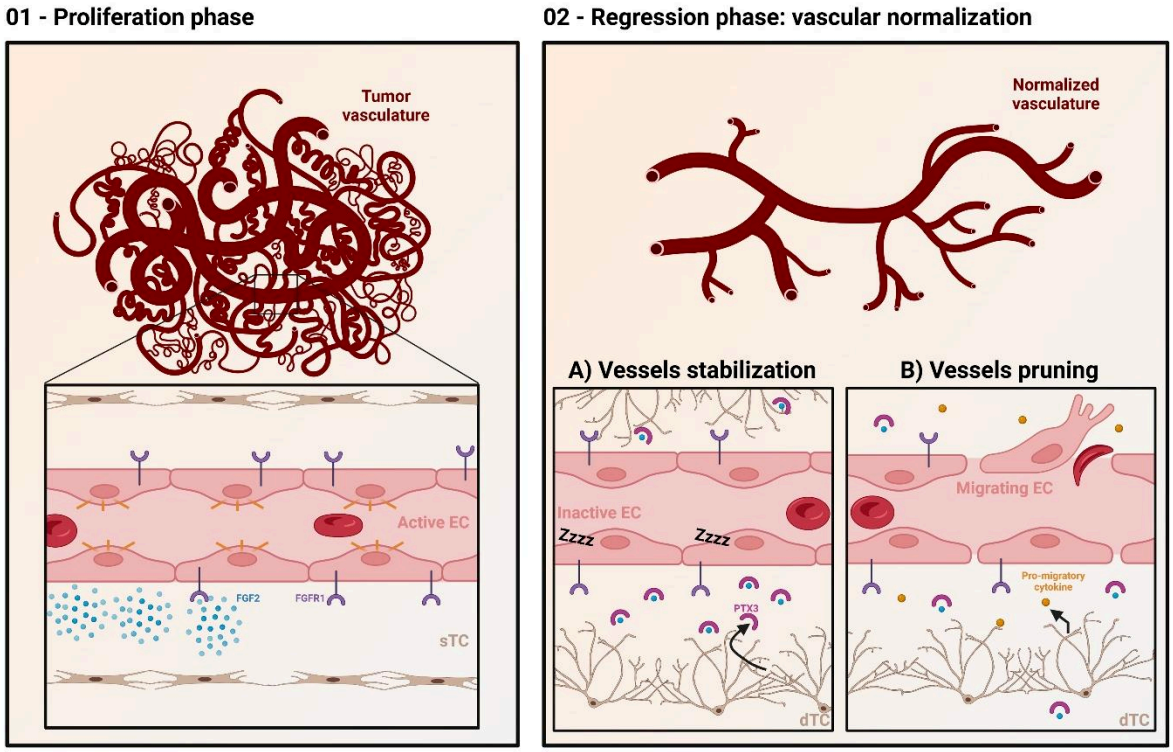


Figure 8: Summary of TC involvement during IH regression. ***1)*** *Proliferation phase: characterized by a dense, dysmorphic vasculature, composed of long, tortuous, heterogenous vessels. EC are hyperactivated and highly proliferative, due to strong pro-angiogenic signals such as elevated FGF-2 levels. Perivascular TC exhibit a spindle-shape morphology (sTC) and do not significantly influence EC behavior (in our models).* ***2)*** *Regression phase: marked by normalized vascular architecture composed of simpler, shorter, more linear vessels. TC acquire a distinct dendritic morphology (dTC) A) dTC promote EC stabilization through PTX3 secretion, which traps FGF-2 and thereby limits EC activation and proliferation, without strongly affecting EC viability. B) dTC also contribute to hallmark features of vascular pruning by promoting the elimination of dysmorphic vessels, thus promoting a simplified vascular structure. Via PTX3 secretion, they reduce EC cohesion by disrupting VE-cadherin junctions. Additionally, dTC secrete pro-migratory cytokines that stimulate EC migration, supporting the redistribution of EC toward functional and unpruned vessels.*

Supporting Information

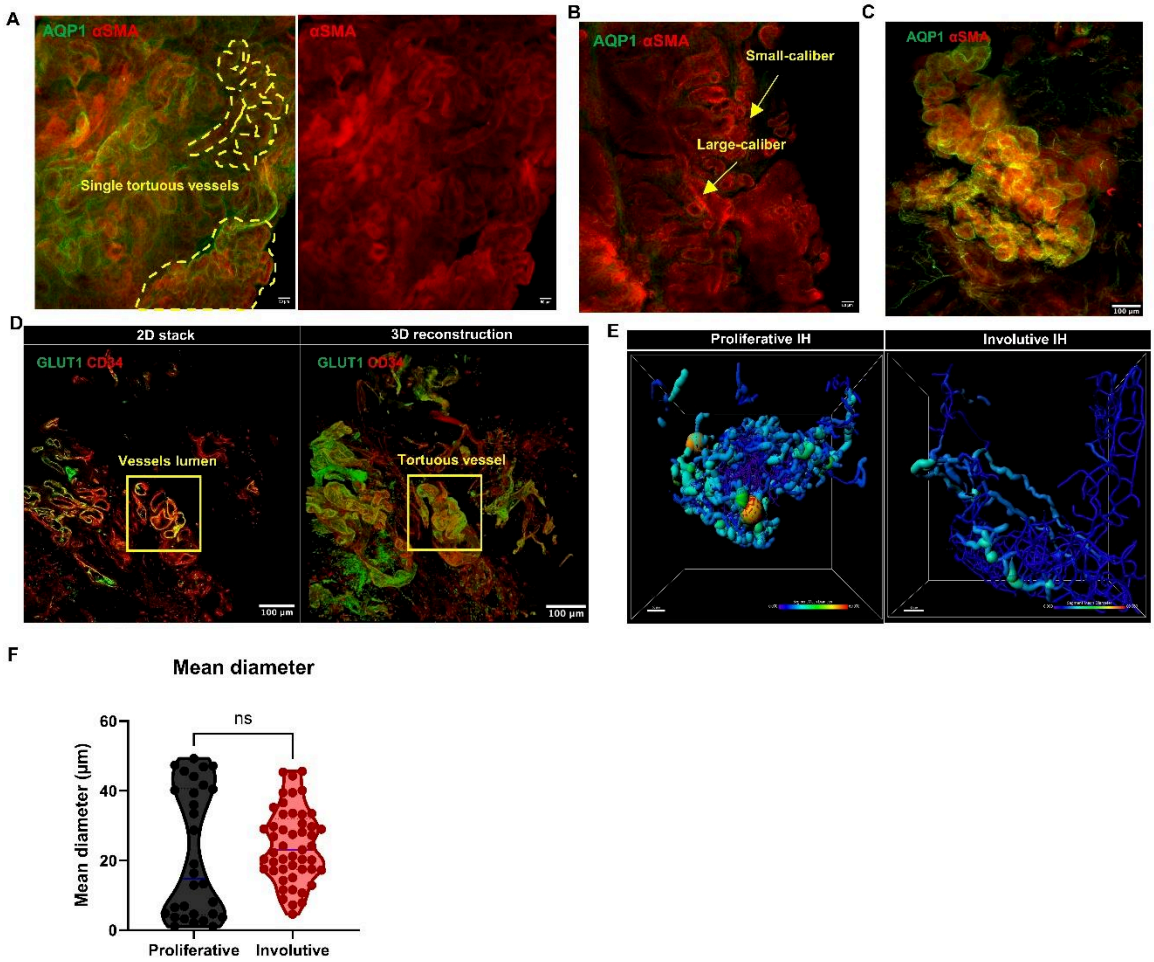


Figure S1: Morphological features of proliferating and involuting IH vasculature. ***A)*** *Immunofluorescence of a cleared proliferating IH showing TC (AQP1, green) and pericytes (αSMA, red). Left panel shows the merged image, right panel shows the αSMA channel alone. Yellow dotted line highlights a representative tortuous vessel. Maximum intensity projection of a 900µm z-stack, acquired by confocal microscopy. Scale bar, 50µm.* ***B)*** *Immunofluorescence of a cleared proliferating IH showing TC (AQP1, green) and pericytes (αSMA, red). Yellow arrows point to vessels of small and large area. Maximum intensity projection of a 500µm z-stack, acquired by confocal microscopy. Scale bar, 50µm.* ***C)*** *Immunofluorescence of a tortuous vessel from a cleated proliferating IH, showing TC (AQP1, green) and pericytes (αSMA, red). Maximum intensity projection of a 600µm z-stack, acquired by confocal microscopy. Scale bar, 100µm.* ***D)*** *Immunofluorescence of a proliferating IH showing EC (GLUT1, green, CD34 red) and TC (CD34, red) in a raw z-stack (left) and 3D reconstruction (right). Yellow rectangles show the same region, illustrating sectioning artifacts. Scale bar, 100µm.* ***E)*** *Color-coded rendering of vessel diameter in proliferating (left) or involuting IH vasculature.* ***F)*** *Violin plot showing the distribution of mean vessel diameters in proliferating (n=3) and involuting (n=7) IH. Mann-Whitney test, α= 0.05; ns = not significant.*

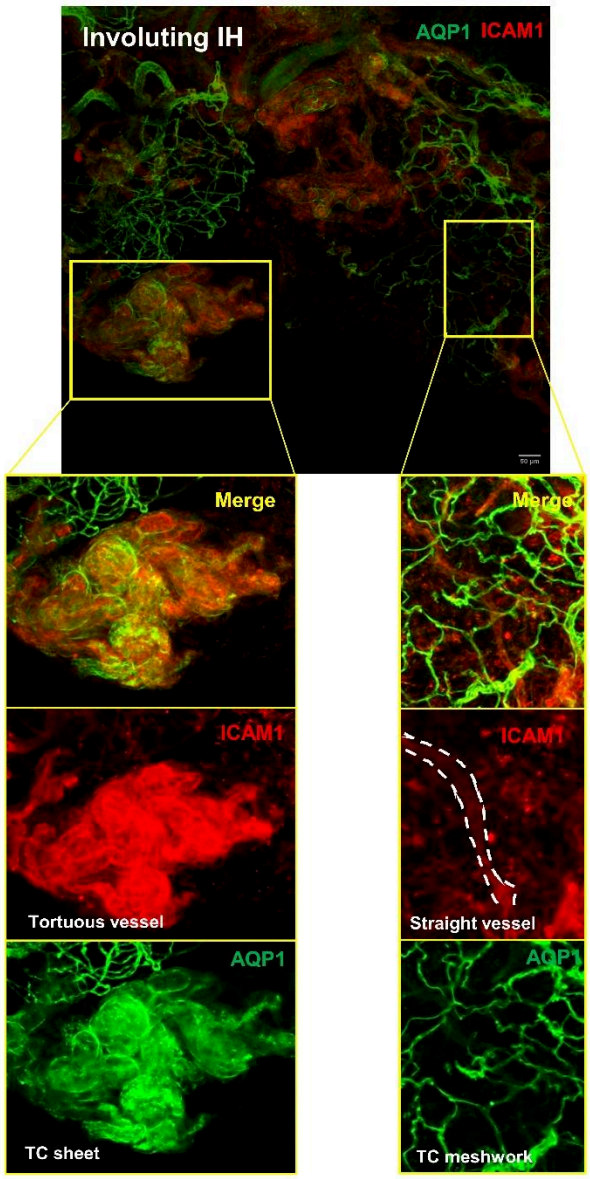


Figure S2: Correlation of vessel straightness and perivascular TC organization. *Immunofluorescence of an involuting IH showing TC (AQP1, green) and EC (ICAM1, red). Yellow rectangles indicate zoomed regions. The left panel shows a proliferative vascular lobule with high ICAM1 expression and surrounding continuous TC sheet. The right panel shows involuting vessels with low ICAM1 expression, surrounded by TC meshwork. Maximum intensity projection of a 1000µm z-stack, acquired by confocal imaging. Scale bar, 50µm.*

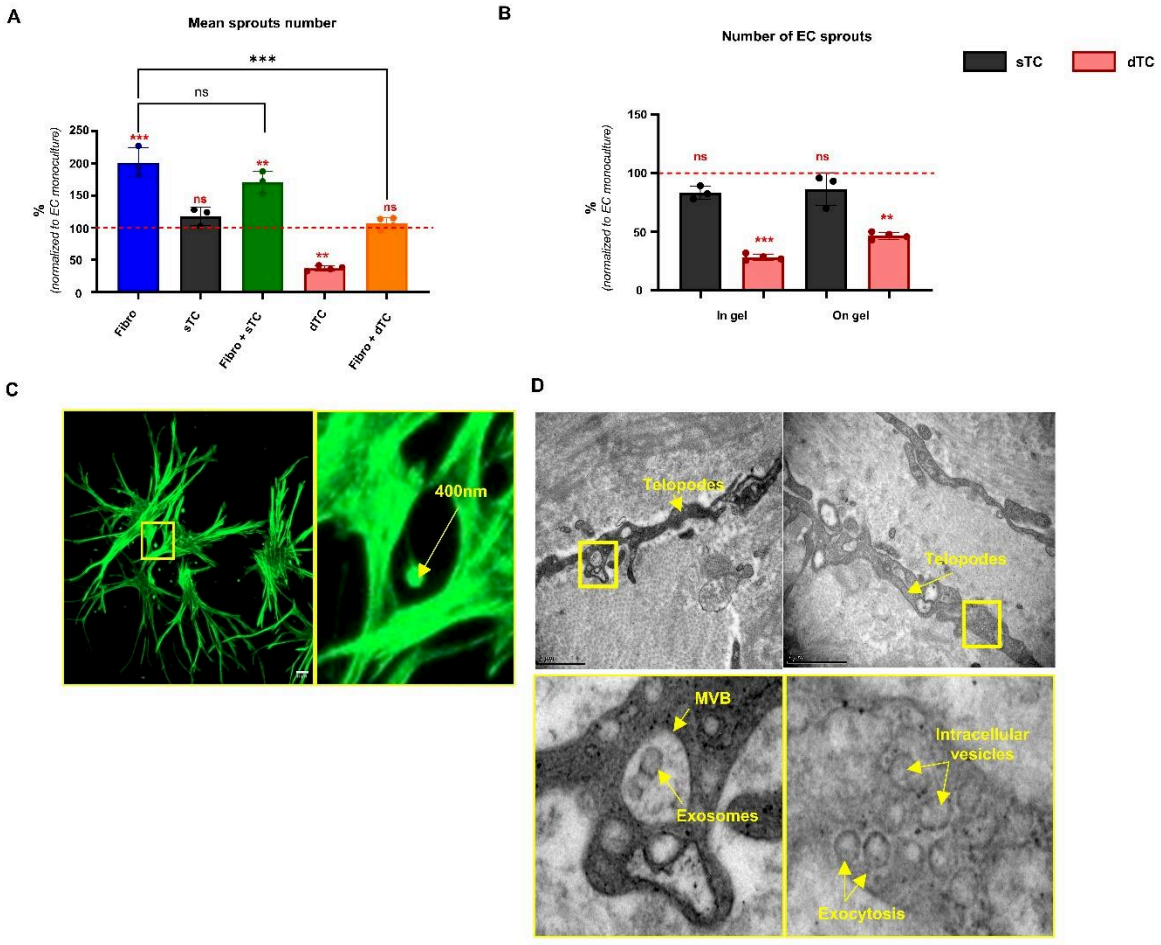


Figure S3: dTC have a paracrine anti-angiogenic phenotype. ***A)*** *Quantification of EC sprout number, cultured for 48 hours with fibroblasts and/or sTC and dTC. Data were normalized to EC monoculture (red dotted line). N=3; N=3. Kruskal-Wallis test; α= 0.05; ns = not significant; p-value ≤ 0.01 (**); p-value ≤ 0.001 (***).* ***B)*** *Quantification of EC sprout number, cultured with sTC and dTC embedded within the gel or seeded on top. Data were normalized to EC monoculture (red dotted line). N=3; N=3. Kruskal-Wallis test, α= 0.05; ns = not significant; p-value ≤ 0.01 (**); p-value ≤ 0.001 (***).* ***C)*** *Immunofluorescence of TC (phalloidin, green) culture for 48 hours in 3D fibrin hydrogel. Yellow rectangle shows zoomed region and yellow arrow points membrane budding (400 nm). Maximum intensity projection of a 100µm z-stack, acquired with Airyscan confocal microscope mode. Scale bar, 20µm.* ***D)*** *Transmission electron microscopy of TC in involuting IH tissue. Top panel shows widefield view, with yellow arrow showing telopodes. Yellow rectangles show zoomed region presented in bottom panel. Scale bar, 1µm.*

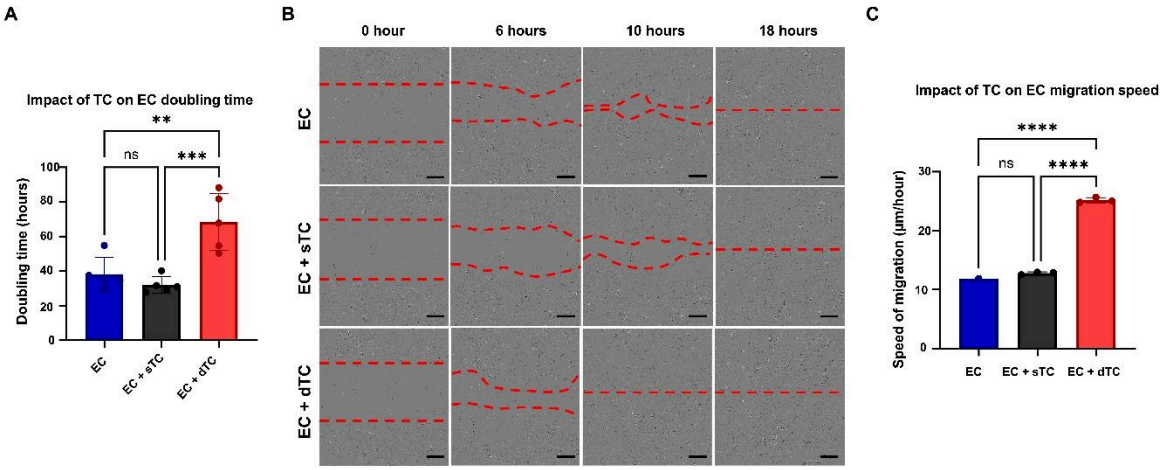


Figure S4: Impact of dTC on EC behavior. ***A)*** *Quantification of EC doubling time, cultured for 48 hours in complete medium, or CM from sTC and dTC. n=4; N=5. Kruskal-Wallis test, α= 0.05; ns = not significant; p-value ≤ 0.01 (**); p-value ≤ 0.001 (***).* ***B)*** *Representative pictures of scratch closure of EC cultured for 24 hours in complete medium or CM from sTC and dTC. Scale bar, 150µm.* ***C)*** *Migration speed of EC cultured in complete medium and CM from sTC or dTC. Kruskal-Wallis test; α= 0.05; p-value ≤ 0.0001 (****).*

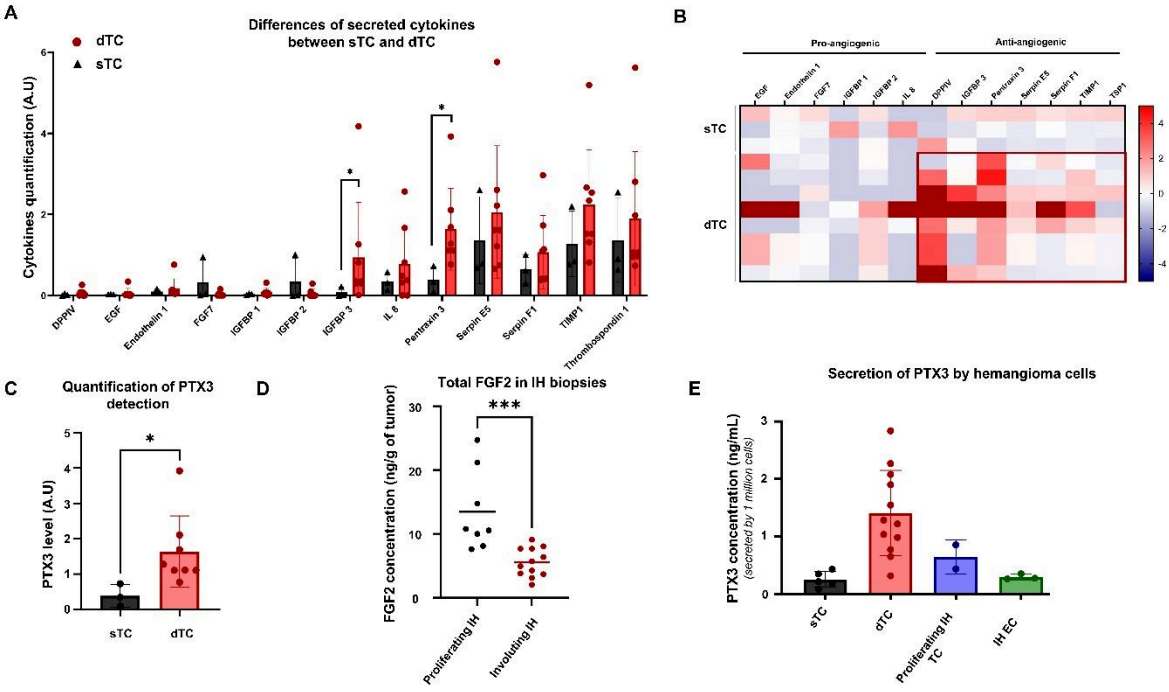


Figure S5: Anti-angiogenic signature of dTC and PTX3 secretion. ***A)*** *Comparison of angiogenic cytokines secreted by sTC and or dTC from proteome profiler membranes. Multiple t-test; α= 0.05; ns = not significant; p-value ≤ 0.05 (*).* ***B)*** *Heatmap of secreted cytokines by sTC or dTC, normalized to sTC. Left portion represents pro-angiogenic factors and right portion anti-angiogenic cytokines.* ***C)*** *Quantification of PTX3 spot intensity between sTC and dTC, from proteome profiler membranes. Mann-Whitney test; α= 0.05; p-value ≤ 0.001 (***).* ***D)*** *Dosage of FGF-2 (ng/ g of tumor) from proliferating (n=8) or involuting IH biopsies (n=12).* ***E)*** *Comparison of secreted PTX3 (ng/mL) by sTC, dTC, sTC from proliferating IH and EC from IH.*

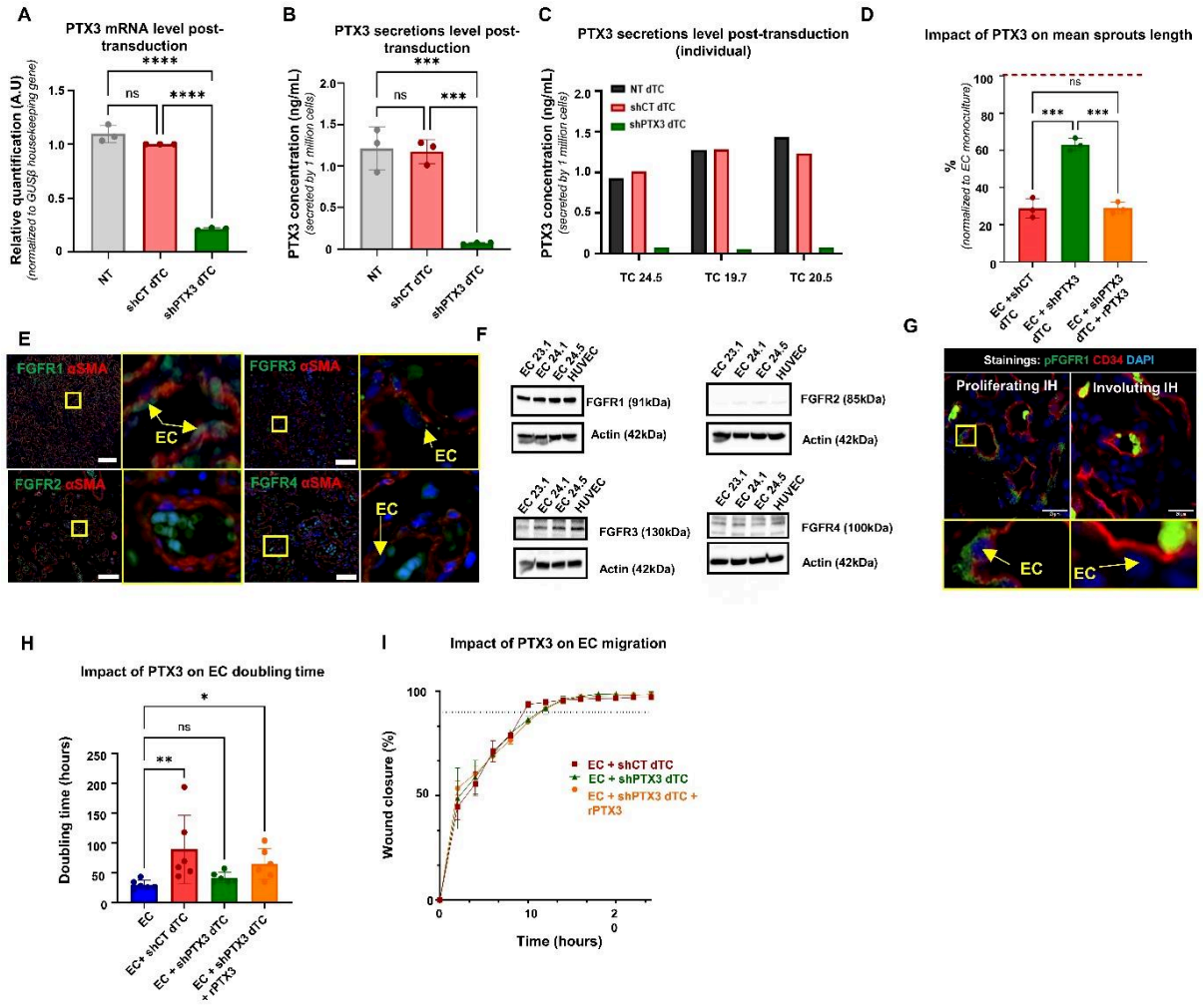


Figure S6: dTC-derived PTX3 inhibits FGF2-FGFR1 axis. ***A)*** *Evaluation of transduction and PTX3 depletion efficiency. Relative quantification of PTX3 mRNA level in non-transduced (NT), shCT or shPTX3-dTC, by qRT-PCR normalized on GUSβ housekeeping gene. N=3; N=3. Kruskal-Wallis test; α= 0.05; ns = not significant; p-value ≤ 0.0001 (****). **B-C)** Evaluation of transduction and PTX3 depletion efficiency. Quantification of PTX3 secretion in non-transduced (NT), shCT or shPTX3-dTC. n=3; N=3. Kruskal-Wallis test, α= 0.05; ns = not significant; p-value ≤ 0.001 (***). D) Quantification of mean EC sprout length in EC co-cultured 48 hours with shCT or shPTX3-dTC ± 10ng/mL of rPTX3. Red dotted line corresponds to EC monoculture (control). Kruskal-Wallis test; α= 0.05; ns = not significant; p-value ≤ 0.001 (***). **E)** Immunofluorescence of FGF receptors (FGFR1, FGFR2, FGFR3 and FGFR4, green), pericytes (αSMA, red) and nuclei (DAPI, blue) on FFPE IH sections. Yellow rectangles correspond to zoomed regions and yellow arrows point EC. Scale bar, 100µm **F)** Western blot of IH EC and HUVEC for FGF receptors. **G)** Immunofluorescence of proliferating (n=3) and involuting (n=3) IH, showing phosphorylated-FGFR1 (green), EC and TC (CD34, red) and nuclei (DAPI, blue). Yellow rectangles show zoomed regions and yellow arrows point EC. Scale bar, 20µm. H) Doubling time (hours) of EC cultured for 48 hours in complete medium or CM from shCT and shPTX3-dTC ± 10ng/mL of rPTX3. n=4; N=6. Kruskal-Wallis test, α= 0.05; ns = not significant; p-value ≤ 0.05 (*); p-value ≤ 0.01 (**). **I)** Wound closure of scratched EC cultured for 24 hours with CM from shCT or shPTX3-dTC ± 10ng/mL of rPTX3. Black dotted line corresponds to 90% of wound closure.*

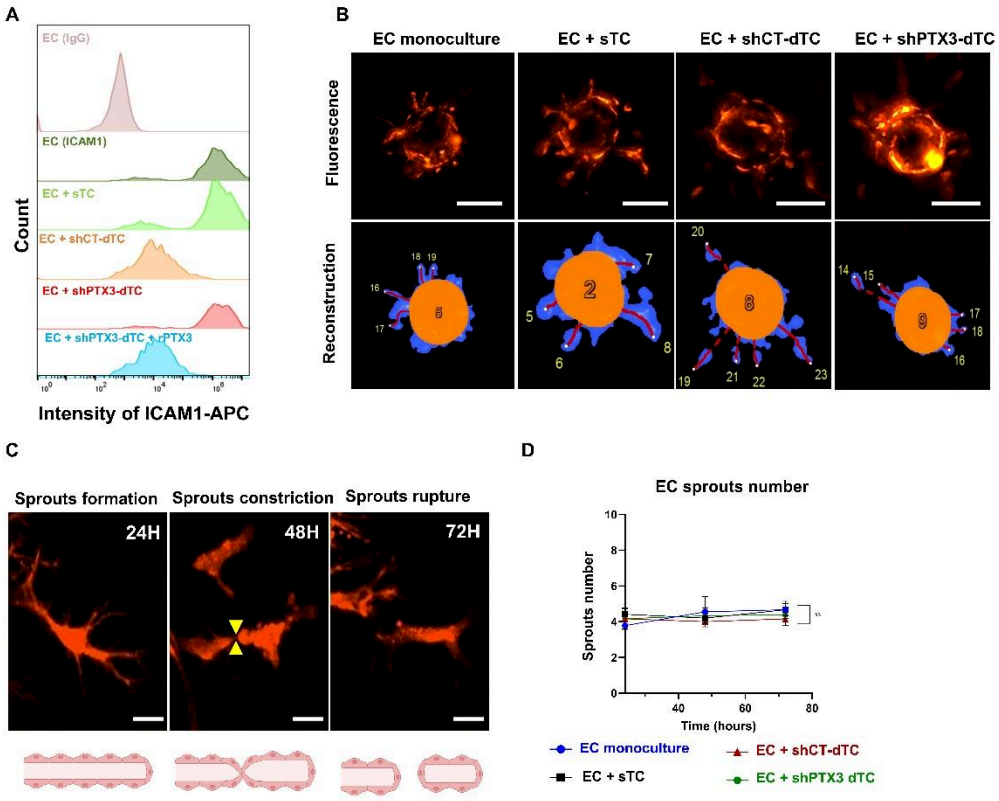


Figure S7: dTC-derived PTX3 participate in pruning of IH vasculature. ***A)*** *Histogram of ICAM1 surface staining in EC, measured by flow cytometry after 48 hours of culture in complete medium or in CM from sTC, shCT or shPTX3-dTC ± 10ng/mL of rPTX3.* ***B)*** *Representative images of sprout segmentation for quantifications. Continuous red lines indicate intact sprouts, while dotted red lines denote fragmented sprouts, blue-shaded area represents the total area (excluded from morphometric analysis) and orange circles correspond to the Cytodex3 bead cores.* ***C)*** *Confocal imaging of EC (Td-Tomato, red) sprouting and pruning dynamics. At 24h (prior to CM addition), sprouts elongate and display active tip cells with numerous filopodia. At 48 hours (24 hours after CM addition), sprouts begin to constrict, as shown by yellow arrowheads. At 72 hours, fragmented sprouts are observed. Maximum intensity projection of a 100µm z-stack. Scale bar, 20µm.* ***D)*** *Quantification of EC (Td-Tomato, red) sprout number during pruning assay. Kruskal-Wallis test; α= 0.05; ns = not significant.*

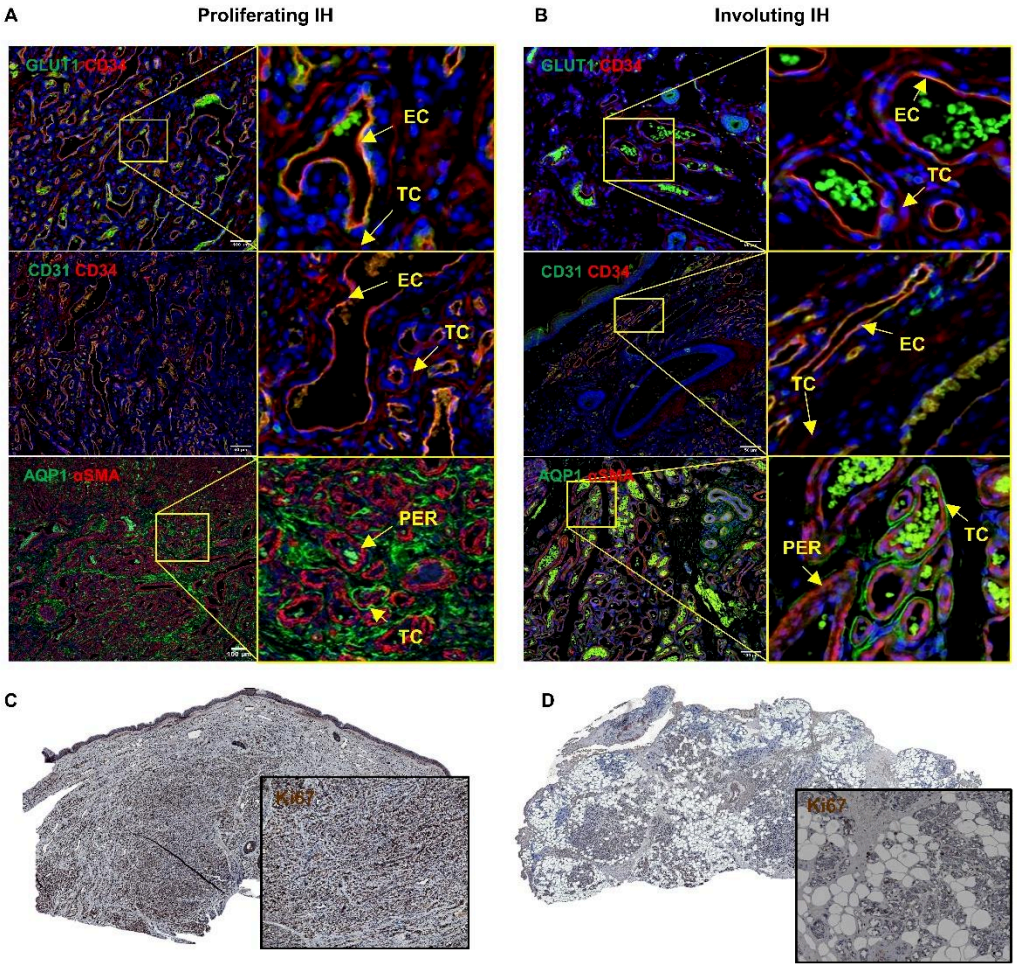


Figure S8: Clinical validation and classification of IH. ***A-B)*** *Immunofluorescence on FFPE proliferating (**A**) and involuting (**B**) IH sections showing routine immunophenotyping panel. Yellow rectangles highlight zoomed regions. Scale bar, 100µm.* ***C-D)*** *Immunohistochemistry on FFPE on proliferating (**C**) and involuting (**D**) IH section, showing Ki67.*

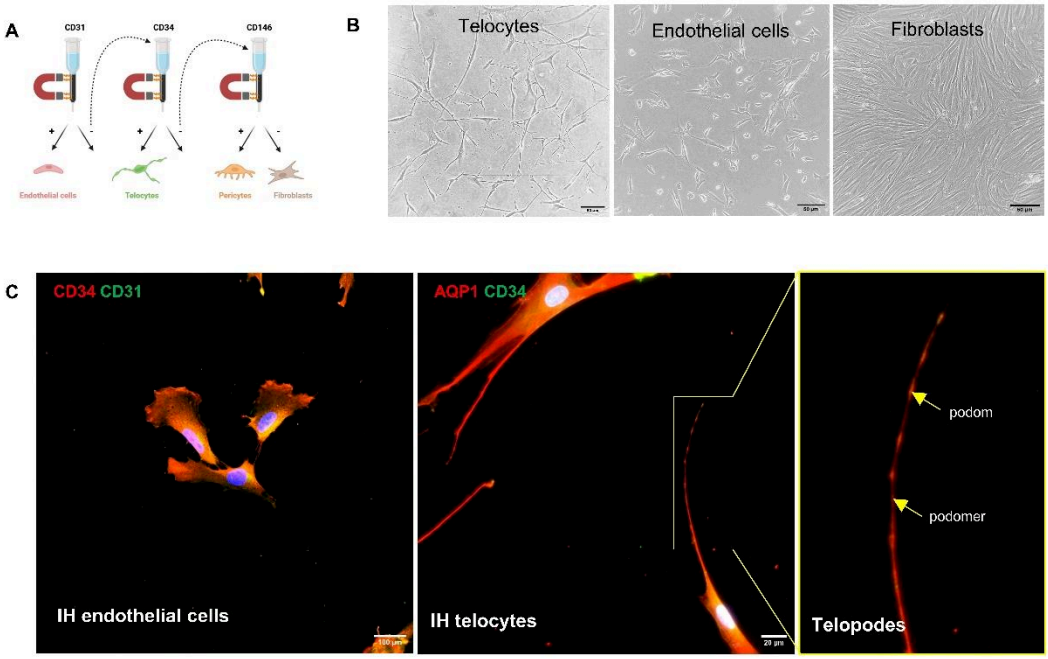


Figure S9: Cell extraction and enrichment. ***A)*** *Schematic representation of cell sorting methods using magnetic beads.* ***B)*** *Morphological validation of cell sorting. Brightfield of IH sorted cells in culture. TC are stellate cells, EC are elongated cells and fibroblasts are fusiform cells. Scale bar, 50µm.* ***C)*** *Molecular validation of cell sorting. EC are stained with CD34 (red) and CD31 (green) and TC are stained with AQP1 (red) and CD34 (green). Yellow rectangle shows a zoom on a moniliform telopode.*

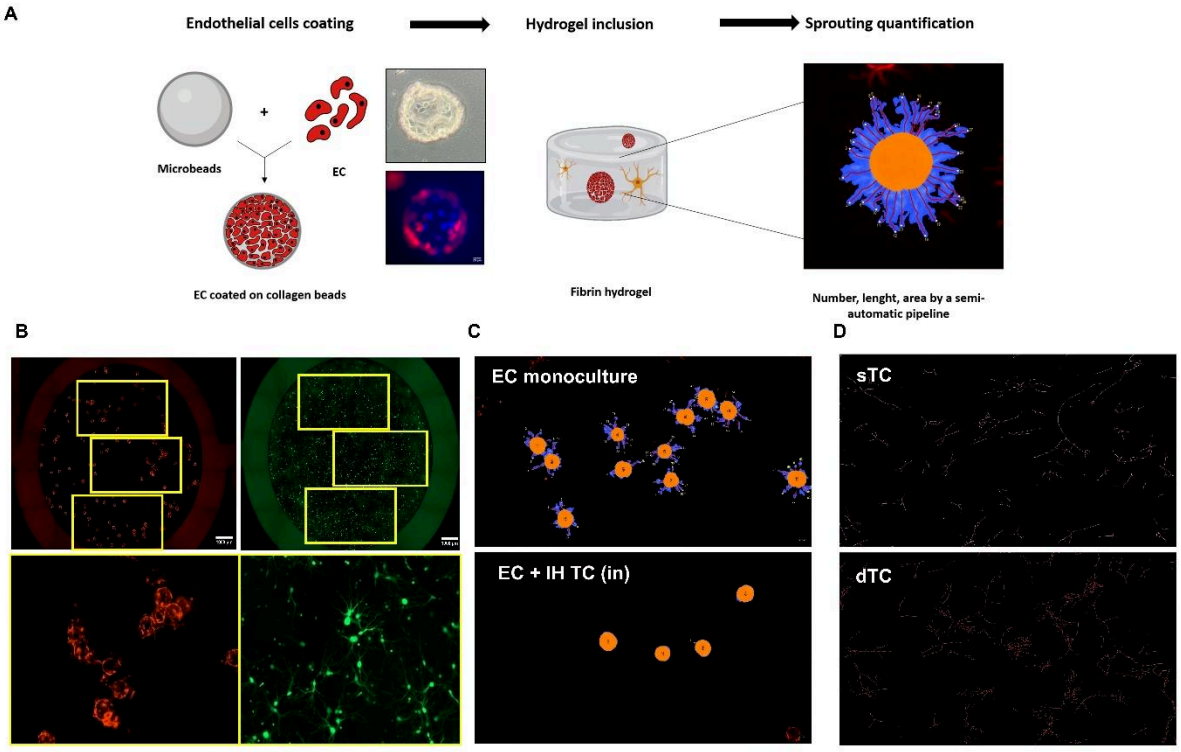


Figure S10: 3D sprouting models and quantification. ***A)*** *Schematic representation of the fibrin bead assay protocol used to generate endothelial sprouts. B) Imaging strategy used for large-scale and high-throughput acquisition of sprouting culture. Yellow rectangles indicate individual fields of view acquired per well. Scale bar, 1000µm. C) Workflow for sprout morphometric quantification using Wimsprouts algorithm. D) Quantification results for TC morphology using the Skeletonize plugin in ImageJ.*

Sample name	Gender	Age (months)	Histopathological status							Phase	Applications		
			EC					TC			ELISA	Imaging	*In vitro* assay
			CD31	CD34	GLUT1	AQP1	Ki67	CD34	AQP1				
HI 16.10	F	4	+	+	+	+	+	+	+	P	X		
HI 18.4	F	33	+	+	+	+	+	+	+	P	X		
HI 19.1	F	4	+	+	+	+	+	+	+	P	X		
HI 19.3	F	6	+	+	+	+	+	+	+	P	X		
HI 21.01	F	9	+	+	+	+	+	+	+	P	X		
HI 23.1	F	13	+	+	+	+	+	+	+	P		X	X
HI 23.8	F	10	+	+	+	+	+	+	+	P	X	X	
HI 24.1	F	31	+	+	+	+	+	+	+	P	X	X	X
HI 25.2	F	6	+	+	+	+	+	+	+	P	X		
HI 19.6	F	69	+	+	+	+	-	+	+	I	X		
HI 19.7	F	29	+	+	+	+	-	+	+	I	X		X
HI 19.8	M	56	+	+	+	+	-	+	+	I	X		X
HI 19.9	M	115	+	+	+	+	-	+	+	I	X		
HI 20.5	F	20	+	+	+	+	-	+	+	I	X		X
HI 20.7	F	3	+	+	+	+	-	+	+	I	X		
HI 22X2	F	112	+	+	+	+	-	+	+	I		X	
HI 22X4	F	55	+	+	+	+	-	+	+	I	X	X	
HI 23.3	F	46	+	+	+	+	-	+	+	I	X	X	
HI 23.4	M	33	+	+	+	+	-	+	+	I	X	X	X
HI 23.5	F	38	+	+	+	+	-	+	+	I	X	X	
HI 23.7	M	74	+	+	+	+	-	+	+	I	X	X	X
HI 24.5	F	36	+	+	+	+	-	+	+	I			X
HI 24.11	F	20	+	+	+	+	-	+	+	I	X	X	

Table S1: Clinical and histopathological characteristics of patients included in study

Target	Species	Applications	Dilutions	Manufacturer	Reference
Anti-αSMA	Mouse	FFPE IF	1:200	Abcam	Cat#AB7817; RRID: AB_262054
		Skin-iDISCO+	1:1 000		
Anti-αSMA	Rabbit	FFPE IF	1:500	Proteintech	Cat#80008-1-RR; RRID: AB_2882938
		Skin-iDISCO+	1:2 000		
Anti- Actin	Mouse	Western-blot	1:1 000	Santa Cruz	Cat#sc-58673
Anti- Akt	Rabbit	Western-blot	1:1 000	Cell Signaling	Cat#4691L
Anti-aquaporin 1	Mouse	Cell IF	1:100	Proteintech	Cat#66805-1-Ig; RRID: AB_2882148
Anti-aquaporin 1	Rabbit	FFPE IF	1:500	Merck Millipore	Cat#AB2219
		Skin-iDISCO+	1:1 000		
Anti-CD31	Rabbit	FFPE IF	1:500	Proteintech	Cat#11265-1-AP; RRID: AB_2299349
		Skin-iDISCO+	1:1 500		
Anti- CD31		Culture cell sorting	1:3	Milteniyi Biotec	Cat# 130-091-935
Anti-CD34	Mouse	FFPE IF	1:200	Fisher Scientific	Cat#MA110202
Anti-CD34	Mouse	Skin-iDISCO+	1:1 000	Proteintech	Cat#60180-2-Ig; RRID: AB_2881354
Anti-CD34		Culture cell sorting	1:3	Milteniyi Biotec	Cat#130-100-453
Anti-CD146		Culture cell sorting	1:3	Milteniyi Biotec	Cat# 130-093-596
Anti-collagen IV	Rabbit	FFPE IF	1:200	Abcam	Cat#ab6586
Anti- ERK 1/2	Mouse	Western-blot	1:5 000	Proteintech	Cat#66192-1-Ig
Anti-FGFR1	Mouse	Western-blot	1:3 000	Proteintech	Cat#60325-1-Ig ; RRID: AB_2881435
		FFPE IF	1:100		
Anti-FGFR2	Rabbit	Western-blot	1:5 000	Proteintech	Cat#84205-4RR ; RRID: AB_3671761
		FFPE IF	1:100		
Anti-FGFR3	Mouse	Western-blot	1:5 000	Proteintech	Cat#66954-1-Ig ; RRID: AB_2882277
		FFPE IF	1:100		
Anti-FGFR4	Rabbit	Western-blot	1:500	Proteintech	Cat#11098-1-AP ; RRID: AB_2103657
		FFPE IF	1:50		
Anti-GLUT1	Rabbit	FFPE IF	1:200	Proteintech	Cat#21829-1-AP; RRID: AB_10837075
Anti-ICAM1	Mouse	Skin-iDISCO+	1:1 000	Proteintech	Cat#60299-1-Ig; RRID: AB_2881414
Anti-ICAM1 APC IgG1	Mouse	FACS	1:50	Proteintech	Cat#APC-65075; RRID:AB_2882974
Anti-Ki67	Rabbit	FFPE IHC	1:1 000	Proteintech	Cat#27309-1-AP ; RRID : AB_2756525
Anti-pentraxin 3	Rabbit	FFPE IF	1:50	Proteintech	Cat#13797-1-AP ; RRID : AB_2165302
Anti-phospho Akt	Rabbit	Western-blot	1:1 000	Cell Signaling	Cat#9271L
Anti- phosphorylated ERK1/2	Rabbit	Western-blot	1:5 000	Proteintech	Cat#80031-1-RR
Anti-phosphorylated FGFR1	Rabbit	Western-blot	1:1 000	Cell Signaling	Cat#52928S
		FFPE IF	1:200		
Anti- VE-cadherin	Rabbit	Cell IF	1:200	Proteintech	Cat#27956-1-AP ; RRID:AB_2918136
Anti-rabbit Alexa 488 (H+L)	Goat	FFPE IF	1:500	Invitrogen	Cat#A11008
		Cell IF			
		Skin-iDISCO+			
Anti-mouse Alexa 568 (H+L)	Goat	FFPE IF	1:500	Invitrogen	Cat#A11011
		Cell IF			
		Skin-iDISCO+			
Anti-mouse HRP (H+L)	Horse	Western-blot	1:10 000	Vector Laboratories	Cat#PI-2000
Anti-rabbit HRP (H+L)	Goat	Western-blot	1:10 000	Vector Laboratories	Cat#PI-1000
Anti-rabbit HRP	Goat	FFPE IHC	Ready to use	Biotechne	Cat#VC003-025
DAPI		FFPE IF	1:10 000	Fisher Scientific	Cat# 2628274
		Cell IF			
TO-PRO3 iodide		Skin-iDISCO+	1:1 000	Fisher Scientific	Cat#T3605

Table S2: References, dilutions and applications of antibodies and dyes used in study.

Pentraxin-3 Forward primer	**5’ TGCGATTCTGTTTTGTGCTCT 3’**
Pentraxin-3 Reverse primer	**5’ GAGCTTGTCCCATTCCGAGT 3’**

Table S3: Sequences of primers used in study.

2. Effet anti-angiogénique de la nétrine-1 sécrétée par les télocytes au cours de la régression de l'hémangiome infantile

The axonal guidance factor netrin-1 secreted by telocytes drives anti-angiogenic and remodeling mechanisms during vascular regression in infantile hemangioma

PECHTIMALDJIAN Léa, ROUSSON Chloé*, IDRISSI Yamina, MATHIVET Thomas*, MOISAN François*.*

Article 3 : en préparation, co-auteure avec Chloé Rousson (stagiaire master 2 2025 co-encadrée par François Moisan et Thomas Mathivet). Expérimentations en cours.

Nos précédents travaux d'imagerie 3D ont mis en évidence que l'involution de l'HI ne résulte pas uniquement d'une raréfaction cellulaire, mais aussi d'un remodelage actif des vaisseaux, illustré notamment par le dépliement et la réorientation des structures vasculaires déjà établies. Au sein de ce processus, nous avons identifié le rôle majeur des TC présents dans l'HI (IH-TC), qui se distinguent par un phénotype paracrine particulier. En effet, nous avons précédemment montré que les IH-TC présentent des propriétés anti-angiogéniques, capables d'induire du *pruning* endothélial et de limiter la formation de nouvelles structures vasculaires. Cependant, bien que leur contribution au *pruning* soit clairement établie, les mécanismes par lesquels les IH-TC contribuent au réarrangement spatial des vaisseaux persistants restent peu compris. Cette observation suggère l'existence de médiateurs supplémentaires, impliqués dans la coordination du remodelage.

Dans ce contexte, notre attention s'est portée sur la nétrine-1 (NTN1), molécule initialement décrite comme facteur de guidage axonal, mais dont les fonctions vasculaires sont reconnues[454]. À partir d'un screening personnalisé, nous avons identifié que les IH-TC surexpriment NTN1. Les EC expriment son récepteur principal UNC5B, connu pour agir comme frein au bourgeonnement endothélial et au guidage de la migration des vaisseaux[455]. Cette observation suggère l'existence d'un dialogue paracrine spécifique entre TC et endothélium, faisant de la NTN1 un candidat privilégié pour expliquer les propriétés anti-angiogéniques et remodelantes des IH-TC.

MATERIEL ET METHODES

Culture cellulaire

Les cellules endothéliales de veine ombilicale humaine (HUVEC, PCS-100-013, ATCC) ont été cultivées dans du milieu *Endothelial Cell Growth Medium II* (ECGM2, C-22011, PromoCell). Les TC isolés d'HI (IH TC) ou de prépuces (Ctl TC), ainsi que les cellules endothéliales porcines d'artères (PAEC, généreusement fournies par B. Larrivée [455]), ont été cultivées dans du *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* à haute teneur en glucose (DMEM, Gibco), supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF, Fisher Scientific). Tous les milieux de culture sont complémentés avec 1% de pénicilline-streptomycine (Millipore Sigma). Les cultures ont été contrôlées toutes les deux semaines pour l'absence de contamination aux mycoplasmes par qPCR. Les milieux conditionnés de TC ont été obtenus en cultivant $1x10^6$ cellules dans de l'EGM-2 dépourvu de facteurs de croissance, supplémenté avec 1% de SVF pendant 48 heures.

Transduction Td-Tomato

$1x10^5$ TC ou HUVEC sont ensemencés dans des plaques 6 puits pendant une nuit dans le milieu approprié. Le jour suivant, les suspensions lentivirales sont diluées en milieux cellulaires à la *Multiplicity of Infection* (MOI) optimale et sont incubées 6 heures.

Extraction d'ARN

Les TC de flasques T75 sont décollés, culottés et conservées à -80°C. L'ARN des culots est extrait via le kit NucleoSpin RNA (Macherey Nagel) selon les recommandations du constructeur. L'ARN est conservé à -80°C.

qRT-Polymerase Chain Reaction (PCR)

500ng d'ARN est rétro-transcrit en ADNc grâce au kit Prime Script RT Master Mix (Takara) selon les recommandations du fabricant. Un contrôle sans rétrotranscriptase est inclus afin de confirmer la qualité de l'extraction d'ARN et l'absence d'ADN génomique. Les PCR sont réalisées avec le kit Brilliant III Ultra-Fast SYBR Green qRT-PCR master mix (Agilent) selon les recommandations du fabricant et le thermocycleur Bio-Rad CFX. Se référer au **Tableau 4** pour la séquence des primers.

Cible	Séquences
Pentraxine-3	F : **5' TGCGATTCTGTTTTGTGCTCT 3'** R : **5' GAGCTTGTCCCATTCCGAGT 3'**
ANGPTL-4	F : **5' CTGAGGTCCTTCACAGCCTG 3'** R : **5' TCTAGGTGCTTGTGTGGTCCAG 3'**
Fibulin-1	F : **5' CATATCTGAATGACCGCTGC 3'** R : **5' CATCTTCACAGGAGACACCA 3'**
FLT-1 (variant 1, 2, 3)	F: **5' TTCCGAAGCAAGGTGTGACTT 3'** R: **5' TCAGCCACAACCAAGGTGC 3'**
GUSβ	F: **5' GTTTCACCAGGATCCACCTC 3'** R: **5' CTCGTCGGTGACTGTTCAGT 3'**
IGFBP-3	F: **5' GCCAGCTCCAGGAAATGCT 3'** R: **5' GGGGTGGAACTTGGGATCAG 3'**
IL-2	F: **5' AGAACTCAAACCTCTGGAGGAAG 3'** R: **5' GCTGTCTCATCAGCATATTCACAC 3'**
IL-10	F: **5' TCTCCGAGATGCCTTCAGCAGA 3'** R: **5' TCAGACAAGGCTTGGCAACCCA 3'**
NTN1	F: **5' AAACCTGCAACCAAACCACC 3'** R: **5' CAGTAGGAATCGCAGTCTTCA 3'**
NTN4	F: **5' AGGCATCAGGGAATCGTAGTG 3'** R: **5' CAAGGGCAGTCACCATTGCT 3'**
Robo4	F: **5' CACCTGCTGAAAACCACAATGGC 3'** R: **5' CTGCTCACCAACTACAGTCCAG 3'**
Sema-3a	F: **5' GTTGCCCAGCTCCCTTTACA 3'** R: **5' TGTCGTCTTGTGCGTCTCTT 3'**
Sema-3f	F: **5' CGCGAGCCCTCATTATACA 3'** R: **5' TGACGAAGTTCCCACACTCG 3'**
sFLT1 (variant 2)	F: **5' TCATCACTCCTAAGCTGCCT 3'** R: **5' CACCCTCCCAAGTCATTCCT 3'**
TGFβ-1	F: **5' TACCTGAACCCGTGTTGCTCTC 3'** R: **5' GTTGCTGAGGTATCGCCAGGAA 3'**
TIMP-1	F: **5' GCAATTCCGACCTCGTCATC 3'** R: **5' GTTGTGGGACCTGTGGAAGT 3'**
TSP-1	F: **5' AGACTCCGCATCGCAAAGG 3'** R: **5' TCACCACGTTGTTGTCAAGGG 3'**
VEGFR1 (variant 1)	F: **5' GCAAAGCCACCAACCAGAAG 3'** R: **5' GACTTGTCCGAGGTTCCTTGA 3'**
VEGFR2	F: **5' CAAGTGGCTAAGGGCATGGA 3'**R: **5' ATTTCAAAGGGAGGCGAGCA 3'**

Tableau 4: Séquences des primers du screening personnalisé de qPCR

Test d'attraction/répulsion

$1x10^5$ PAEC surexprimant UNC5B-GFP sont ensemencées en chambres de culture adaptées à l'imagerie (94.6150.401, Starstedt). Les cellules sont cultivées 24 heures afin de former un tapis cellulaire cohésif et homogène. $5x10^3$ Ctl- ou IH TC sont ensemencés par-dessus. Les milieux sont complémentés ou non avec 1µg/mL d'anticorps anti-NTN1 (AF1109, R&D). Après 24 heures de coculture, les cellules sont fixées 10 minutes en paraformaldéhyde 4%. Les cultures sont imagées avec un microscope à épifluorescence (Revolution, Echo). 4 champs par puit sont acquis (grossissement 10X). Le pourcentage de chevauchement entre les PAEC UNC5B-GFP et les TC Td-Tomato est quantifié via le logiciel ImageJ.

Test de migration en transwell

$5x10^3$ Ctl- ou IH TC sont ensemencés en plaque 24 puits dans du milieu DMEM complet. Le lendemain, $2,5x10^4$ PAEC surexprimant UNC5B sont ensemencées sur des membranes d'insert perforées de pores de 8µm (ref : 353097, Merck), puis ajoutées au-dessus des TC. Les milieux ont été remplacés par de l'ECGM2 complet avec ou sans anticorps bloquant anti-NTN1 (1µg/mL, R&D Systems). Après 24 heures

de coculture, les cellules sont fixées 10 minutes au paraformaldéhyde 4%. Les cellules ayant migrées, localisées sur la phase interne de la membrane du transwell sont contre-colorées au 4', -'-diamino-2-phénylindole (DAPI) et imagées par un microscope à épifluorescence (Revolution, Echo). Quatre champs par condition sont acquis (grossissement 10X) et le nombre de noyau est quantifié sur ImageJ.

Test de perméabilité en transwell

Des inserts transwell 6 puits à membrane de 0.4µm (ref :353090, Merck) ont été utilisés. $5x10^5$ HUVEC ont été ensemencées en milieu ECGM2 et cultivées jusqu'à l'obtention d'un tapis cellulaire homogène. En parallèle, $1x10^5$ Ctl- ou IH-TC ont été ensemencés dans une plaque 6 puits séparée, dans du DMEM high glucose + 10% de SVF. Les cultures ont été ensuite mises en coculture pendant 24 heures dans du milieu ECGM2 avec ou sans anticorps bloquant dirigé contre la nétrine 1 (1µg/mL, R&D System, AF1109), ajouté dans les deux compartiments. Une solution de FITC-dextran (40kDa) a été préparée à 1mg/mL dans le même milieu puis ajouté dans la chambre supérieure (1,5mL/insert). Des aliquots de 100µL de la chambre inférieure sont prélevés à 5,10,15,30 et 60 minutes. L'absorbance des milieux est mesurée au spectrophotomètre à 520nm et est proportionnelle à la quantité de dextran ayant diffusé de la chambre supérieure à la chambre inférieure.

Immunohistofluorescence

Les coupes de paraffine de tissus de patients sont déparaffinées, réhydratées puis démasquées par tampon citrate, pendant 30 minutes à 95°C à l'aide de l'automate PT-Link ® (Dako, Agilent). Les sections sont incubées toute la nuit à 4°C avec les anticorps primaires (**Tableau 5**). Le lendemain, elles sont incubées 1 heure à température ambiante avec des anticorps secondaires conjugués aux fluorochromes Alexa (**Tableau 5**). Les noyaux sont contre-colorés au DAPI pendant 10 minutes. Les marquages sont observés à l'aide du logiciel NIS-Elements (Nikon) couplé à un microscope à épifluorescence Leica. Les images sont traitées à l'aide du logiciel ImageJ.

Cible	Espèce	Vendeur	Référence	Dilution
Aquaporin-1	Souris	Proteintech	Cat#66805-1-Ig	1 :100
CD31	Rabbit	Proteintech	Cat#11265-1-AP	1 :200
NTN1	Lapin	Proteintech	Cat#20235-1-AP	1 :200
NTN1	Chèvre	R&D Systems	Cat#AF1109	1 :100
Anti-chèvre Alexa 488	Poulet	Invitrogen	Cat#A21467	1 :500
Anti-souris Alexa 488	Âne	Invitrogen	Cat#A10037	1 :500
Anti-souris Alexa 568	Chèvre	Invitrogen	Cat#A11004	1 :500
Anti-lapin Alexa 488	Chèvre	Invitrogen	Cat#A11008	1 :500
Anti-lapin Alexa 647	Âne	Invitrogen	Cat#A31573	1 :500

Tableau 5: Références des anticorps d'immunohistofluorescence

Test de bourgeonnement

Les HUVEC Td-Tomato ont été coatées sur des microbilles Cytodex3 (Cytiva) à une densité de 400 cellules par bille dans des tubes de cytométrie en flux. Les tubes sont remués toutes les 20 minutes pendant 4 heures pour éviter la sédimentation des cellules, puis incubés sur la nuit à 37°C et 5% de CO_2. Les billes recouvertes d'HUVEC sont re suspendu dans une solution de 2.5mg/mL de fibrinogène (ref : F8630, Sigma), complémenté avec 50µg/mL d'aprotinine (ref : A3428, Sigma). Le fibrinogène est polymérisé en fibrine par l'addition de 25U/mL de thrombine (ref : T4648, Sigma). Les hydrogels sont immergés dans du milieu ECGM2 pure ou dilué à 50% des milieux conditionnés des TC, avec ou sans anticorps bloquant anti-NTN1 (1µg/mL). Après 72 heures de culture, les modèles sont imagés en 3D par le microscope à épifluorescence Cell Discoverer 7 (Zeiss), (z-stack = 300µm, objective = 5X, zoom = 0.5). Les images sont déconvoluées avec le logiciel ZEN blue (Zeiss). La longueur moyenne et totale ainsi que le nombre de bourgeons endothéliaux sont mesurées avec l'algorithme Wimsprout (Wimasis, Onimagin Technologies).

Analyses statistiques

La normalité des données a été testée avec le test de Shapiro-Wilk. L'homoscédasticité a été vérifiée par le test de Fisher. Les données suivants une distribution gaussienne ont été analysées à l'aide de tests paramétriques (Test t de Student ou ANOVA). Les données ne suivant pas la normalité ont été analysées avec des tests non paramétriques (tests de Mann-Whitney ou de Kruskall-Wallis). Les ANOVA et les tests de Kruskall-Wallis ont été combinés avec le test de comparaison multiple de Tukey. En cas d'inégalité des variances une correction de Welch a été appliquée. Un seuil de significativité de $p<0.05$ (indiqué par *) a été considéré comme significatif. Les résultats sont présentés en moyenne ± erreur standard de la moyenne (SEM).

Les TC d'HI surexpriment la NTN1 et les EC d'HI expriment son récepteur principal UNC5B

Partant du phénotype paracrine anti-angiogénique robuste des IH-TC et considérant que tous les médiateurs impliqués n'ont pas été identifiés, nous avons développé un screening personnalisé par qRT-PCR composé d'un panel de gènes anti-angiogéniques récurrents. Les cibles ont été à la fois choisies selon la littérature scientifique et selon les résultats du *Proteome Profiler* présenté préalablement dans les résultats (**Résultats, partie 2.1**). Elles regroupent des acteurs du remodelage matriciel (TIMP-1, Fibuline-1 et TSP-1), de la signalisation des facteurs de croissance (VEGFR1, TGFβ-1), des protéines pièges (IGFBP-3, sFLT1, angiopoietine-like-4) et des molécules de guidage axonal (NTN1 et nétrine-4, sémaphorines-3a et -3f ainsi que Robo-4). Parmi les 13 cibles criblées, IGFBP-3 (fold-change = 4) et NTN1 (fold-change = 12) sont significativement surexprimées par les IH-TC par rapport aux Ctl-TC (**Figure 70A, B**). De façon surprenante, l'expression de sFLT1 est perdue dans les IH-TC par apport aux Ctl-TC. Compte tenu de sa forte significativité, de ses rôles établis dans le guidage axonal ainsi que de son implication dans la régulation de l'angiogenèse, NTN1 a été retenue comme candidate prioritaire. Les analyses histologiques réalisées sur des prépuces et des résections d'HI montrent en effet que seuls les TC $AQP1^+$ d'HI sont positifs pour NTN1, contrairement aux TC $CD34^+$ de prépuce (**Figure 70C**). Le marquage NTN1 extra-cellulaire semble même s'accumuler dans la région basale de l'endothélium, ce qui pourrait être associé à son immobilisation à la surface des EC ou à son accumulation dans la MEC périvasculaire, comme montré dans le rectangle rouge.

Dans le compartiment endothélial, UNC5B est le seul récepteur canonique de la nétrine, à être exprimé[161]. Nous avons donc évalué son expression dans la micro-vascularisation cutanée physiologique et pathologique. Nos données indiquent que les EC de prépuce et d'HI expriment toutes deux UNC5B, avec une intensité plus forte dans l'HI (**Figure 70D**). Ensemble, ces résultats suggèrent que la NTN1 sécrétée par les IH-TC pourrait exercer un effet biologique paracrine sur les EC $UNC5B^+$ sensibles à ce signal.

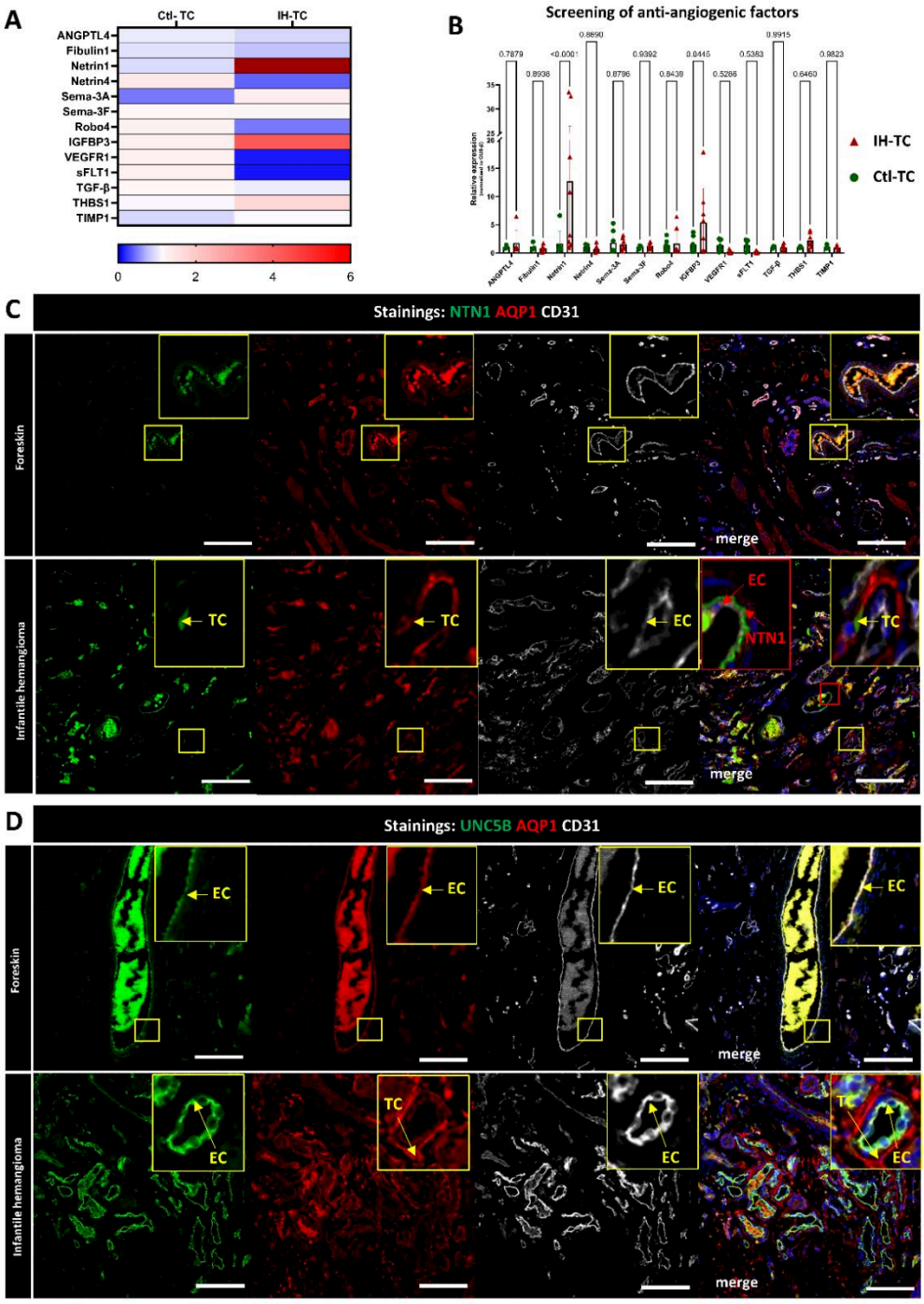


Figure 70: Les IH-TC surexpriment la NTN1 et les EC cutanées expriment son récepteur UNC5B

A-B) Résultats du screnning personnalisé de qRT-PCR. Les quantifications relatives ont été calculées après normalisation interne vis-à-vis du gène de ménage GUS-β et vis-à-vis des Ctl-TC *($2^{-\Delta\Delta Ct}$). Two-way ANOVA et test de Tukey; α=0.05.* ***C)*** *Immunohistofluorescence de peau physiologique (prépuce) ou d'hémangiome infantile révélant la NTN1 (vert), l'AQP1 (rouge, spécifique des EC de la peau physiologique et des TC de la peau d'HI), CD31 (blanc). Les rectangles correspondent aux zones zoomées. Les flèches pointent les TC ou EC. Barre d'échelle = 100µm. Acquisition par microscopie à épifluorescence.* ***D)*** *Immunohistofluorescence de peau physiologique (prépuce) ou d'hémangiome infantile, révélant UNC5B (vert), AQP1 (rouge) et CD31 (blanc). Les rectangles correspondent aux zones zoomées. Les flèches pointent les TC ou EC. Barre d'échelle = 100µm.*

La NTN1 des TC d'HI à un effet répulsif et déstructurant sur les EC.

Compte tenu du rôle majoritairement répulsif de NTN1 via son récepteur UNC5B rapporté dans l'endothélium, nous avons cherché à déterminer si les IH-TC, par leur sécrétion de NTN1, étaient capables de repousser les EC.

Pour évaluer cet effet et en raison de la difficulté d'obtenir un nombre suffisant d'EC d'HI, nous avons utilisé des PAEC (*Porcine Aortic endothelial cell*) comme modèle endothélial. Ces cellules présentent un répertoire limité de récepteurs angiogéniques, ce qui réduit les interférences liées à d'autres voies. Dans ce contexte, la surexpression d'UNC5B permet de se concentrer sur l'axe NTN1/UNC5B et d'analyser ses effets biologiques. Dans un premier temps, nous avons déposé des Ctl-TC ou IH-TC sur une monocouche homogène de PAEC afin d'évaluer si les IH-TC peuvent induire une désorganisation du tapis cellulaire. Après 24 heures, la présence d'IH-TC entraîne une rétractation des PAEC, mise en évidence par l'apparition de lacunes cellulaires et par une diminution d'un facteur 3 du chevauchement des IH-TC avec les EC, par rapport aux Ctl-TC (**Figure 71A, B**). Cet effet dépend de la sécrétion de NTN1, puisqu'un anticorps bloquant dirigé contre la NTN1 réduit significativement la répulsion exercée par les IH-TC. Le chevauchement retrouve en effet, des valeurs proches de celles observées avec les Ctl-TC. Ces observations sont corroborées par une approche de migration en transwell où les EC sont ensemencées dans la chambre supérieure et les TC dans la chambre inférieure. En présence d'IH-TC, les EC migrent deux fois moins vers la chambre inférieure. Là encore, l'ajout de l'anticorps bloquant anti-NTN1 restaure la migration des EC (**Figure 71C, D**). Nos résultats montrent aussi que la sécrétion de NTN1 par les IH-TC favorise la perméabilité vasculaire. En effet, en coculture transwell (**Figure 71E**), les IH-TC induisent une augmentation significativement marquée de la fuite de dextran à travers la monocouche endothéliale. Cet effet est inhibé par l'ajout d'un anticorps bloquant dirigé contre NTN1 (**Figure 71F**).

Ainsi, nos résultats démontrent que les EC exprimant UNC5B réagissent spécifiquement à la sécrétion de NTN1 par les IH-TC. Cette répulsion constitue un mécanisme susceptible d'affecter directement l'angiogenèse et l'organisation du réseau endothélial.

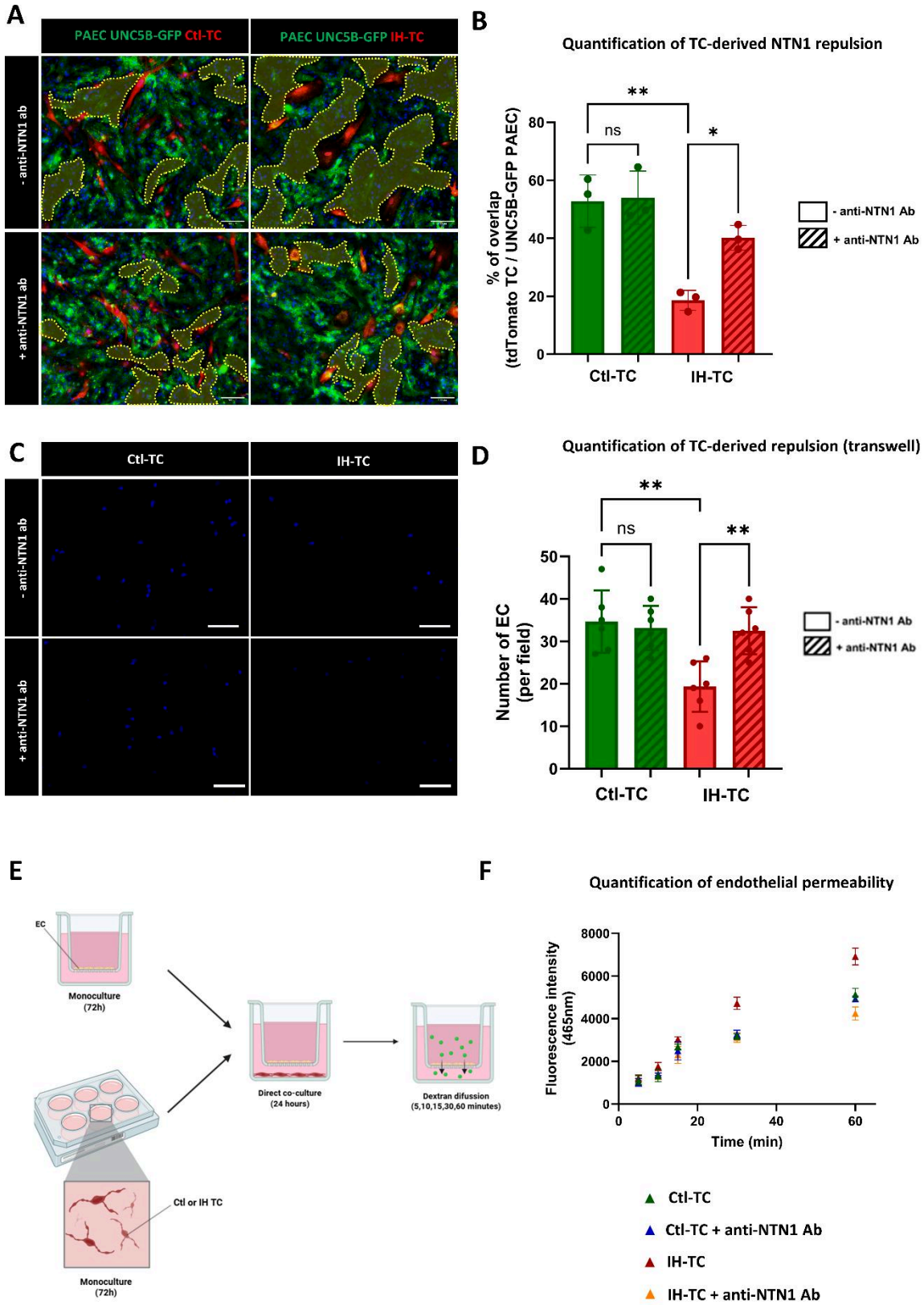


Figure 71: La NTN1 dérivée d'IH-TC repoussent les EC

***A**) Coculture de PAEC surexprimant UNC5B (GFP, vert) et des Ctl- ou IH-TC (Td-Tomato, rouge) ± 1µg/mL d'anticorps bloquant anti-NTN1. Les zones détourées en jaune correspondent aux lacunes cellulaires. Barre d'échelle= 100µm. Images acquises au microscope à épifluorescence **B**) Quantification des zones de chevauchement entre PAEC et Ctl- ou IH-TC montrée en (A). Les conditions hachurées correspondent aux conditions complémentées avec l'anticorps bloquant anti-NTN1. n=2, N=3. Test de Kruskal-Wallis + test de Tukey ; α = 0.05 ; ns = non significatif ; ** p<0.01 ; * p<0.05. **C**) Test de migration en transwell d'HUVEC co-cultivées avec des Ctl- ou IH-TC ± 1µg/mL d'anticorps bloquant anti-NTN1. Les noyaux sont révélés au DAPI (bleu). Barre d'échelle = 100µm. Images acquises au microscope à épifluorescence. **D**) Quantification du nombre de noyaux/ cellules ayant migré du compartiment supérieur à inférieur des images montrées en (C). Les conditions hachurées correspondent aux conditions complémentées avec l'anticorps bloquant anti-NTN1. n=2, N=3. Test de Kruskal-Wallis et test de Tukey ; α= 0.05 ; ns = non significatif ; **p < 0.01. **E**) Schématisation de la procédure de test de perméabilité. **F**) Quantification de l'absorbance du surnageant cellulaire à 465nm (FITC-Dextran). Les HUVEC ont été co-cultivées avec des Ctl- ou IH-TC ±1µg/mL d'anticorps bloquant anti-NTN1. n=3, N=2.*

La NTN1 dérivée des TC d'HI est anti-angiogénique

Puisque la sécrétion de NTN1 par les IH-TC induit à la fois une répulsion des EC et une augmentation de leur perméabilité, nous avons cherché à déterminer si ces effets pouvaient se traduire par une modulation directe de l'angiogenèse. Nous avons ensuite évalué l'impact de la sécrétion de NTN1 par les IH-TC en modèle de bourgeonnement endothélial. Après 72 heures de coculture, nos résultats confirment leur effet anti-angiogénique, se traduisant par une réduction marquée du bourgeonnement des EC (**Figure 72A**). De manière intéressante, l'ajout d'un anticorps bloquant anti-NT1 atténue cet effet, comme en témoigne l'augmentation d'un facteur 4 de la longueur totale du réseau de bourgeons (**Figure 72B**), associée à une augmentation significative de leur nombre (**Figure 72C**) et de leur longueur moyenne (**Figure 72D**).

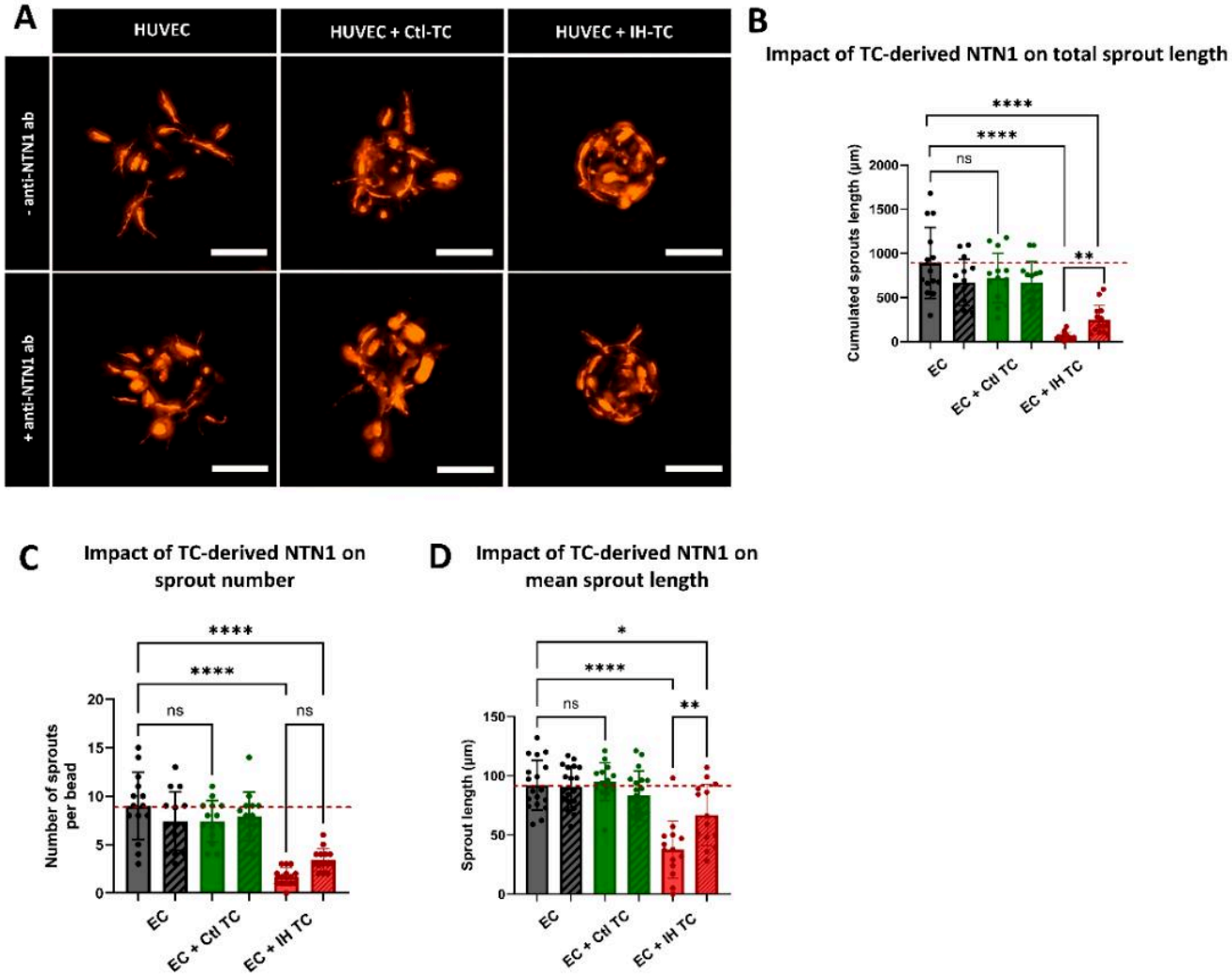


Figure 72: La NTN1 dérivée d'IH TC est anti-angiogénique

***A**) Bourgeonnements d'HUVEC (Td-Tomato, rouge) cultivées dans du surnageant de Ctl- ou IH-TC ± 1µg/mL d'anticorps bloquant anti-NTN1. Les images ont été acquises par le microscope à épifluorescence CD7 en vue large (z-stack = 300µm, grossissement = 5X, zoom = 0.5) et déconvoluées. Projection des intensité maximales. Barre d'échelle = 100µm. **B-D**) Quantification des paramètres morphométriques du bourgeonnement : longueur totale du réseau de bourgeons (B), nombre moyen de bourgeon par bille (C) et longueur moyenne des bourgeons endothéliaux (D). Les conditions hachurées correspondent aux conditions complémentées avec l'anticorps bloquant anti-NTN1. Les lignes en pointillées rouges marquent les paramètres basaux des HUVEC sans TC ou anticorps. n=3,N=3. Test de Krustal-Wallis et de Tukey ; α=0.05 ; ns= non significatif ; *p<0.05 ; **p<0.01 ; ***p<0.001 et ****p<0.0001.*

DISCUSSION

Nos résultats de screening ont identifié la NTN1 comme un facteur fortement exprimé par les IH-TC. Les analyses histologiques confirment, en parallèle, que les EC d'HI expriment son récepteur principal UNC5B avec une intensité élevée par rapport aux tissus sains. Cette organisation suggère l'existence d'un dialogue paracrine spécifique entre IH-TC et endothélium. Bien que NTN1 ait initialement été décrite comme molécule de guidage axonal, son rôle vasculaire a progressivement émergé, principalement via l'activation d'UNC5B. Ce récepteur a été identifié comme un frein au bourgeonnement angiogénique, en limitant la migration et l'invasion des tip cells[455]. Dans ce contexte, la forte induction de NTN1 par les IH-TC représente un mécanisme plausible favorisant leur phénotype paracrine anti-angiogénique.

Nous montrons en effet que la sécrétion de NTN1 par les IH-TC exerce un effet répulsif sur les EC, se traduisant par une rétraction cellulaire et une désorganisation du tapis endothélial. Ces observations sont cohérentes avec les propriétés répulsives de l'axe NTN1/UNC5B, qui pourrait impliquer une réorganisation du cytosquelette d'actine par activation de RhoA/ROCK (contraction) et inhibition de Rac1 et Cdc42 (rétractation), un phénomène déjà observé avec UNC5A, un autre membre de la famille UNC5[456]. Par conséquent la migration endothéliale est restreinte. Toutefois, cet effet anti-migratoire contraste avec nos observations antérieures, où nous avions rapporté que les IH-TC stimulent la migration endothéliale en modèle de scratch assay. Plusieurs hypothèses pourraient expliquer en partie l'effet répulsif de NTN1 : (i) les IH-TC sécrètent probablement d'autres facteurs pro-migratoires capables de compenser en partie l'effet de NTN1 comme IGFBP-3 ; (ii) NTN1 pourrait en fait stimuler la migration via un récepteur non canonique, CD146, fortement exprimé par les EC d'HI[161]. En effet, la liaison de NTN1 sur CD146, un corécepteur du VEGFR2, permettrait d'augmenter la signalisation VEGF-dépendante et l'activation de p38 qui est clé dans la migration cellulaire.

Dans ce cas, l'effet de NTN1 pourrait dépendre de l'équilibre entre UNC5B (anti-migratoire) et CD146 (pro-migratoire). Dans ce contexte, il est important de souligner une limite de notre approche expérimentale. Nous avons utilisé un modèle cellulaire dans lequel seul UNC5B est exprimé, et même surexprimé (PAEC-UNC5B), ce qui biaise le système en favorisant la voie anti-migratoire. Ce choix nous a permis de confirmer l'effet biologique canonique de la sécrétion de NTN1 par les TC, mais ne permet pas d'explorer de façon équilibrée l'axe alternatif NTN1/CD146. Or, dans une situation « d'HI authentique », il n'est pas possible à ce jour de prédire a priori quel récepteur prendrait le dessus fonctionnellement et dans quel contexte.

Des expériences complémentaires en scratch assay sur les EC d'HI ou PAEC surexprimant à la fois UNC5B et CD146 avec ou sans blocage de NTN1 seront nécessaires pour préciser ces mécanismes.

D'autres approches plus complexes sur puces (microfluidique) ou de micropatterning sont aussi envisageables. Combiné à de la microscopie en LIVE, l'imagerie de la polymérisation du cytosquelette d'actine pourrait permettre d'observer une attraction (formation de filopode) ou une répulsion (dépolymérisation).

Au-delà de la répulsion, nous montrons que la sécrétion de NTN1 augmente la perméabilité endothéliale. Ce phénomène reflète l'ouverture des jonctions intercellulaires, possible via une déstabilisation de la VE-cadhérine. La littérature décrit NTN1 comme un modulateur contextuel de l'intégrité vasculaire. Elle est protectrice au niveau de la barrière hémato-encéphalique mais est délétère dans les rétinopathies diabétiques[457,458]. L'inhibition de la GTPase Rac1 par UNC5B qui stabilise les jonctions adhérentes pourrait en être la conséquence. Aussi, l'activation de la voie du VEGFR2 par CD146 pourrait induire la phosphorylation et l'internalisation des jonctions. Dans notre modèle, l'augmentation de la perméabilité traduit une activation endothéliale, qui s'accompagne d'une angiogenèse non fonctionnelle. En effet, nos résultats montrent que NTN1 exerce un effet anti-angiogénique direct en test de bourgeonnement endothélial, réduisant significativement le nombre et la longueur des bourgeons. L'inhibition du bourgeonnement concorde avec le rôle d'UNC5B comme frein à l'angiogenèse, en diminuant la signalisation du VEGF et la progression des tip cells[455,459]. Cet effet est partiellement réversible par un anticorps neutralisant anti-NTN1, suggérant que NTN1 contribue au phénotype anti-angiogénique des IH-TC.
Dans une vision globale, nos résultats renforcent l'idée que les IH-TC possèdent une signature moléculaire multiple et anti-angiogénique qui limite la formation de nouveaux vaisseaux. En parallèle, leur profil pro-migratoire suggère qu'ils participent au remodelage des structures vasculaires déjà établies. Au-delà d'un rôle passif, les IH-TC apparaissent comme de véritables cellules guides et coordinatrices, capables d'orienter le comportement endothélial via la sécrétion de molécules de guidance. NTN1 illustre bien ce mécanisme : son effet répulsif, combiné à l'action probable d'autres facteurs, pourrait favoriser un remodelage orienté et une réorganisation du réseau vasculaire (**Figure 73**).

Ce travail, encore en cours de construction, nécessite d'être consolidé par des expériences complémentaires. Tout d'abord, la quantification de la sécrétion de NTN1 par les IH-TC reste un point clé à approfondir. Les tests ELISA commerciaux que nous avons utilisés se sont révélés peu satisfaisants, possiblement en raison d'une faible abondance protéique. Il n'est pas surprenant de détecter de faibles niveaux globaux de NTN1. En effet, pour guider les cellules, NTN1 doit être distribué de manière localisée et stratégique, plutôt qu'homogène. Cette organisation spatiale implique des concentrations globalement basses, par exemple dans un surnageant cellulaire, ce qui peut ne pas être

compatible avec des approches classiques. Le développement ou l'optimisation de méthodes de détection plus sensibles (Luminex) seraient nécessaires pour confirmer la production de NTN1 et pour obtenir une estimation quantitative robuste. Aussi, une caractérisation fine de l'expression des récepteurs de NTN1 sur les EC s'impose, idéalement par des approches semi-quantitatives (cytométrie en flux, western-blot). Ceci est d'autant plus important que le rapport UNC5B/CD146 pourrait conditionner la nature même de la réponse biologique. La comparaison des HI en phase de prolifération et d'involution pourrait permettre d'évaluer une potentielle transition d'expression entre les phases, rendant les réponses à la NTN1 différentes. Des analyses de microscopie à haute résolution pourraient également permettre d'identifier un mosaïcisme de distribution des récepteurs au sein du réseau vasculaire, fournissant des indices sur l'hétérogénéité des réponses cellulaires. De plus, des analyses moléculaires ciblées sur la voie des VEGF et la régulation des Rho GTPase (Rac1, Cdc42 et RhoA) seraient essentielles pour relier directement la signalisation activée par NTN1 aux phénotypes observés (répulsions, augmentation de la perméabilité, inhibition du bourgeonnement). Enfin, nos observations devront être validées dans un modèle *in vivo* d'angiogenèse tel que l'embryon de poisson zèbre ou la CAM d'embryon de poulet, qui permettraient de confirmer l'impact de NTN1 dans un environnement vasculaire plus complexe et réaliste. Ces approches donneront une vision plus intégrée du rôle de NTN1 dans la régulation du remodelage vasculaire.

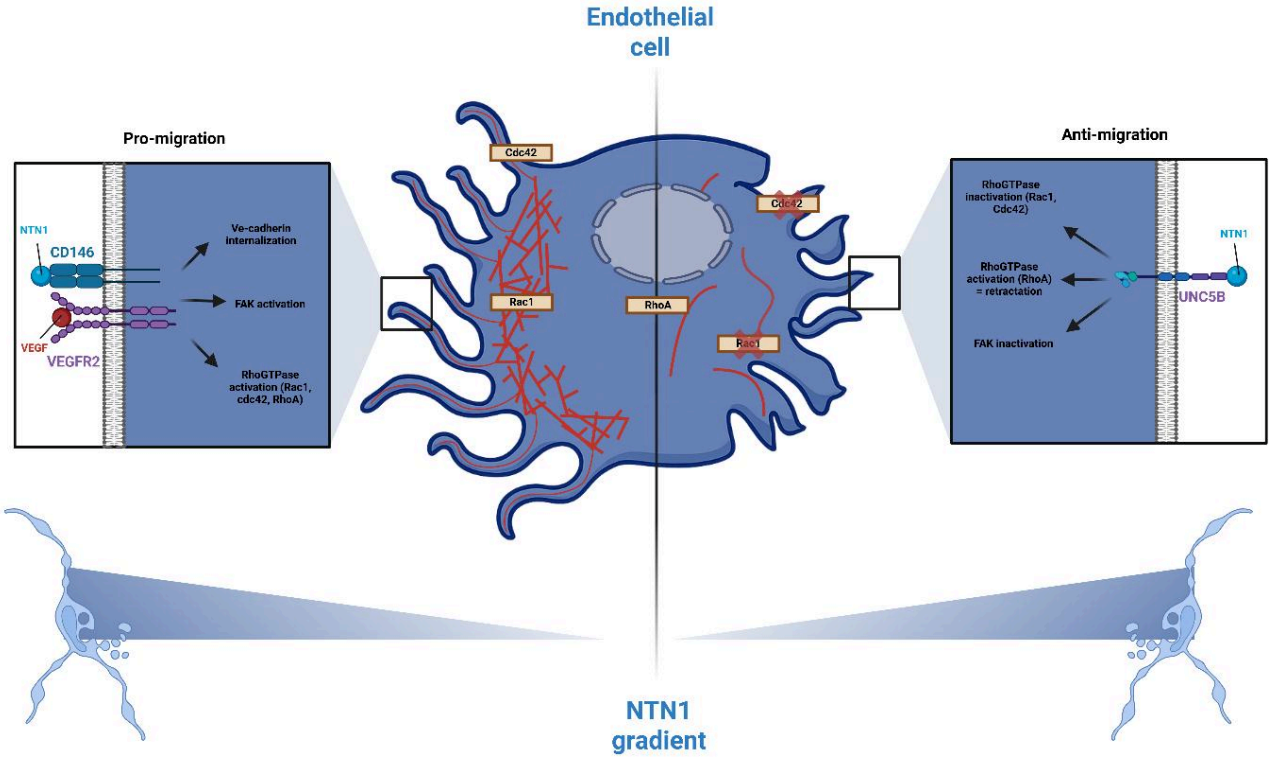


Figure 73: Potentiels mécanismes d'action de la NTN1 pendant la régression de l'HI

La production de NTN1 par les IH-TC peut avoir un rôle ambivalent. La liaison de NTN1 sur CD146 permet de renforcer l'activation de la voie du VEGF. La voie du VEGF favorise la migration des cellules en déstabilisant les complexes de jonctions (VE-cadhérine) et en activant la machinerie de migration (Rho GTPase et FAK). Dans les filopodes, formés par Cdc42, l'actine forme des faisceaux parallèles. Rac1, lui, favorise la formation des lamellipodes, où l'actine s'organise en faisceau branché. RhoA active la kinase ROCK qui en phosphorylant la myosine permet la contraction des fibres de stress. Elle permet la contraction de la cellule, qui participe à la translocation du corps cellulaire vers le front de migration. La voie VEGF, via l'activation de Src, active la kinase FAK qui permet le turnover rapide des adhérences focales. La liaison de NTN1 sur UNC5B déclenche une signalisation répulsive. L'activation d'UNC5B permet le recrutement de protéines adaptatrices (DAPK, NIT) qui inhibent l'activité de Rac1 et cdc42, tout en activant RhoA. L'inhibition de cdc42 empêche la formation des filopodes et l'inhibition de Rac1 la formation des lamellipodes. L'activation de RhoA favorise la contraction des fibres de stress d'actomyosine qui favorise la rétractation cellulaire. L'activation d'UNC5B interfère avec la signalisation VEGF, ce qui inhibe FAK et réduit le turnover des adhérences focales.

PARTIE 3 – Caractérisation par approche protéomique des télocytes cutanés sains et d'hémangiome infantile

Molecular and functional profiling of cutaneous telocytes from normal and infantile hemangiomas tissues.

PECHTIMALDJIAN Léa, CLACHET Julie*, CLAVEROL Stéphane, CARIO Muriel*, MOISAN François*.*

Article 4 : en préparation, co-auteure avec Julie Clachet (doctorante). Analyses et validations en cours.

INTRODUCTION

L'homéostasie tissulaire et la régulation du microenvironnement reposent sur des interactions dynamiques entre les cellules résidentes, la MEC et les signaux solubles. Dans ce cadre, les fibroblastes dermiques (FB) ont longtemps été considérés comme les principaux architectes du stroma, responsables de la production de la MEC, de la réparation tissulaire et de la modulation des réponses inflammatoires. Cependant, au sein du tissu conjonctif cutané, les télocytes (TC) ont récemment émergé comme une population distincte, aux fonctions singulières[375]. Historiquement, de nombreux travaux ont assimilé les TC à des FB, en raison de leur proximité phénotypique et de leur localisation stromale. Les deux populations partagent en effet des marqueurs communs, une morphologie allongée et une position périvasculaire[407]. Cette similitude a conduit à attribuer aux FB des fonctions qui pourraient en réalité relever des TC, et inversement. Pourtant, la morphologie singulière des TC suggère qu'ils constituent une population stromale autonome, aux propriétés spécifiques.

Depuis leur identification, l'intérêt pour les TC ne cesse de croître. La phase descriptive, portée notamment par la microscopie électronique a posé des bases solides sur leur morphologie et leur répartition. Dans la peau comme dans d'autres organes, CD34 et PDGFRα, ont constitué des points d'entrée précieux. Cependant, leur dynamique, comme la perte membranaire de CD34 sur les cultures à long terme, ou le signal PDGFRα, centré uniquement sur le corps cellulaire et non dans leurs prolongements, met aujourd'hui en évidence les prochaines étapes : disposer d'outils capables de distinguer finement les TC, de visualiser leurs télopodes et de les différencier facilement en imagerie des types cellulaires de son compartiment. Notre étude s'inscrit dans cette progression, afin de contribuer en une meilleure caractérisation, à ce jour émergeante et incomplète. Sur le plan fonctionnel, les TC ont été associés à une large palette de rôles : modulations immunitaires, remodelage matriciel et angiogenèse, mais la plupart de ces attributions reposent sur des observations indirectes, laissant leur véritable contribution physiologique encore hypothétique [368,432,460–463].

Dans le contexte de l'hémangiome infantile (HI), nos travaux antérieurs ont montré que les TC acquièrent un phénotype particulier au cours de la régression vasculaire, suggérant une implication active dans ce processus[278,381]. Toutefois, ces approches, centrées sur des hypothèses ciblées, n'apportent qu'une vision partielle et dirigée de leurs fonctions. Pour dépasser ces limites, il apparaît nécessaire d'adopter une approche globale et non biaisée, afin de mieux saisir la complexité des programmes moléculaires et de la plasticité fonctionnelle des TC.

L'objectif de ce travail est donc de caractériser de manière approfondie l'identité moléculaire et fonctionnelle des TC de prépuce, en les comparant aux FB et EC dermiques ainsi qu'aux TC issus d'HI en phase de régression. Par une approche protéomique comparative non dirigée, nous cherchons à

dresser un panorama global de leurs répertoires protéiques. Cette stratégie permet non seulement d'identifier de nouveaux marqueurs discriminants, mais aussi de mettre en évidence des signatures fonctionnelles spécifiques associées à leurs rôles physiologiques et pathologiques. Enfin, l'intégration de ces données à des analyses bio-informatiques d'enrichissement fonctionnel et de prédiction des régulateurs en amont, nous offre l'opportunité d'explorer les réseaux de signalisation qui singularisent les TC et d'élucider leur contribution à la physiologie cutanée et au remodelage vasculaire de l'HI.

MATERIELS ET METHODES

Échantillons humains

Les études ont été réalisées selon les règles de la déclaration d'Helsinki. Les échantillons ont été collectés des patients suivis à l'hôpital universitaire de Bordeaux. Tous les patients ont donné leur accord écrit et leurs prélèvements ont été anonymisés.

Dissociation tissulaire

Les résections fraîches ont été rincées deux fois en DPBS 1X froid. Le derme est haché en petits morceaux de $1mm^3$ et est incubé 90 minutes dans une solution de dissociation contenant 250U/mL de Collagénase de type I de *Clostridium histolyticum* (Sigma) et 2mg/mL de Dispase de *Bacillus polymyxa* (Sigma) dilués en PBS avec Ca^{2+} et Mg^{2+}. La suspension cellulaire est filtrée sur des tamis perforés de pores de 70µm pour retirer les débris de tissus. Les populations cellulaires dermiques sont amplifiées pendant une semaine dans du milieu d'EC (ECGM2, Promocell) pendant une semaine.

Enrichissement cellulaire

Après une semaine de culture, les cellules sont enrichies avec un tri séquentiel par billes magnétiques utilisant 3 marqueurs. Les EC, les TC, les péricytes et les fibroblastes sont isolés selon les recommandations du fabricant dans l'ordre de tri suivant : anti-CD31 (EC), anti-CD34 (TC), anti-CD146 (péricytes)[464]. Les fibroblastes sont négatifs pour ces trois marqueurs. Les vérifications morphologiques et moléculaires valident la qualité des enrichissements.

Culture cellulaire

Les EC sont cultivées dans de ECGM2 (Promocell). Les TC et les fibroblastes sont cultivés dans du Dubelcco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Gibco), supplémenté avec 10% de SVF (Fisher Scientific). Tous les milieux sont complémentés avec 1% de pénicilline et de streptomycine (Millipore Sigma) et les cultures sont testées toutes les deux semaines pour les contaminations aux mycoplasmes par qPCR. Les cellules envoyées en protéomique ont un passage inférieur à 10.

Extraction et dosage protéique

Les cellules d'une flasque T25 sont décollées et culottées. Les culots sont re-suspendus dans 100µL de tampon RIPA [Tris-HCl, pH8, 50mM ; NaCl 150mM ; sodium dodecyl sulfate 0.1% ; NP-40 1% ; sodium deoxycholate 0.5% ; cocktail d'inhibiteurs de protéase (Sigma)]. Après 10 minutes sur glace, les échantillons sont centrifugés 15 minutes à 14 000 rpm à 4°C. La concentration protéique est mesurée

par l'utilisation du kit *Pierce™ BCA Protein Assay kit* (ThermoFisher) en suivant les instructions du fournisseur.

Préparation des échantillons et digestion protéique

Les échantillons ont été solubilisé dans un tampon Laemmli et disposés en triplicat sur gel SDS-PAGE. La migration a été interrompue dès que les protéines ont pénétré dans le gel de séparation. Après coloration au bleu de Coomassie, les bandes ont été excisées puis découpées en fragments de 1mm x 1mm. Les fragments ont été décolorés dans du bicarbonate d'ammonium 25mM contenant 50% d'acétonitrile (ACN), rincés deux fois à l'eau ultrapure et déshydratés dans l'ACN pendant 10 minutes. Après retrait de l'ACN, les fragments ont été séchés à température ambiante, recouverts de trypsine (10ng/µL dans du bicarbonate d'ammonium 50mM), réhydratés à 4°C pendant 10 minutes puis incubés toute la nuit à 37°C. Les spots ont ensuite été incubés 15 minutes dans du bicarbonate d'ammonium 50mM à température ambiante, sous agitation rotative. Le surnageant a été récupéré et une solution d'extraction d'eau/ACM/acide formique (47.5:47.5:5) a été ajoutée sur les fragments de gel pendant 15 minutes. Cette étape a été répétée deux fois. Les surnageants ont été regroupés, séchés par centrifugation sous vide, puis repris dans 25µL d'acide formique à 5% (v/v) de manière à injecter 500ng.

Analyse nLC-MS/MS

Les mélanges peptidiques ont été analysés sur un système nanoLC Ultimate 3000 (Dionex) couplé à un spectromètre de masse Q-Exactive Quatrupôle-Orbitrap (Thermo Fisher), équipé d'une source électrospray. 10µL d'hydrolysat peptidique ont été chargés sur une colonne de préconcentration C18 PepMap (300µm x 5mm, LC Packings) à débit de 30µL/minutes, puis élués vers une colonne analytique C18 PepMap (75µm x 25 cm, LC Packings) selon un gradient linéaire de 4% à 40% de solvant B en 108 minutes (solvant A : acide formique 0.1% dans ACN 5% ; solvant B : acide formique 0.1% dans ACN 80%). Le débit de séparation était de 300nL/min.

Le spectromètre a fonctionné en mode ions positifs, à une tension de 1.8kV. Les données ont été acquises en mode dépendant des données avec le logiciel Xcalibur 2.2. Les scans MS (m/z 300-2000) étaient enregistrés à une résolution de 70 000 (m/z-200), avec une cible AGC de 1x10^6 ions et un temps de remplissage maximal. L'exclusion dynamique était fixée à 30s, et les 15 ions les plus abondants étaient sélectionnés pour fragmentation de mode HCD. Les scans MS/MS, avec sélection des ions de charge +2 et +3 uniquement. Les autres paramètres étaient : pas de flux de gaz de gaine ou auxiliaire, température de capillaire chauffée : 260°C, énergie de collision normalisée HCD : 25%, largeur d'isolement : 3m/z.

Recherche dans les bases de données et traitement des résultats

Les données ont été analysées avec l'algorithme SEQUEST via Proteome Discoverer 1.4 (Thermo Fisher), en interrogeant un sous-ensemble de la base UniProt limité au jeu de référence Homo sapiens. Les spectres correspondant à des peptides de masse > 5000 Da ou < 350Da ont été exclus. Les paramètres de recherche étaient : tolérance de masse des précurseurs : 10 ppm ; tolérance des fragments : 0.02Da ; prise en compte des ions b et y ; oxydation des méthionines (+ 16Da, modification variable) ; carbamidométhylation des cystéines (+ 57Da, modification fixe) ; deux clivages manqués autorisés. La validation des peptides a été réalisée avec l'algorithme Percolator (3), en ne conservant que les peptides de haute confiance, correspondant à un taux de faux positif de 1% au niveau peptidique.

Analyse quantitative sans marquage

Les données brutes LC-MS/MS ont été importées dans Progenesis QI Proteomics 2.0. Le traitement inclut : (i) la détection des features, (ii) alignement entre échantillons, (iii) intégration des volumes pour les ions de charge de 2 à 6, (iv) la normalisation par le ratio médian des features, (v) import des séquences, (vi) calcul de l'abondance protéique (somme des volumes des peptides correspondants), (vii) test statistique "background-based" (Fisher) et filtrage des protéines avec $p< 0.05$. Seules les features non conflictuelles et les peptides uniques ont été pris en compte pour le calcul au niveau protéique. Les données quantitatives ont été retenues uniquement pour les protéines identifiées par au moins deux peptides. Les fold-change ont été calculés en faisant le ratio des médianes des abondances normalisées de deux groupes.

Analyse statistique

L'analyse statistique de chaque protéine entre deux groupes a été réalisée par un test de Mann-Whitney (non paramétrique), avec $\alpha=0.01$. Les p-values ont été ajustées par la correction de Benjamini-Hochberg qui permet de contrôler le taux de fausses découvertes (FDR).

Contrôle qualité des données

Le contrôle qualité des données a été effectué afin d'évaluer la distribution et la fiabilité des abondances protéiques. Les valeurs d'abondance ont été transformées en log2 pour inspection visuelle (**Figure 74A**). Elles attestent de l'absence de biais d'intensité entre échantillons. Les MA plots (**Figure 74B**) montrent une distribution homogène des protéines, centrée sur M=0, avec une droite horizontale indiquant l'absence de biais d'intensité après normalisation. La symétrie du nuage de points suggère

que les variations d'expression sont équilibrées entre les conditions. Le taux de données manquantes a été examiné et est bien inférieur à 30% (**Figure 74C**). Seules les protéines présentes dans au moins 60% des échantillons d'un même groupe ont été retenues pour les analyses fonctionnelles, et 100% pour l'identification des marqueurs. Le nombre de protéines détectées par groupe est homogène (**Figure 74D**) et les intensités des contaminants sont inférieures à 5% (**Figure 74E**). La corrélation de Pearson entre échantillons a été évaluée et atteste de la proximité de chaque échantillon au sein d'un groupe (**Figure 74F**). De manière inattendue, l'échantillon TC 19.7 (hémangiome infantile) clustérise avec les échantillons de TC de prépuce plutôt que ceux d'HI, ce phénomène peut être associé à l'hétérogénéité inter-donneurs. Enfin, une analyse en composantes principales (PCA) a été réalisée pour explorer la structure globale des données et identifier d'éventuelles valeurs aberrantes (**Figure 74G**). La pureté des populations cellulaires et la cohérence des données ont été vérifiées en contrôlant l'expression de marqueurs de référence classiquement admis et reconnus dans les EC et les FB (**Annexe 1**).

Analyse d'enrichissement

Les analyses d'enrichissement ont été réalisées pour les protéines détectées dans au moins 60% des échantillons d'un groupe, via le logiciel *Ingenuity pathway Analysis* (Qiagen). Les voies enrichies ont été filtrées selon leur p-value (-log10pval > 1.3).

Disponibilité des scripts R

Les scripts R sont disponibles au lien suivant : https://github.com/leapechti/Proteomic-pipeline

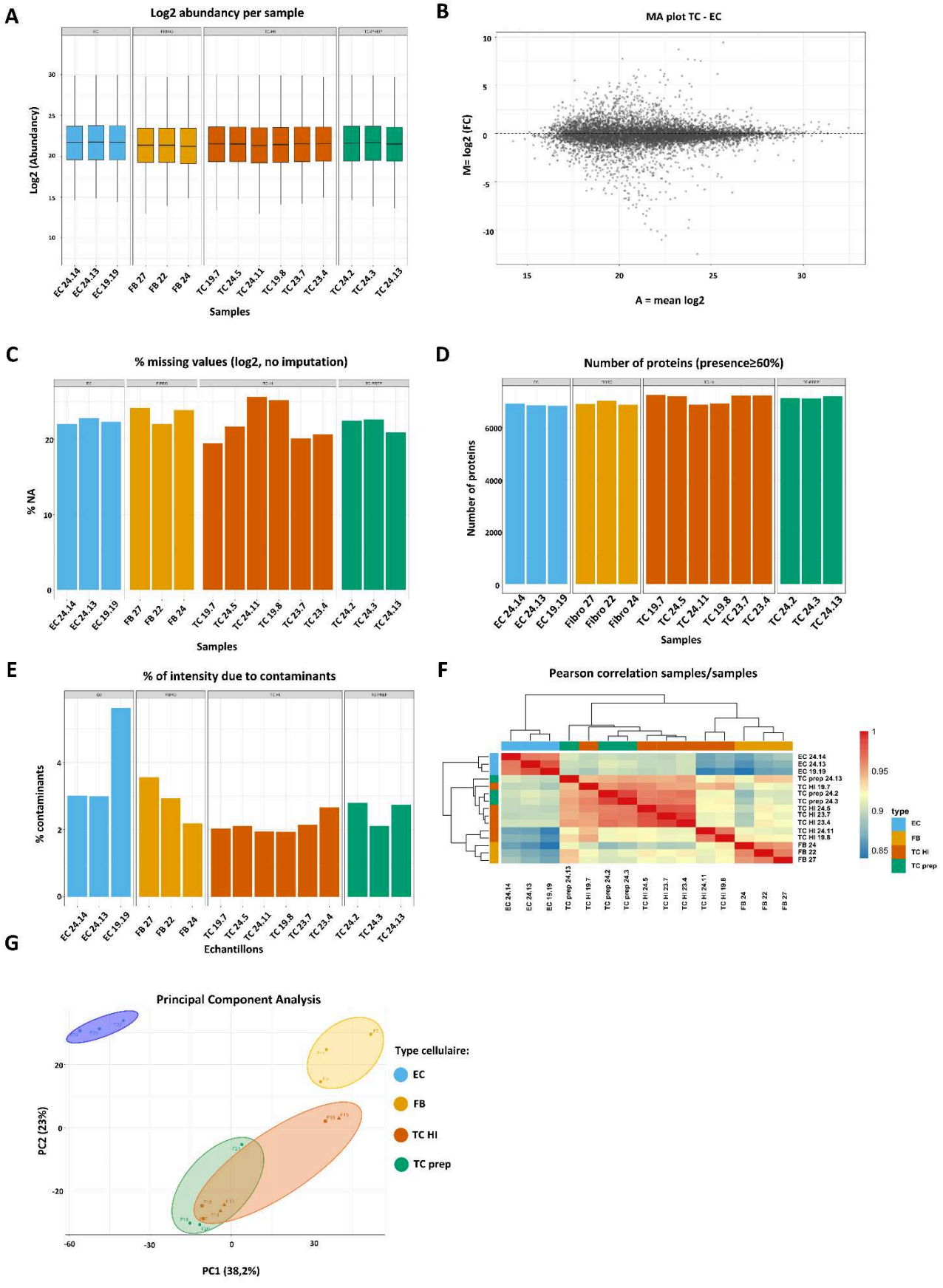


Figure 74: Contrôle qualité des données

Bleu : cellules endothéliales ; Jaune : fibroblastes ; Orange : TC d'hémangiome infantile ; Vert : TC de prépuce. A) Validation des intensités homogènes d'abondances totales des échantillons après normalisation (Log2). B) Vérification de la distribution homogène, sans biais des échantillons. Exemple d'un MA-plot des TC de prépuces comparés aux EC. C) Vérification du % des données manquantes. D) Vérification du nombre de protéines détectées après filtration. Seules les protéines présentes dans 60% des échantillons d'un groupe sont considérées comme détectées. E) Vérification du % des abondances dues aux contaminants. F) Vérification de la proximité des échantillons des groupes. Corrélation de Pearson. Clusterisation par méthode euclidienne. G) Analyse en composante principale (PC1, PC2) des échantillons.

Immunohistofluorescence

Les blocs de paraffine sont coupés en tranches fines (4µm) au microtome. Les sections sont déparaffinées et réhydratées dans des bains d'éthanol à concentrations décroissantes. Les antigènes sont démasqués dans un tampon citrate dans la machine PT-link (Dako, Agilent). Les coupes sont incubées toute la nuit avec des anticorps primaires à 4°C (**Tableau 6**). Le lendemain, elles sont incubées 1 heure avec des anticorps secondaires couplés à un fluorochrome Alexa (**Tableau 6**). Les noyaux sont contre-marqués au DAPI.

Cible	Espèce	Applications	Dilution	Vendeur	Référence
Anti-aquaporine 1	Lapin	Immunofluorescence FFPE	1 :500	Merck Millipore	Cat#AB2219
Anti-CD34	Souris	Immunofluorescence FFPE	1 :200	Fisher Scientific	Cat#MA110202
Anti-BTN3A1	Lapin	Immunofluorescence FFPE	1 :200	Proteintech	Cat#25221-1-AP
Anti- ICAM1	Souris	Immunofluorescence FFPE	1 :100	Proteintech	Cat#60299-1-Ig
Anti-ICAM1 IgG1 APC	Souris	Cytométrie en flux	1 :50	Proteintech	Cat#APC-65075
Anti-NFIX	Souris	Immunofluorescence FFPE	1 :500	Proteintech	Cat#67983-1-Ig
Anti-SCD	Lapin	Immunofluorescence FFPE	1 :200	Proteintech	Cat#28678-1-AP
Anti-STC1	Lapin	Immunofluorescence FFPE	1 :200	Proteintech	Cat#20621-1-AP
Anti-rabbit Alexa 488 (H+L)	Chèvre	Immunofluorescence FFPE	1 :500	Invitrogen	Cat#A11008
Anti-mouse Alexa 568 (H+L)	Chèvre	Immunofluorescence FFPE	1 :500	Invitrogen	Cat#A11011

Tableau 6: Références des anticorps

Caractérisation immunophénotypique des TC physiologiques cutanés

Afin de caractériser l'immunophénotype des TC physiologiques cutanés et d'identifier des marqueurs spécifiques, nous avons comparé leur profil d'expression protéique à celui de deux autres types cellulaires issus du même compartiment tissulaire : les EC et FB dérivés de derme de prépuce. Nous avons dans un premier temps vérifié si les TC cutanés physiologiques expriment les marqueurs déjà décrits dans la littérature, dans d'autres contextes tissulaires. Parmi ces derniers, nos résultats de protéomique confirment l'expression de CD10, PDGFRβ, S100A10, CD90, COL6A1 et la nestine, en plus des marqueurs ubiquitaires. Seul CD10 (FC = 4 et 2,5 en comparaison des EC et FB) et S100A10 (FC = 3 et 2 en comparaison des EC et FB) permettent de différencier les TC des EC et des FB. CD90 (FC = 14), COL6A1 (FC = 29) et PDGFRβ (FC > 1000) permettent de différencier les TC des EC, mais pas des FB. La nestine permet de différencier les TC des FB (FC = 5) mais pas des EC (**Annexe2**). Les autres marqueurs n'ont pas été détectés (**Tableau 7**).

Marqueur	Organe avec TC positifs	Expression TC cutanés
CD10	Ongles, ganglion trigéminal, glande mammaire	✓
CD29	Poumons, Aorte, cœur	✗
CD117	Cœur, poumons, méninges, vessie, glandes salivaires, utérus, trachée, bronches	✗
PDGFRβ	Cœur, valves cardiaques, muscles squelettiques, utérus	✓
Oct4	Poumons, muscles squelettiques, pancréas	✗
S100A	Cœur, trompes de Fallope, pancréas	✓
CD90	Intestin	✓
COL6A1	Intestin	✓
FoxL1	Intestin	✗
Lgr5	Intestin	✗
Nanog	Cœur	✗
Nestine	Cœur	✓
Récepteurs œstrogène et progestérone	Appareil génital féminin	✗
Sox6	Intestin	✗
Sca-1	Cœur	✗

Tableau 7: Expression par les TC cutanés des marqueurs recensés dans la littérature

Nous avons ensuite tenté d'identifier de nouveaux marqueurs. Dans un premier temps, seules les protéines présentant une expression homogène, détectées dans 100% des échantillons du groupe TC, ont été retenues. Nous avons également appliqué un seuil d'abondance normalisée supérieure à 500 000, afin de privilégier les marqueurs fortement exprimés et compatibles avec la sensibilité de détection des futures approches expérimentales. Les analyses différentielles ont révélé, pour la comparaison TC vs EC, 322 protéines surexprimées (FC > 1.5) et 390 protéines sous-exprimées (FC < 0.5, **Figure 75A**). Pour la comparaison TC vs FB, 626 protéines sont surexprimées et 189 sous-exprimées (**Figure 75B**). Parmi les protéines surexprimées, 57 présentent une surexpression simultanée vis-à-vis des EC et des FB (**Figure 75C**). La représentation des abondances normalisées des protéines sous forme de *ternary plot* met en évidence une distribution en continuum avec une majorité des protéines exprimées de manière partagée (**Figure 75D**). Seule une faible proportion de protéines se positionne à proximité du sommet des TC, indiquant qu'elles sont spécifiques. Cette observation souligne la rareté de marqueurs exclusivement exprimés par les TC. Le top 50 des protéines les plus surexprimées confirme cette observation mais met aussi en lumière les candidats présentant des variations d'expression particulièrement marquées (**Figure 75E**). Parmi ces 50 protéines, 34% sont cytosoliques, 16% membranaires et le reste est localisé dans divers organites cellulaires (**Figure 75F**).

Afin de constituer un panel restreint de marqueurs à valider expérimentalement, nous avons effectué une présélection de ces 50 candidats, basée sur des observations histologiques issues de la base de données *Human Protein Atlas*. Nous avons retenu uniquement les marqueurs présentant un fort marquage dans les cellules de type "*fibrohistocytaire*" localisées en région périvasculaire ou à proximité des annexes cutanées, localisations enrichies des TC, dans la peau physiologique. Cette analyse a permis d'identifier trois candidats majeurs : SCD, BTN3A1 et STC1, dont l'expression est prédominante dans les TC (**Figure 76A, B, C**). En parallèle, ALDH1A3 et ICAM1 (*InterCellular Adhesion Molecule 1*) sont apparus comme des marqueurs pertinents pour au moins distinguer les TC des FB, mais ne permettent pas de les différencier des EC (**Figure 76D, E**). À l'inverse, NFIX (*Nuclear Factor I X*) se révèle utile pour différencier les TC des EC mais pas des FB (**Figure 76F**).
Cette sélection constitue la base d'un panel de marqueurs candidats qui feront l'objet d'analyses de validations fonctionnelles, visant à confirmer leur spécificité et leur potentiel en tant qu'outils d'identification des TC dans la peau physiologique.

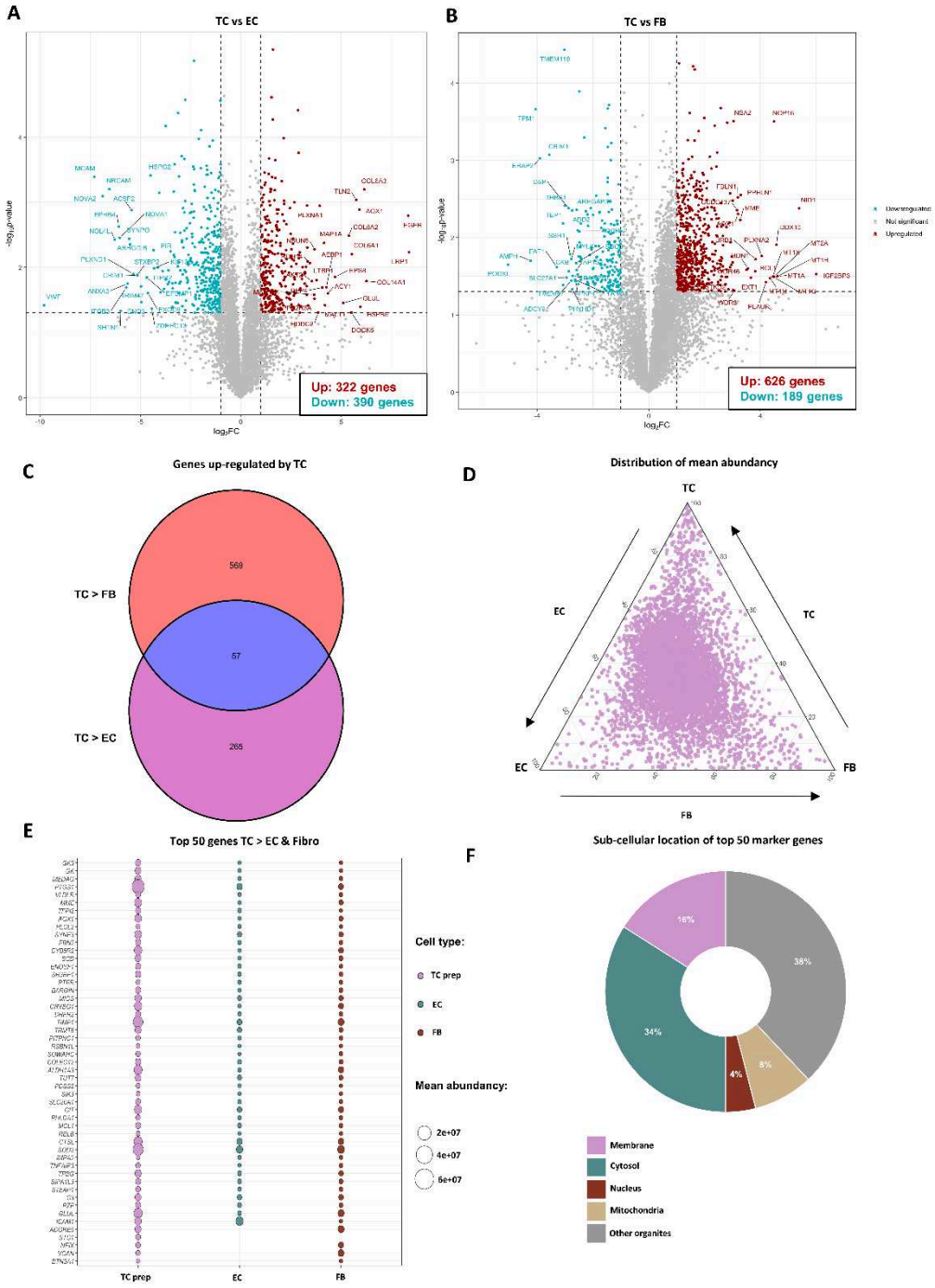


Figure 75: Identification protéomique de marqueurs des TC sains cutanés

***A-B**) Volcano plots du protéome des TC de prépuce comparés aux EC (A) ou FB (B). Les protéines surexprimées (rouges) présentent un -log10(p-value) > 1.3 et un log2FC > 0.5. Les protéines sous-exprimées (bleues) présentent un -log10(p-value) >1.3 et un log2FC <-1. **C**) Diagramme de Venn des protéines surexprimées par les TC par rapport aux FB et/ou EC. **D**) Ternary plot représentant la répartition relative des abondances des protéines entre les TC, EC et FB (somme des trois composantes = 100%). Chaque point correspond à une protéine. **E**) Dot blot du top 50 des protéines surexprimées par les TC (rose) comparées aux EC (bleue) et FB (marron). **F**) Diagramme en anneau illustrant la localisation subcellulaire du top 50 des marqueurs des TC présenté en E).*

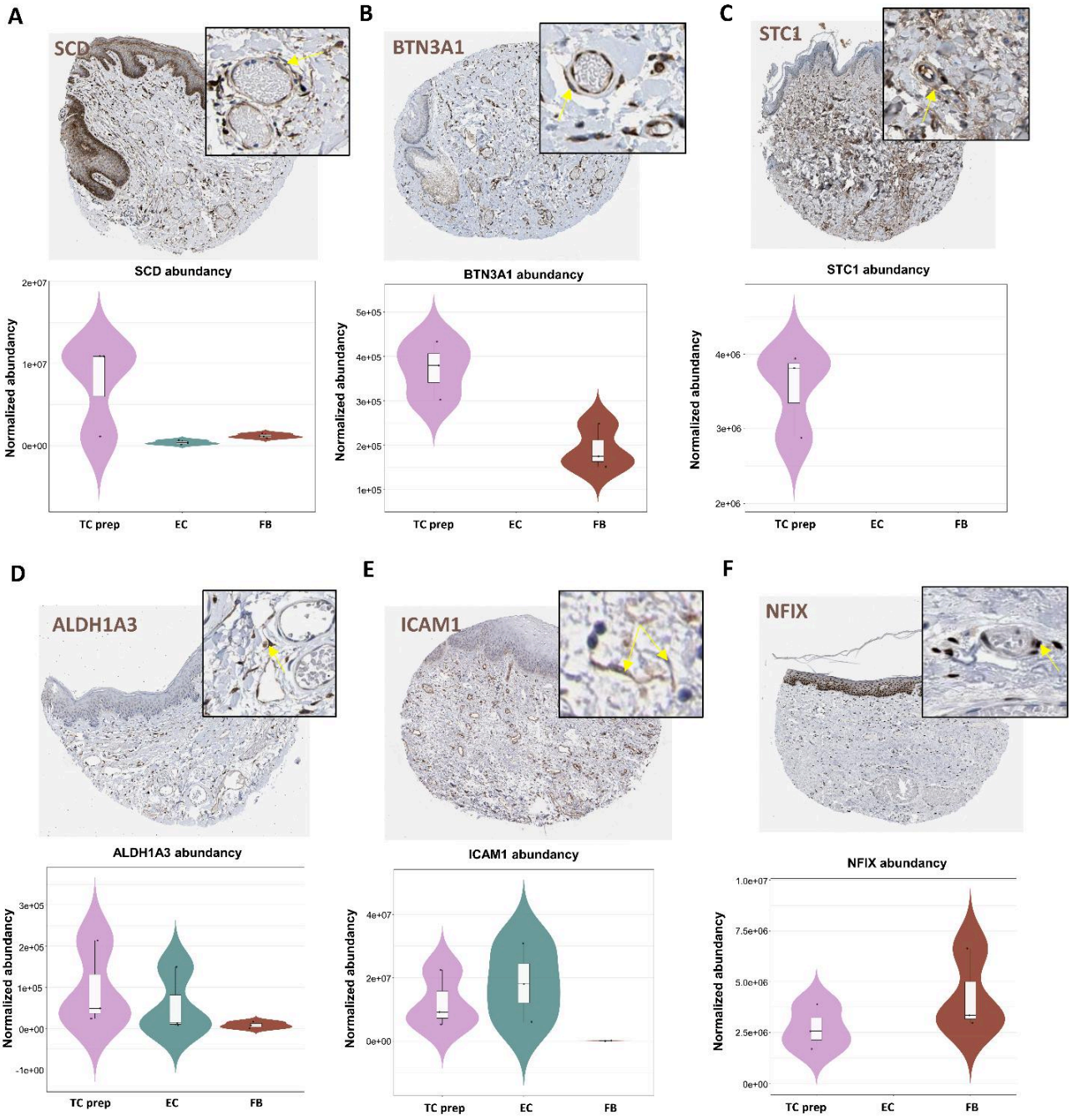


Figure 76: Pré-sélection des candidats

Immunohistochimie des 6 meilleurs marqueurs histologiques (Human Protein Atlas) et Violin plots de leurs abondances normalisées extraites de nos données de protéomique.

Validation fonctionnelle du panel des marqueurs des TC physiologiques cutanés

Afin d'évaluer la spécificité des marqueurs présélectionnés et leur compatibilité avec les approches expérimentales envisagées, ceux-ci ont été testés en immunofluorescence sur coupes de paraffine de résections de peau.

À ce jour, NFIX a montré le signal le plus convaincant. Cette protéine nucléaire est détectée dans les noyaux aplatis des TC ($CD34^+$) de prépuce (**Figure 77A**), de plastie mammaire (**Figure 77B**) et d'hémangiome congénital (**Figure 77C**), ainsi que dans les TC ($AQP1^+$) des hémangiomes infantiles (**Figure 77D**). NFIX est également exprimé par d'autres structures cutanées, incluant les kératinocytes des follicules pileux (**Annexe 3A**), les cellules claires et sombres des glomérules et des canaux des glandes sudoripares eccrines (**Annexe 3B**), les cellules basales des glandes sébacées (**Annexe 3C**) et les kératinocytes de l'épiderme (**Annexe 3D, E**). Toutefois, ces structures n'expriment ni CD34 ni AQP1 et peuvent être distinguées morphologiquement sans ambiguïté, ce qui limite le risque de confusion lors de l'identification des TC. Le marqueur CD10, déjà identifié dans des TC non cutanés, et détecté dans nos données de protéomique a été confirmé en marquage immunohistochimique dans un hémangiome congénital (**Annexe 4**) Il semble puissant pour discriminer les TC des EC et des FB. D'autres études sur le tissu cutané physiologique et les HI sont en cours, afin de valider l'universalité de ce marqueur. De plus, son expression membranaire en fait un potentiel bon marqueur pour les études de cytométrie, à ce jour encore grandement limitées. ICAM1/ CD54 présente aussi un signal exploitable pour l'imagerie des TC. Il est spécifiquement exprimé dans les TC, comme le démontre le co-marquage avec CD34 ou AQP1 dans de la peau de prépuce (**Figure 77E**), de plastie mammaire (**Figure 77F**), d'hémangiome congénital (**Figure 77G**) et d'hémangiome infantile (**Figure 77H**). Les analyses cytométriques démontrent cependant que seule la moitié de la population de TC exprime sa forme membranaire dans la peau saine et dans les HI (**Annexe 5A, B**). Seuls 25% des TC d'hémangiomes congénitaux sont positifs pour un marquage ICAM1 membranaire (**Annexe 5C**). Comme le souligne ses valeurs d'abondances normalisées, les FB n'expriment ICAM1 que faiblement (< 5%, **Annexe 5D**).

Pour les autres marqueurs, aucun signal exploitable n'a été obtenu à ce jour, mais l'utilisation d'autres clones d'anticorps devra être envisagée afin d'exclure un artefact lié à un problème technique. De plus, d'autres approches expérimentales seront nécessaires afin de confirmer que les marqueurs prometteurs sont compatibles au-delà des analyses histologiques.

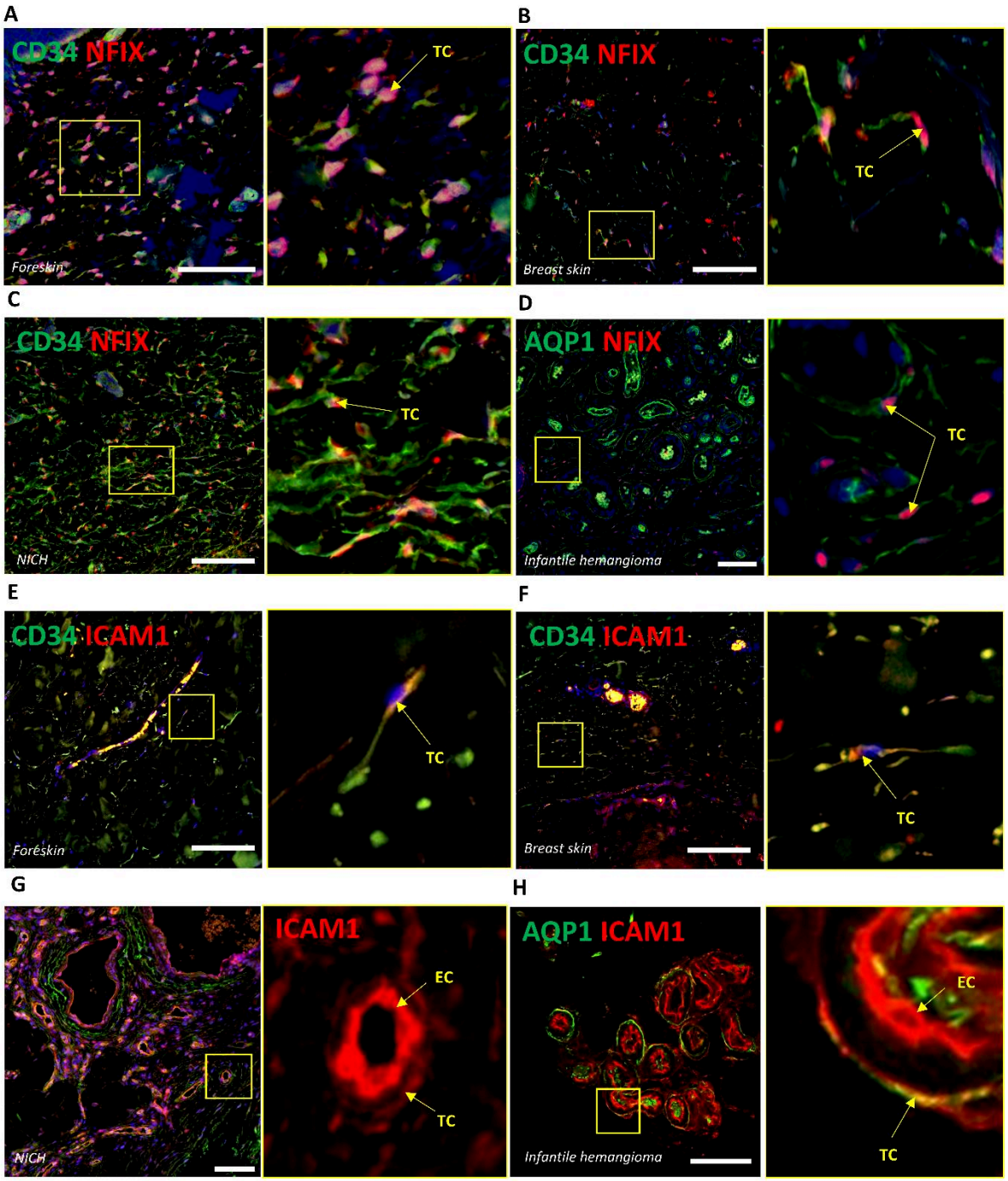


Figure 77: Validation histologiques des marqueurs des TC

***A-D**) Immunofluorescence du marqueur NFIX (rouge), des noyaux (DAPI, bleu) et des TC (CD34 ou AQP1, vert) sur des coupes FFPE de prépuce (A), plastie mammaire (B), Non-Involuting Congenital Hemangioma (NICH, C) et hémangiome infantile (D). **E-G**) Immunofluorescence du marqueur ICAM1 (rouge), des noyaux (DAPI, bleu) et des TC (CD34 ou AQP1, vert) sur des coupes FFPE de prépuce (E), plastie mammaire (F) et hémangiome infantile (G). Toutes les barres d'échelle = 100µm. Les images ont été acquise en microscopie à épifluorescence. Les rectangles jaunes correspondent aux régions zoomées.*

Profil fonctionnel différentiel et propriétés des TC cutanés sains par rapport aux fibroblastes

Le rôle physiologique des TC reste encore peu documenté. Souvent rapprochés des FB, une caractérisation fonctionnelle approfondie est nécessaire pour comprendre leurs spécificités.

L'analyse de protéomique comparative des TC et des FB issus de prépuce met en évidence une séparation nette entre les deux populations. Dans l'analyse de clustering non supervisée, chaque échantillon se regroupe préférentiellement avec ceux de son propre groupe, confirmant la distinction phénotypique globale (**Figure 78A**). L'analyse différentielle identifie 1062 protéines surexprimées et 322 sous-exprimées dans les TC par rapport aux FB (**Figure 78B**). Parmi elles, 644 protéines apparaissent exclusives aux TC et 533 aux FB (**Figure 78C**), révélant que chacune des populations possède un répertoire moléculaire distinct, probablement associé à des fonctions biologiques spécifiques.

L'analyse d'enrichissement fonctionnel met en lumière des signatures différentielles marquées (**Figure 79).** Chez les TC, les voies les plus représentées concernent la phosphorylation de TP53, impliquée dans la régulation du cycle cellulaire et la réponse au stress, en lien avec la surexpression de WRN, SSRP1 et SUPT16H (**Annexe 6A-C**). L'enrichissement des voies neurexines-neuroligines et de synaptogenèse via NLGN1, NLGN2, traduit l'activation de programmes associées à l'adhésion et la communication cellulaire. Les voies IL-4/IL-13 et TGFβ suggèrent une contribution active à la modulation immunitaire et au remodelage tissulaire, notamment via la surexpression de MCL-1 (**Annexe 6D**). Cette fonction modulatrice est renforcée par l'enrichissement des voies impliquées dans l'adipogenèse, la modulation de l'organisation et composition matricielle notamment via la production de laminines et de fibulines (**Figure 79B**, **Annexe 6E**), l'activation des MMP et la dégradation de la MEC. A l'inverse, les FB présentent un enrichissement marqué en voies associées à la production de la MEC, incluant la formation des fibres élastiques et de collagène (**Annexe 6F, G**), ainsi que des processus caractéristiques de la cicatrisation et de la fibrose. Ils sur-expriment également des voies pro-inflammatoires et chimiotactiques, comprenant IL-6, IL-8, IL-15 et CXCR4. Aussi, ils expriment des voies associées à la plasticité cellulaire dont des mécanismes favorisant la transition épithélio-mésenchymateuse, le cycle des Rho GTPase, la signalisation PKA et STAT3, et la production de facteurs de croissance comme FGF-2 (**Annexe 6H**). Certaines voies liées à la tumorigenèse (FAT10, PINK1, FGF) sont également plus représentées chez les FB.

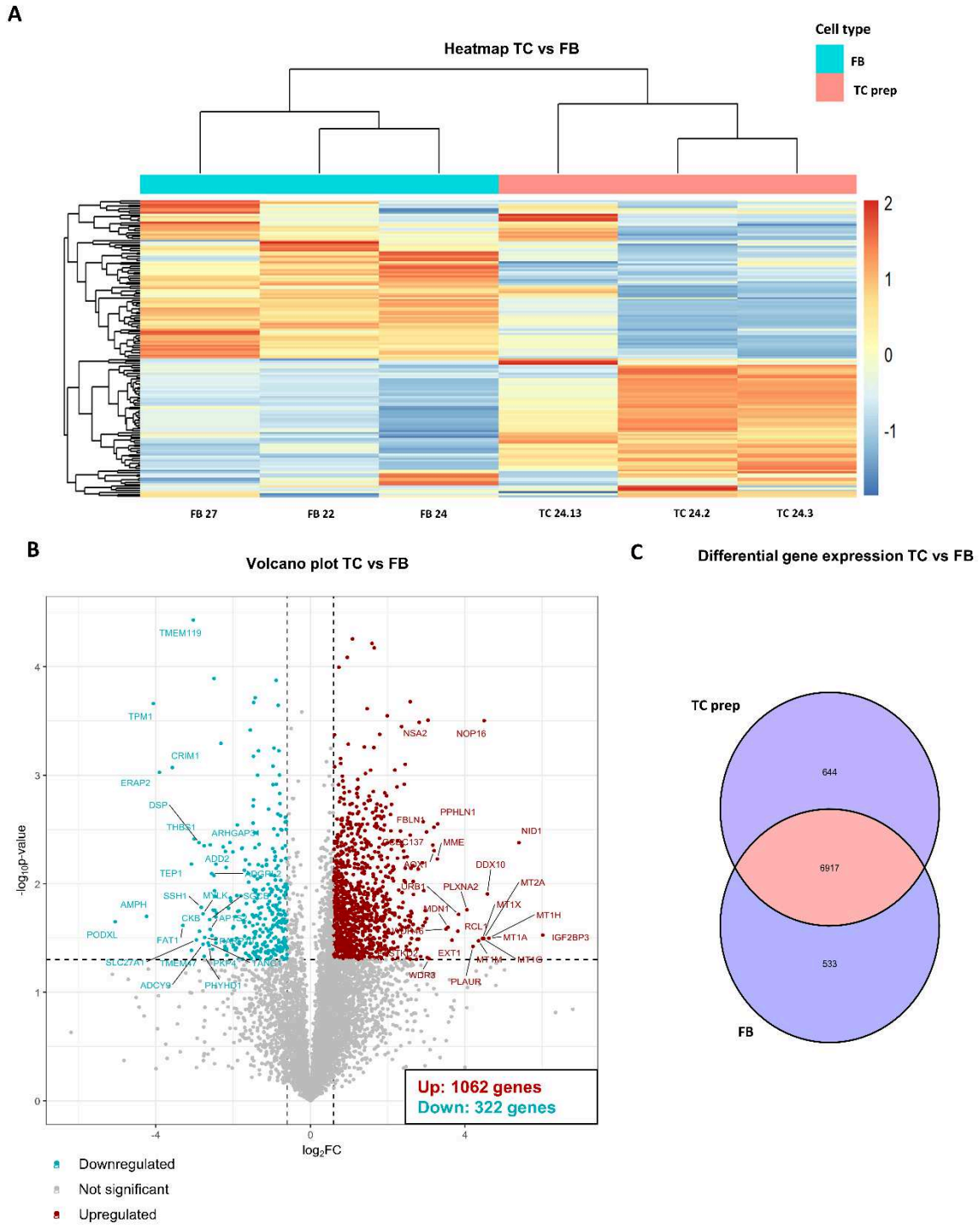


Figure 78: Analyse différentielle des expression protéiques globale des TC et FB cutanés sains

A) *Heatmap clusterisée des abondances normalisées des protéines détectées dans les FB et les TC. Les distances entre échantillons et protéines ont été calculées avec la distance euclidienne et regroupées par clusterisation hiérarchique (méthode Ward.D2).* ***B)*** *Volcano plot du protéome des TC de prépuce comparé aux FB. Les protéines surexprimées (rouges) présentent un -log10(p-value) > 1.3 et un log2FC > 0.5. Les protéines sous-exprimées (bleues) présentent un -log10(p-value) >1.3 et un log2FC <-1.C) Diagramme de Venn montrant les protéines partagées ou surexprimées dans les TC ou les FB.*

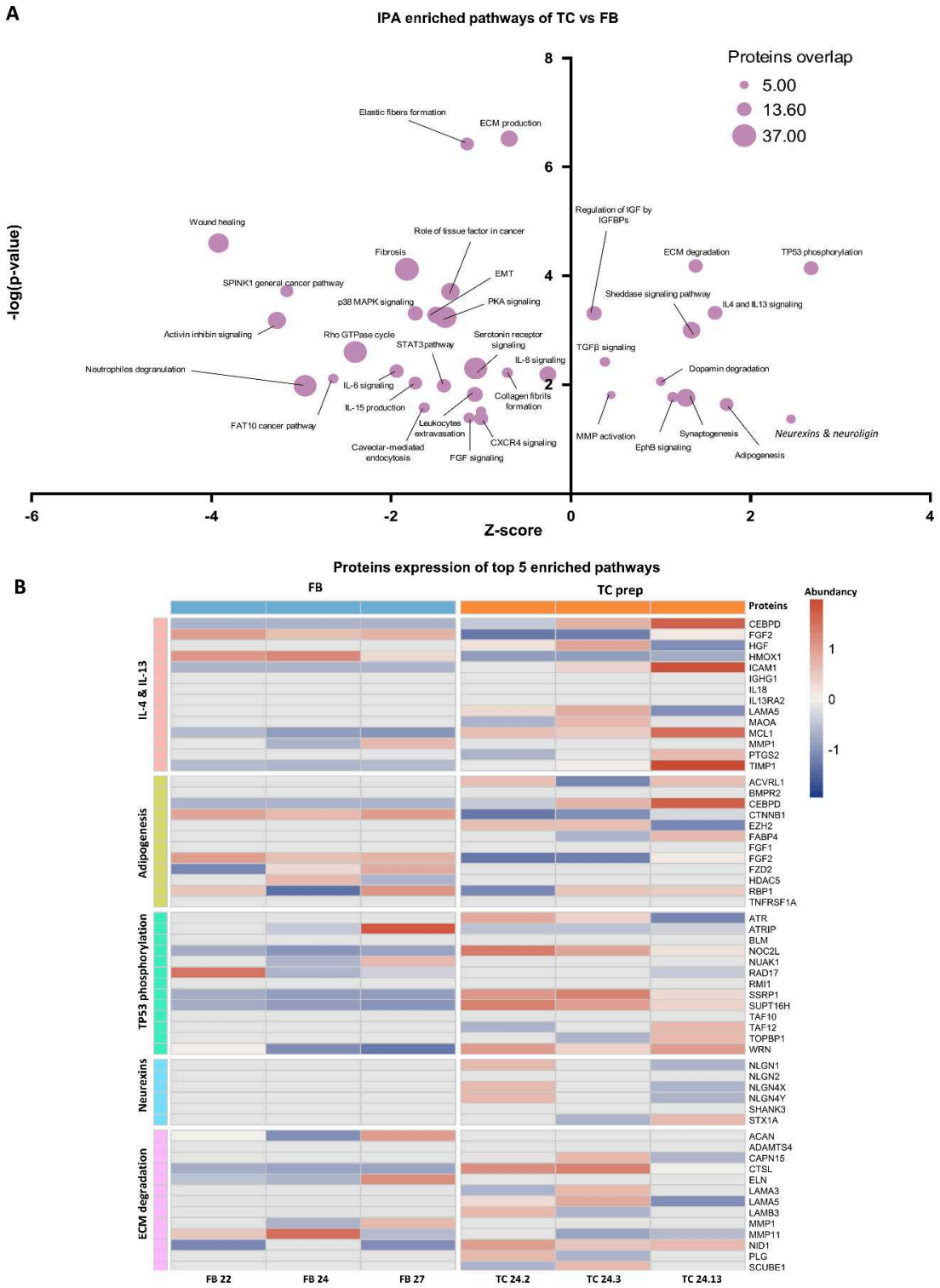


Figure 79: Enrichissement des fonctions biologiques des TC comparées aux fibroblastes cutanés physiologiques

***A**) Volcano bubble plot des voies enrichies identifiées par l'analyse IPA. La taille des points est proportionnelle au nombre de protéines qui participent à la voie. **B)** Heatmap des abondances normalisées des protéines appartenant au top 5 des voies enrichies dans les TC.*

Le profil enrichi des TC en voies de remodelage matriciel, de signalisation intercellulaire et de régulation immunitaire suggère un rôle davantage modulateur et organisateur dans la physiologie

cutanée. Ces spécificités laissent envisager que des dérégulations des TC en termes de nombre, distribution ou morphologie puissent contribuer à diverses pathologies incluant les anomalies développementales, les cancers, les pathologies immunitaires et inflammatoires ainsi que les fibroses (**Figure 80A**).

Enfin, l'analyse prédictive des *upstream regulators* (**Figure 80B**) a permis d'identifier plusieurs régulateurs transcriptionnels, facteurs de signalisation et cytokines potentiels. Parmi eux figurent des régulateurs pro-inflammatoires (*TNF*, *IL1B*, *AGT*), des facteurs de signalisation angiogéniques et de remodelage tissulaire (*TGFB1*, *VEGF*, *HGF*, *FGF2*, *IGF1*) ainsi que des régulateurs transcriptionnels de la plasticité cellulaire (*SP1*, *TP53*, *TP63*, *SMAD3*, *GLI1*).

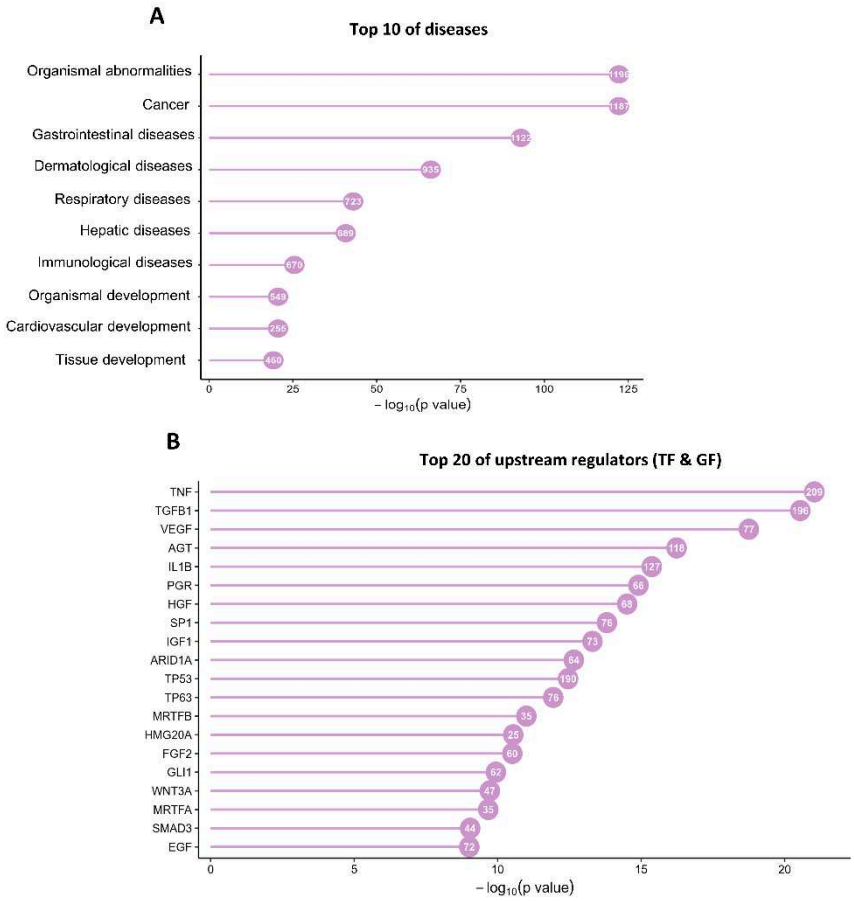


Figure 80: Lollipop plot des principales pathologies (A) et des upstream regulators (B) associés aux TC cutanés

***A**) Lollipop plot des 10 principales pathologies prédites selon IPA, en cas de dérégulations des TC. Le chiffre indiqué dans chaque cercle correspond au nombre de protéines détectées potentiellement impliquées dans la pathologie, si elles sont dérégulées. **B**) Lollipop plot du top 20 des upstream regulators prédits par IPA dans les TC. Le chiffre indiqué dans chaque cercle correspond au nombre de protéines détectées susceptibles d'être régulées par l'upstream regulator.*

Profil fonctionnel différentiel et propriétés des TC d'hémangiome infantile par rapport aux TC cutanés sains

Nos travaux précédents ont montré que les TC d'HI présentent des propriétés uniques par rapport aux TC physiologiques de prépuce, notamment dans leur capacité à moduler l'angiogenèse et la régression vasculaire (**Résultats, partie 2**). Dans la continuité de ces observations, nous avons cherché à caractériser plus finement les spécificités des TC HI en phase de régression (désigné TC HI ci-après), par rapport aux TC physiologiques de prépuce.

L'analyse comparative des protéomes met en évidence une clusterisation plus hétérogène et complexe chez les TC HI, bien que la majorité des échantillons d'un même groupe tendent à se regrouper (**Figure 81A**). Cette dispersion reflète à la fois l'hétérogénéité inter-patients présente en contexte physiologique comme pathologique, et la variabilité intrinsèque des profils protéiques au cours du long processus de régression de l'HI. L'analyse différentielle révèle 589 protéines surexprimées et 383 sous-exprimées dans les TC HI par rapport aux TC physiologiques (**Figure 81B**), dont 271 exclusives aux TC HI et 385 spécifiques aux TC physiologiques (**Figure 81C**).

L'analyse fonctionnelle des voies enrichies met en évidence plusieurs axes majeurs (**Figure 82**).

D'abord, de nombreuses voies concernent l'organisation de la MEC. Les TC présentent un profil compatible avec un remodelage tissulaire actif : la biosynthèse et la trimérisation des fibres de collagène, la production de fibres élastiques mais aussi la réorganisation des protéases matricielles. Nos données soulignent notamment la surexpression d'ADAM12 et d'ADAMTS1 (**Annexe 7A, B**), deux protéases connues pour remodeler sélectivement la MEC et libérer des signaux bioactifs. Les TC HI modulent aussi l'équilibre des composants matriciels. Ils produisent notamment moins de nidogène-2, au profit du maintien de nidogène-1 (**Annexe7C**) ils surexpriment des laminines et la ténascine C (TNC) (**Annexe 7D**). En parallèle, des enzymes de modifications post-traductionnelles comme HS6ST1, impliquée dans la sulfatation des héparane-sulfate protéoglycane sont fortement exprimées, suggérant une capacité à moduler l'affinité de la MEC pour des facteurs de croissance tels que les FGF (**Annexe 7E**).

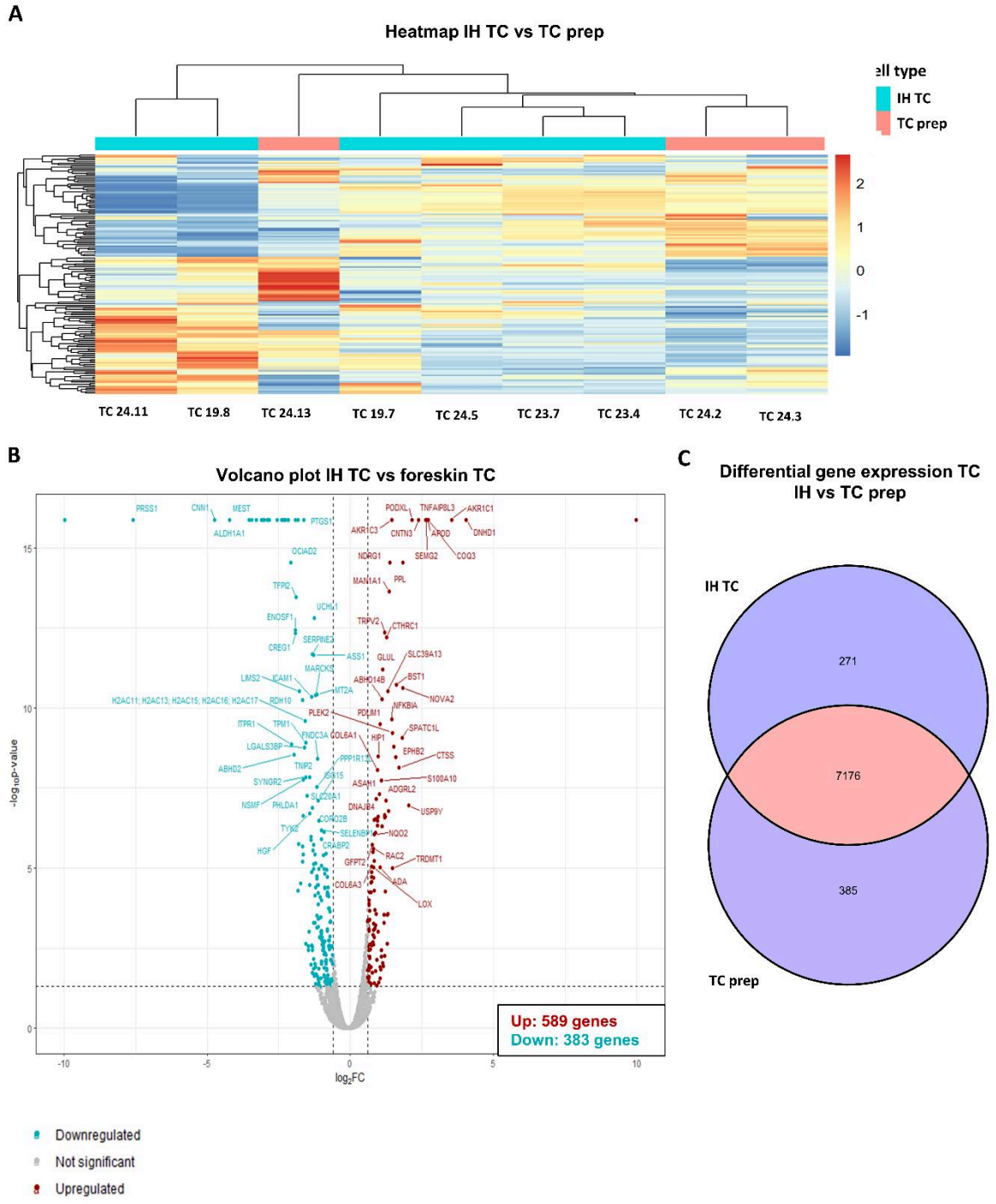


Figure 81:Analyse différentielle des expression protéiques globale des TC cutanés sains ou d'HI

A) *Heatmap clusterisée des abondances normalisées des protéines détectées dans les TC de prépuce et les TC HI. Les distances entre échantillons et protéines ont été calculées avec la distance euclidienne et regroupées par clusterisation hiérarchique (méthode Ward.D2).* ***B)*** *Volcano plot du protéome des TC HI comparé aux TC de prépuce. Les protéines surexprimées (rouges) présentent un -log10(p-value) > 1.3 et un log2FC > 0.5. Les protéines sous-exprimées (bleues) présentent un -log10(p-value) >1.3 et un log2FC <-1.****C)*** *Diagramme de Venn montrant les protéines partagées ou surexprimées dans les TC HI ou les TC de prépuce.*

Un autre axe fonctionnel majeur concerne le guidage axonal et la signalisation neuronale, notamment les voies des sémaphorines, de la nétrine-1, de la signalisation de NCAM1 (**Annexe 7F**) et de L1CAM, suggérant l'activation de programmes habituellement impliqués dans l'orientation cellulaire et la modulation des interactions cellule-cellule. Les TC sont plastiques, ce qui est illustré aussi par l'expression accrue de protéines du cytosquelette et de régulateurs de la dynamique intracellulaire comme TUBA1A, TUBB2A, PP2R5A et PRKD1 (**Annexe 7G-J**).

En parallèle, plusieurs voies intracellulaires indiquent une régulation fine des cascades de signalisation modulant la motilité, la prolifération et la survie cellulaire. Parmi elles, les voies PKR ainsi que l'activation des Rho GTPases apparaissent fortement représentées. Ces cascades convergent vers un contrôle précis de la migration et de la réorganisation cellulaire.

Enfin, plusieurs voies reflètent l'intégration des signaux immunitaires et de croissances. L'enrichissement en gène de la famille S100 (**Figure 82A, B**), de la voie PDGF, ainsi que l'activation des programmes associés à la réponse des macrophages indiquent que les TC participent activement à un dialogue avec les cellules du microenvironnement.

L'analyse prédictive des régulateurs transcriptionnels et épigénétiques met en évidence l'implication de plusieurs acteurs centraux (**Figure 82C**). Les remodeleurs de chromatine ARID1A et SMARCA4 modulent l'expression génique. Les facteurs de transcription liés au développement et à la plasticité cellulaire comme TP63, GLI1 ou YAP1 suggèrent l'établissement de programmes d'identité cellulaire originaux. Enfin, la présence de modulateur de la signalisation morphogénique comme TGFB1, TGFB2 ou BMP7 et des régulateurs inflammatoires (*TNF*, *STAT5A*) souligne que les TC HI sont soumis à un ensemble de signaux intégrant inflammation, mécanosensibilité et remodelage tissulaire.

Ainsi, nos résultats mettent en lumière le profil multifonctionnel des TC HI, combinant programmes neurovasculaires, remodelage matriciel, modulation des signaux de croissance et plasticité du cytosquelette, reflétant leur rôle actif dans la réorganisation vasculaire et stromale au cours de la régression de l'HI.

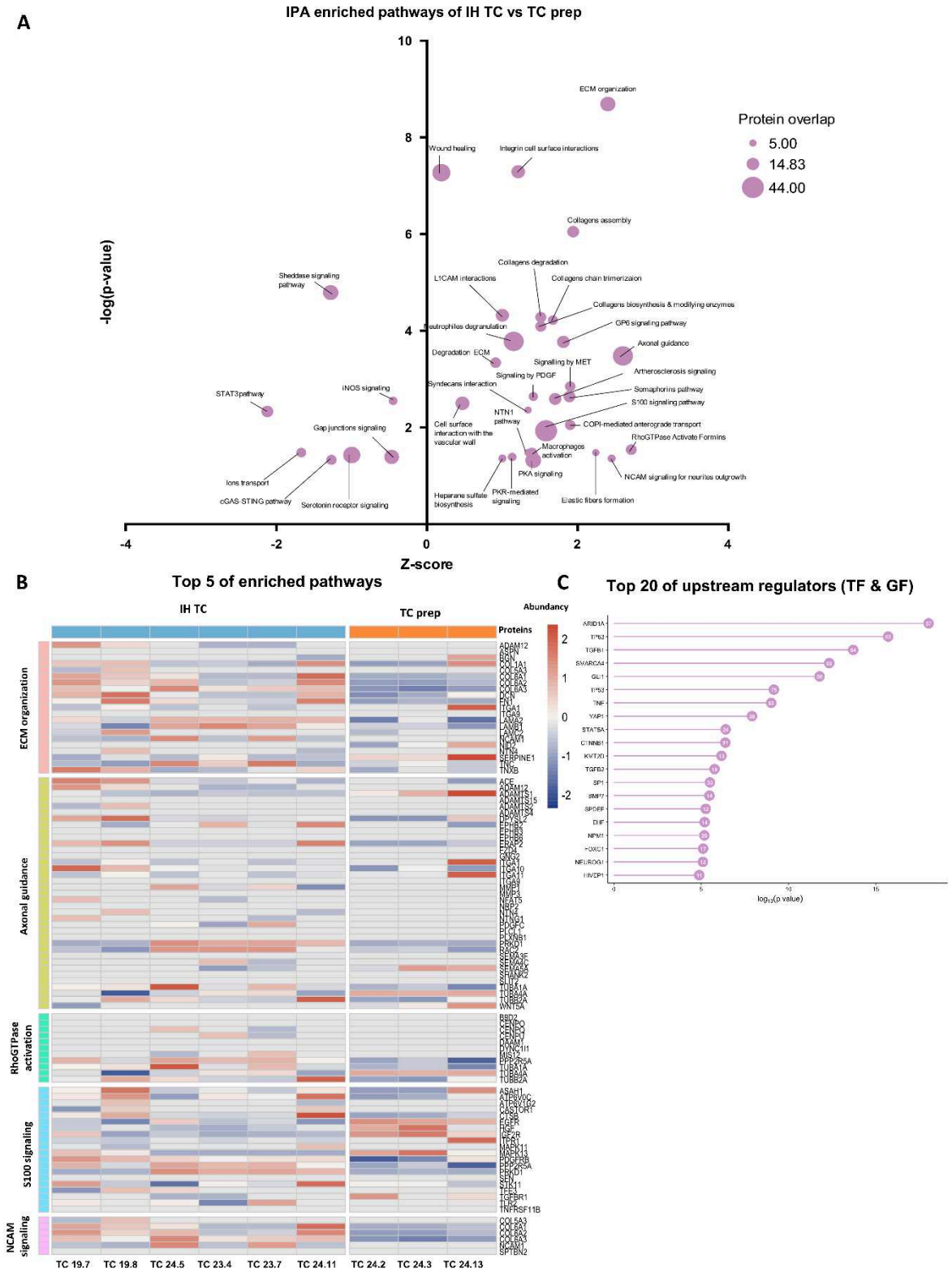


Figure 82:Propriétés fonctionnelles et régulation des TC d'HI en régression

***A**) Volcano bubble plot des voies enrichies identifiées par l'analyse IPA. La taille des points est proportionnelle au nombre de protéines qui participent à la voie. **B**) Heatmap des abondances normalisées des protéines appartenant au top 5 des voies enrichies dans les TC HI. **C**) Lollipop plot du top 20 des upstream regulators prédits par IPA dans les TC HI. Le chiffre indiqué dans chaque cercle correspond au nombre de protéines détectées susceptibles d'être régulées par l'upstream regulator.*

Nos travaux apportent une caractérisation protéomique approfondie des TC cutanés physiologiques et pathologiques dans les HI, et mettent en évidence plusieurs axes originaux qui précisent leur identité et leur rôle dans la physiologie cutanée et la pathologie vasculaire.

Caractérisation de l'immunophénotype des TC cutanés physiologiques. L'identification des TC demeure un défi en raison de l'absence de marqueurs spécifiques et uniques mais aussi à cause de leur proximité phénotypique et compartimentale avec les FB. En nous appuyant sur les données de la littérature (cf. **introduction 5.3**), nos résultats ont permis d'évaluer si les TC cutanés expriment également des marqueurs décrits dans d'autres contextes tissulaires. Parmi les plus discriminants, CD10 et S100A10 apparaissent comme des marqueurs permettant de distinguer les TC à la fois des EC et des FB. D'autres, tels que CD90 ou la nestine, permettent plutôt de les différencier d'une seule de ces deux populations. Dans la perspective d'identifier de nouveaux marqueurs discriminants, nos données de protéomique confirment la rareté de marqueurs strictement exclusifs et suggèrent qu'un panel combiné est nécessaire pour distinguer de manière robuste des TC de leur environnement stromal. L'expression de NFIX et ICAM1 renforce la possibilité de constituer un panel de marqueurs complémentaires. NFIX est un facteur de transcription qui intervient dans la différenciation et l'organisation tissulaire (**Figure 77**). C'est une protéine nucléaire qui se fixe à l'ADN et contrôle l'expression de gènes liés à la croissance cellulaire, la morphogenèse notamment vasculaire et l'organisation de la MEC[465]. ICAM1 est une glycoprotéine transmembranaire de la famille des immunoglobulines, exprimées à la surface des cellules. Son rôle central est de favoriser l'adhérence des leucocytes sur l'endothélium via son interaction avec les intégrines en contexte d'inflammation[466]. L'imagerie a montré que NFIX est également exprimé dans certaines structures épithéliales et annexielles. ICAM1 est partagé avec les EC et les cellules immunitaires. Ces observations soulignent l'importance d'approches de multiplexage et l'étude morphologique pour limiter les confusions. Ces résultats s'intègrent dans une vision moderne des compartiments stromaux où les identités cellulaires reposent sur des gradients de phénotypes plutôt que sur des gènes strictement exclusifs.
Nos travaux ont ensuite permis de mieux caractériser les fonctions biologiques des TC par rapport aux FB (Figure 83).

Propriétés de remodelage matriciel des TC cutanés physiologiques. Alors que les FB dermiques surexpriment des programmes associés à la production de MEC fibrillaire, en particulier les fibres de collagène et les fibres élastiques, les TC présentent un profil « non-fibrosant ». Ils contribuent eux aussi à la composition de la MEC, mais privilégient la sécrétion de protéines non fibrillaires telles que les laminines et le nidogène-1 et 2, constituants essentiels de la lame basale, ainsi que des fibulines impliquées dans l'organisation et l'élasticité matricielle. En conditions physiologiques, les laminines favorisent le maintien des structures cellulaires, organisant l'architecture tissulaire, soutenant l'adhérence cellulaire et participant à la stabilité et maturation vasculaire en renforçant l'attachement des péricytes et la quiescence endothéliale. Les fibulines, quant à elles, contribuent à l'assemblage et à la maturation des fibres élastiques, en assurant une résistance souple et ajustée aux besoins physiologiques[467,468]. Parmi les *upstream regulators* prédits, TGFB1/SMAD3, SP1 et TP63 apparaissent comme des candidats majeurs pour expliquer la production de ces protéines matricielles[469–471]. En parallèle, les TC activent les MMP permettant la dégradation contrôlée de la MEC. Ils sont aussi eux-mêmes producteurs de protéases, comme par exemple MMP-1, MMP-3 ou MMP-11, des MMP capables de cliver les collagènes, la fibronectine et les laminines[472,473]. Ce remodelage régulé limite l'accumulation fibrillaire, un processus largement impliqué dans les pathologies fibrosantes. Ces caractéristiques expliqueraient en partie pourquoi la perte de TC est associée à certaines affections déjà documentées, comme la fibrose hépatique, pulmonaire ou la sclérodermie[453,474,475].

Contrôle de la biodisponibilité des facteurs de croissance par les TC cutanés physiologiques. En plus de produire moins de facteurs de croissance que les FB (**Annexe 6H**), les TC semblent aussi moduler leur biodisponibilité et leur distribution. Une fois sécrétés, les facteurs de croissance ne sont généralement pas libres de diffuser et d'activer leur récepteur. Ils sont souvent séquestrés dans la MEC, associés à des glycoprotéines, des protéoglycanes ou directement à la lame basale. Leur libération dépend d'un remodelage matriciel actif par les MMP[472,476]. En modulant l'activité des MMP comme précédemment décrit, les TC contribuent alors au contrôle de la libération des facteurs de croissance. Une fois relâchés, ces facteurs peuvent être modulés par des mécanismes de neutralisation, notamment par l'action de protéines pièges. Les TC y contribuent, en sécrétant diverses protéines de la famille des IGFBP. Aussi, leur activité sheddase est particulièrement marquée. Cette propriété correspond au clivage protéolytique du domaine extra-cellulaire des protéines membranaires, générant une forme soluble ce qui modifie les fonctions biologiques, la disponibilité et l'intensité de la signalisation. Ce phénomène est réalisé par la famille des protéines ADAM. Les TC cutanés physiologiques expriment de multiples ADAM comprenant notamment ADAM15. ADAM15 a

déjà été rapporté comme pouvant cliver des couples d'intégrine dont $\alpha_v\beta_3$, rompant sa coopération avec les VEGFR et FGFR[473,477]. Ce clivage réduit la signalisation des VEGF et FGF malgré la présence des ligands.

Plusieurs *upstream regulators* prédits peuvent expliquer cette signature. Les cytokines pro-inflammatoires (TNF, IL1B) et les facteurs de croissance (VEGF, HGF, FGF2) sont connus pour induire l'expression de MMP et d'enzyme sheddases[478]. De plus, TP53 et SP1 régulent directement l'expression d'IGFBP pour assurer un contrôle fin de la signalisation IGF[479]. La dérégulation de la biodisponibilité des facteurs de croissance, qu'il s'agisse d'une libération excessive par les MMP/ADAM ou d'une neutralisation inadéquate est impliquée notamment dans la progression tumorale.

Propriétés communicantes des TC cutanés physiologiques via les synapses stromales. Comparés aux FB dermiques, les TC présentent un enrichissement marqué en gènes associés à la synaptogenèse, incluant la voie des neurexines-neuroligines, avec la surexpression notable de NLGN1 et NLGN4 (**Figure 79B).** Ces molécules d'adhérence, décrites dans le système nerveux central comme essentielles à la formation et stabilisation des synapses, suggèrent que les TC établissent dans le derme, des synapses stromales avec leurs partenaires cellulaires [480]. Cette hypothèse est confortée par leur observation fréquente en microscopie électronique avec des cellules immunitaires et des FB[416]. Les données de *Human Protein Atlas* suggèrent l'expression de NRXN1 spécifiquement dans les mastocytes et les neutrophiles (**Annexe 8A, Annexe 9A**). NRXN2 est exprimé dans les cellules *Natural Killer*, les mastocytes et les lymphocytes cutanés (**Annexe 8B, Annexe 9B**). Ces deux neurexines étant des ligands directs de NLGN1 et NLGN4 constituent un axe moléculaire cohérent pour expliquer l'orientation spécifique des télopodes des TC. Aussi, NRXN1 et NRXN2 sont exprimés par les EC microvasculaires et les péricytes, renforçant l'idée que les TC forment aussi des synapses stromales avec des cellules vasculaires (**Annexe 9**). Au-delà des neuroligines, l'enrichissement en cadhérine (CDH4, CDH6 et CDH13) et en récepteur Eph/Ephrines (EPHA3, EPHA5, EPHB3) souligne la capacité des TC à établir des contacts sélectifs et spatialement organisés[481,482]. De plus, la présence de gènes impliqués dans le trafic vésiculaire (STX1A/B, SYT11) suggère que ces synapses ne sont pas uniquement structurales, mais permettent probablement une sécrétion polarisée et ciblée des signaux. Ces propriétés pourraient être sous le contrôle de la voie WNT/β-caténine et particulièrement par l'*upstream regulator* prédit WNT5A[483]. Le FGF-2 est aussi associé à la synaptogenèse neuronale, notamment en stimulant l'extension des protrusions cytoplasmiques[484].

Propriétés immunomodulatrices des TC cutanés physiologiques. L'observation de synapses stromales entre les TC et les cellules immunitaires en microscopie électronique suggère le rôle régulateur des TC

dans l'immunité[416]. Contrairement aux FB qui exposent clairement leur phénotype pro-inflammatoire, les TC ont un profil plutôt immunomodulateur, comme déjà rapporté dans des études *in vitro* [407]. Nos données soulignent les propriétés activatrices conjointes des voies TGFβ et IL-4/IL-13 par les TC cutanés physiologiques. Ces deux axes sont classiquement associés à des fonctions immunomodulatrices. Le TGFβ favorise la tolérance immunitaire en stimulant les lymphocytes T régulateurs et en limitant la prolifération des lymphocytes T et B[485–487]. De leur côté, les voies IL-4/IL-13 induisent la polarisation des macrophages en M2-like caractérisés par des fonctions anti-inflammatoires et réparatrices[488,489]. Elles favorisent aussi la différenciation des lymphocytes T helper de type 2, qui limitent les réponses pro-inflammatoires pour favoriser la réparation[490]. L'étude des *upstream regulators* prédits suggère que les TC sont très sensibles aux signaux inflammatoires (TGFB1, TNF, IL1B). Ils seraient capables d'intégrer des signaux inflammatoires mais d'orienter leur réponse vers une diminution de l'inflammation. Ces mécanismes expliqueraient pourquoi la déplétion de TC ou de leur fonction favorisera l'apparition de pathologie auto-immunes et inflammatoires. Une perte de TC a notamment été observée dans la maladie de Crohn, le psoriasis et la sclérodermie[442,444,453].

Phosphorylation de TP53 dans les TC cutanés et propriétés souches : Dans les TC physiologiques, nous observons un enrichissement des gènes associés à l'activation fonctionnelle par phosphorylation de p53. L'expression marquée de ses partenaires WRN, de SSRP1 et de SUPT16H suggère que les TC possèdent un programme de plasticité transcriptionnelle et de stabilité génomique, caractéristiques habituellement associées aux cellules souches et progénitrices. WRN est une hélicase qui intervient dans la réplication et la réparation de l'ADN, jouant un rôle dans l'intégrité génomique. Sa déplétion dans les cellules souches mésenchymateuses entraînent un vieillissement prématuré des cellules, qui perdent leur potentiel de régénération et de réparation[491]. De leur côté, SSRPP1 et SUPT16H, composant du complexe FACT (*Facilitated Chromatin Transcription*), agissent comme chaperonnes d'histones pour favoriser le remodelage réversible de la chromatine. FACT est indispensable au maintien de la pluripotence des cellules souches embryonnaires[492]. Dans ce contexte, la phosphorylation de p53 pourrait refléter un mode d'activation particulier, où p53 ne joue pas uniquement son rôle canonique de suppresseur de tumeur mais régule la plasticité, l'équilibre entre auto-renouvellement et engagement dans la différenciation et le maintien d'un état « stem-like »[493]. L'inhibition de p53 dans les cellules souches mésenchymateuses induit leur différenciation rapide et exacerbée[494,495]. Ainsi, la co-expression de WRN et FACT, associée à l'activation fonctionnelle de p53 positionnent les TC physiologiques cutanés dans un état cellulaire conciliant longévité, stabilité et capacité d'adaptation transcriptionnelle. Ces observations sont cohérentes avec le profil d'expression des TC, qui expriment 15 des 25 marqueurs classiquement associés aux cellules souches

mésenchymateuses. Leur profil se distingue nettement des EC et des FB, avec une expression globalement plus marquée de ces marqueurs (**Annexe 10**). Parmi eux, plusieurs présentent une expression marquée, notamment ALCAM (CD166), ANPEP (CD13), MME (CD10), BSG (CD147) et TFRC (CD71). Ces marqueurs sont reconnus pour leur association à des états cellulaires immatures ou progéniteurs, soutenant l'idée d'un phénotype plastique[496,497]. L'absence d'expression de certains marqueurs canoniques de la cellule souche mésenchymateuse comme CD105, CD106 ou CD271 suggère néanmoins que les TC constituent un type cellulaire distinct.

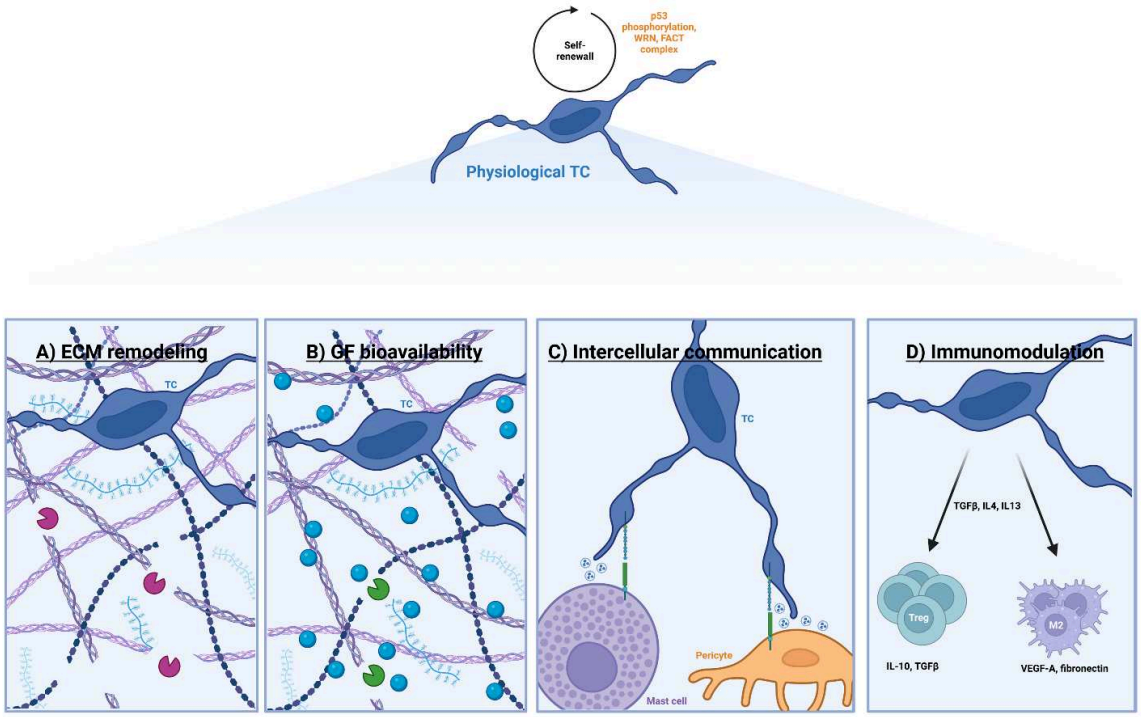


Figure 83: Résumé des potentielles fonctions biologiques des TC cutanés physiologiques

*Le renouvellement et la différenciation des TC cutanés physiologiques sont sous le contrôle de la voie de p53. Ils participent à **A**) Le remodelage de la MEC en affinant sa composition par des protéines non fibrillaires (laminines, nidogènes, fibulines) et sa quantité en sécrétant des MMP ; **B**) À la modulation de la biodisponibilité des facteurs de croissance, à la fois en modulant la matrice et les récepteurs cellulaires (activité sheddase) ; **C**) En établissant des synapses stromales avec les cellules immunitaires et vasculaires, par l'intermédiaire des neuroligines et la polarisation de leurs vésicules dans les télopodes ; **D**) En modulant l'immunité via l'activation de voies immunosuppressives.*

Un point marquant de notre étude réside dans l'identification de signatures spécifiques des TC d'HI en phase de régression par rapport aux TC physiologiques afin de mieux caractériser leur implication dans des processus actifs (**Figure 84**).

Propriétés pro-migratoires et guidage directionnel par les TC d'HI. L'analyse des voies enrichies met en évidence une forte activation des programmes de guidance axonale et de migration dans les TC HI. La voie du guidage axonale, bien que classiquement décrite dans le système nerveux est reconnue comme un régulateur clé de la migration cellulaire et de l'angiogenèse. Parmi les acteurs identifiés figurent plusieurs axes majeurs : la NTN1 (ligand sécrété à effet répulsif), les sémaphorines de classe 4 (ligands membranaires à effet attractif), les éphrines (ligands membranaires généralement répulsifs) ainsi que des molécules d'adhérence NCAM1 et L1CAM (toutes deux membranaires)[157,459]. Nos données de protéomiques, croisées avec les informations de *Human Protein Atlas*, indiquent que les EC cutanées expriment leurs récepteurs respectifs à des niveaux variables, suggérant qu'elles sont sensibles à ce type de signaux, qu'ils soient paracrines ou juxtacrines (**Annexe 9**). De plus, l'expression de récepteurs comme les plexines (récepteurs des sémaphorines) et les EphB (récepteurs des éphrines) par les TC eux-mêmes laisse envisager que des interactions homotypiques puissent intervenir, soutenant des mécanismes d'auto-signalisation qui contribuent à leur organisation fine. Parmi ces voies, NCAM1 apparait comme un acteur central, à l'interface entre guidance axonale et migration. De manière notable, NCAM1 est exclusivement exprimé par les TC HI. Par ses interactions homophiliques (NCAM1-NCAM1), il favorise l'établissement de contact entre TC et EC. Dans l'angiogenèse tumorale, NCAM1 a déjà été décrit comme un facilitateur du guidage endothélial, servant de substrat attractif pour orienter la progression cellulaire[498]. Ses interactions hétérophiliques, notamment avec les FGFR, déclenchent l'activation de la migration en impliquant la FAK et les RhoGTPase[499]. La potentielle boucle autocrine leur permettrait d'activer le remodelage de leur propre cytosquelette, comme l'atteste l'expression de TUBA1A, TUBB2 et DPYSL2. Ils favoriseraient leur propre plasticité morphologique et une réorganisation du réseau de TC, déjà décrite dans nos travaux d'imagerie.

Propriétés de remodelage de la MEC des TC d'HI. En parallèle, nos données révèlent que les TC HI participent activement au remodelage de la MEC, tant par la production de composants matriciels que par l'expression de protéases associées. Les TC HI expriment en effet un profil matriciel distinct de celui des TC physiologiques. Ils produisent davantage de COL1A1, privilégient le nidogène-1 au détriment du nidogène-2, expriment d'autres laminines et la TNC. L'absence de production de nidogène-2 pourrait contribuer à la fragilisation de la lame basale vasculaire pour favoriser leur régression progressive. En effet, le nidogène-2 est particulièrement enrichi dans les lames basales vasculaires, pour stabiliser les structures avec une bonne résistance mécanique[500]. L'apparition de production de COL1A1, composant majoritaire des fibres de collagènes de type I de la peau, pourrait attester du remplacement progressif des structures vasculaires par un stroma fibreux. Aussi, les TC HI produisent

de la TNC. Cette glycoprotéine matricielle est exclusivement exprimée pendant le développement embryonnaire mais est à nouveau produite dans les contextes tumoraux. Elle a notamment un effet antiadhésif. Elle se lie aux intégrines pour empêcher la formation de contacts stables, ce qui favorise la motilité cellulaire. Elle peut aussi favoriser la déstructuration de la lame basale en perturbant les interactions intégrines, laminines, nidogènes et collagènes[501,502]. Le profil protéolytique des TC HI soutient aussi leur implication dans un remodelage ciblé de la MEC. Ils expriment toujours une forte diversité de MMP et diverses ADAM. Le changement qualitatif et quantitatif de la MEC peut contribuer lui-même à la morphologie du réseau vasculaire. Son remodelage, en tant que structure de soutient des vaisseaux, peut indirectement provoquer le dépliement ou effondrement des structures vasculaires. Aussi, la dégradation localisée et dirigée de la MEC, peut former des lacunes matricielles, aidant en la réorganisation dirigée des vaisseaux. L'imagerie 3D des fibres de collagène cutanées de peau physiologique, d'HI en phase prolifération et involutive supporterait cette hypothèse. En effet, la peau physiologique se compose de grosses fibres de collagène incurvées et espacées. Cependant, les vaisseaux d'HI prolifératifs sont compactés dans une MEC dense de petites fibres de collagène. Les échantillons involutifs laissent apercevoir des zones appauvries en MEC, souvent positionnées à proximité de vaisseaux linéaire apposés parallèlement. Ces lacunes générées par les MMP pourraient favoriser le dépliement des structures vasculaires. (**Annexe 11**).

Propriétés de la régulation de la biodisponibilité des facteurs de croissance par les TC d'HI. Nos données démontrent que les TC HI ont conservé leur activité sheddase comme précédemment décrit, traduite par une forte expression de ADAM12. Aussi, l'expression forte de HS6ST1, une enzyme qui catalyse la sulfatation des chaînes d'héparane-sulfate des protéoglycanes, participe à la modulation de la distribution des facteurs de croissance[503]. Leur hyper-sulfatation accroît leur affinité pour les facteurs de croissance, en particulier le FGF et le VEGF et limite leur relargage. Dans le contexte de régression de l'HI, ce mécanisme peut aussi participer à l'extinction des signaux pro-angiogéniques.

Régulation transcriptionnelle des TC HI (upstream regulator). Les TC HI ont des propriétés fonctionnelles qui les différencient des TC physiologiques, cependant aucune mutation n'a été identifiée. L'activation prédite de ARID1A et de SMARCA4, deux sous-unités du complexe SWI/SNF (BAF) fournit une clé épigénétique dans la compréhension de ces différences. Ce complexe constitue un régulateur majeur de l'accessibilité transcriptionnelle en remodelant la chromatine. Il permet le glissement ou l'éjection des nucléosomes sur des régions spécifiques du génome, afin de libérer de l'ADN nu. Les régions d'ADN décondensées sont propices à la fixation de facteurs de transcription spécifiques, ce qui permet l'expression des gènes cibles contenus dans ces portions. C'est la sous-unité ARID1A qui assure le ciblage spécifique du complexe, en se liant notamment à des marques épigénétiques activatrices, comme l'H3K24ac et l'H3K4ac [504].

Il régule des programmes de différenciation, de réponses aux signaux cellulaires, des processus de développement, ou de migration[505]. [66]Plusieurs gènes surexprimés dans les TC HI, en sont sa cible (**Annexe 12**). Le phénotype des TC HI semble aussi être induit par l'inflammation via le TNF et la voie Hedgehog via GLI1.

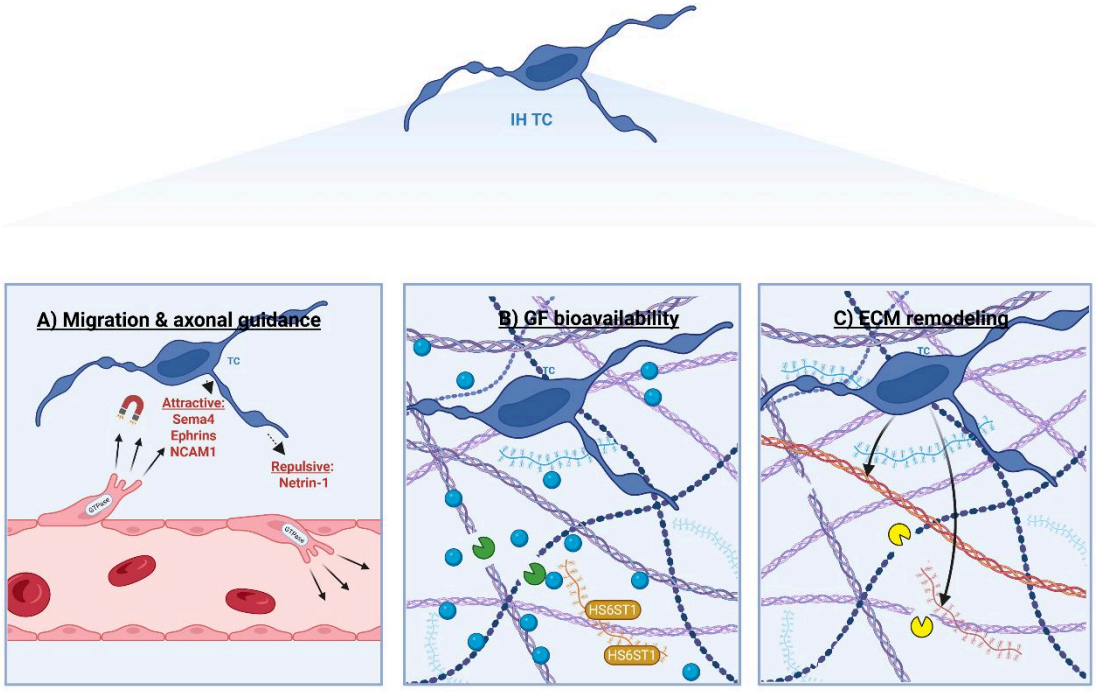


Figure 84: Résumé des potentielles propriétés des TC d'HI en régression

*Les TC d'HI en régression participent à **A)** La migration et l'orientation des cellules stromales, dont les EC par la sécrétion de molécules pro-migratoires et de facteurs de guidance axonale. La combinaison des facteurs répulsifs et attractifs guide minutieusement les cellules cibles ; **B)** La biodisponibilité des facteurs de croissance aussi par leur activité sheddase et par modifications post-traductionnelles des protéines matricielles (HSPG) ; **C)** Remodelage de la MEC via une transition dans la sécrétion matricielle vers un stroma propice au remodelage vasculaire, et par la sécrétion de MMP.*

En résumé, notre étude dresse une caractérisation protéomique approfondie des TC cutanés, dans des conditions physiologiques ou pathologiques. Elle confirme la difficulté à définir ces cellules par un marqueur unique, mais suggère qu'un panel combiné incluant CD34, PDGFRα, NFIX et/ ou ICAM1 pourrait renforcer leur identification. Les TC physiologiques se distinguent des FB par un profil non-fibrosant contribuant à la stabilité matricielle, à la modulation de la biodisponibilité des facteurs de croissance, à l'établissement de synapses stromales et à une régulation immunomodulatrice. En contraste, les TC d'HI en phase de régression acquièrent des programmes pro-migratoires et de guidage axonal, participent activement au remodelage de la MEC et favorisent l'extinction de signaux pro-angiogéniques. Ces changements reflètent une plasticité transcriptionnelle et épigénétique, soutenue par l'activation de régulateurs comme le complexe SWI/SNF. L'ensemble de ces données positionne les TC comme acteurs dynamiques et adaptatifs du microenvironnement cutané, ajustant leurs fonctions pour soutenir l'homéostasie, mais aussi orchestrer le remodelage vasculaire et stromal lors de la régression de l'HI.

DISCUSSION

Pour rappel, l'objectif de cette thèse était de comprendre les mécanismes impliqués dans la régression de l'HI, afin, à plus long terme, d'étendre ces connaissances à d'autres contextes d'angiogenèse pathologique tels que les anomalies vasculaires et l'angiogenèse tumorale des cancers solides. Nous avions émis l'hypothèse que les TC périvasculaires participent au remodelage et à la maturation du réseau vasculaire. Pour tester cette hypothèse, il a été nécessaire de mieux caractériser moléculairement et fonctionnellement les TC cutanés, de mettre en place des approches expérimentales adaptées et d'analyser plus précisément le profil cellulaire et moléculaire des TC issus de la phase de régression de l'HI.

Caractérisation des TC cutanés physiologiques :

Un objectif important de notre travail a été de mieux caractériser les TC cutanés sains, tant sur le plan immunophénotypique que sur le plan fonctionnel. La recherche sur les TC reste encore émergente et leur identité moléculaire comme leurs rôles physiologiques demeurent insuffisamment définis. Or, une meilleure compréhension de leurs caractéristiques est essentielle non seulement pour affiner leur identification, mais aussi pour élargir leur étude à d'autres domaines expérimentaux qui sont à ce jour encore limités. De plus, mieux définir le profil fonctionnel des TC cutanés sains est une étape déterminante pour appréhender les modifications de leurs fonctions, qu'elles soient perdues, conservées ou amplifiées dans les contextes pathologiques, notamment au cours du cycle évolutif de l'HI. Notre stratégie s'est reposée sur l'étude protéomique de cultures primaires de TC, d'EC et de fibroblastes extraits de peau normale ou d'HI. Nous avons recherché des marqueurs discriminants des TC et, parallèlement, nous avons interrogé leurs fonctions, en particulier celles qui les différencient des fibroblastes, un type cellulaire proche (**Résultats, partie 3**).

L'étude des TC dans le tissu cutané reste limitée, notamment en raison du faible nombre de marqueurs spécifiques et disponibles. A ce jour, seuls 3 marqueurs canoniques et ubiquitaires sont classiquement utilisés : CD34, PDGFRα et la vimentine. Leur manque de spécificité rend leur utilisation parfois peu adaptée selon les contextes expérimentaux. Cependant, nos analyses ont permis d'identifier plusieurs marqueurs présentant un potentiel différenciant intéressant. Par exemple, ICAM1 distingue les TC des fibroblastes, tandis que NFIX permet de les différencier des EC. De plus, une liste élargie de candidats issus de notre approche protéomique et d'analyses bio-informatiques a été établie pour une identification de novo de marqueurs plus spécifiques. Parmi eux, CD10 et S100A10 apparaissent particulièrement prometteurs et méritent une validation expérimentale. Enfin, nous avons également confirmé l'expression de marqueurs déjà associés aux TC dans d'autres tissus, mais dont la présence cutanée n'était pas encore documentée, tels que la nestine, CD90 et PDGFRβ. Ces résultats ouvrent ainsi la voie à une meilleure caractérisation phénotypique des TC cutanés.

Nos résultats d'enrichissement fonctionnel mettent en lumière la fonction de cellule communicante des TC, capables d'établir des contacts spécialisés avec leur environnement. L'enrichissement en gènes de synaptogenèse, incluant les neuroligines et leurs ligands exprimés par diverses cellules immunitaires et vasculaires suggère que les TC établissent de véritables synapses stromales avec un répertoire de cellules cibles. Ces structures, déjà pressenties en microscopie électronique, pourraient permettre des interactions hautement sélectives et orientées, guidant l'organisation des télopodes en fonction de leurs partenaires [381]. L'expression des cadhérines et de

gènes du trafic vésiculaire souligne que ces synapses constitueraient des plateformes de communication polarisée. À l'image des neurones, elle pourrait permettre aux TC de libérer localement des quantités précises et hautement concentrées de cytokines et de facteurs de croissance, favorisant un guidage fin, spatialement restreint et orienté vers les cellules environnantes.

Nos analyses révèlent aussi que les TC cutanés se distinguent profondément des fibroblastes dermiques, par des effets souvent opposés. Alors que les fibroblastes expriment des programmes associés à la production de MEC fibrillaire, les TC présentent un profil non fibrosant. En parallèle, les TC expriment un ensemble de MMP et de protéases permettant un remodelage régulé de la MEC, limitant l'accumulation fibrillaire et les processus de fibrose [452,453]. Aussi, conformément aux données de la littérature, sur le plan immunitaire, les fibroblastes expriment classiquement un phénotype pro-inflammatoire, tandis que les TC adoptent un profil plutôt immunomodulateur [442–444]. Leur participation à l'activation conjointe des voies de TGF-β et IL-4/IL-13 suggère leur capacité à intégrer des signaux inflammatoires tout en orientant la réponse vers la tolérance et la réparation. Ils favoriseraient la production de lymphocytes T régulateurs ou la polarisation des macrophages en phénotype M2-like. Ces propriétés expliqueraient pourquoi la perte de TC a déjà été associée à diverses pathologies inflammatoires [442–444].

Pour finir, nos données soutiennent l'hypothèse de la littérature selon laquelle les TC présentent des caractéristiques de type souche [438]. En accord avec plusieurs études rapportant l'expression de marqueurs souches chez les TC, notre analyse protéomique confirme cette observation (**Tableau 7**). Nous mettons aussi en évidence l'expression de 15 des 25 marqueurs classiquement associés aux cellules souches mésenchymateuses (**Annexe 10**), dont ALCAM (CD166), ANPEP (CD13) et MME (CD10), connus pour leur lien avec des états cellulaires immatures ou progéniteurs [496,497]. De plus, l'expression d'enzymes impliquées dans le maintien de la stabilité génomique (WRN) et de facteurs épigénétiques associés à la plasticité cellulaire (complexe FACT) suggère que les TC possèdent un haut degré de plasticité. Compte tenu de la sensibilité des cellules souches aux signaux extrinsèques, il est plausible que les variations du microenvironnement observées au cours du cycle de l'HI orientent les TC vers différents phénotypes et fonctions, contribuant à la dynamique de régression. Ces observations méritent d'être confirmées par des approches fonctionnelles évaluant leurs capacités d'auto-renouvellement, de multipotence et d'ouverture chromatinienne, caractéristiques majeures des cellules souches.

Ces données affinent l'identité des TC cutanés comme des cellules plastiques, occupant un rôle central de nœud de communication stromal au sein du derme. Loin d'être de simples sous-populations

fibroblastiques, les TC apparaissent comme une population stromale modulatrice voire antagoniste, dotée d'une double fonction de régulateurs matriciels non-fibreux et de modulateurs de l'immunité locale, contribuant à l'équilibre homéostatique du derme.

Les TC dans le processus de régression vasculaire de l'HI :

Nos résultats de caractérisation des TC cutanés physiologiques révèlent une plasticité marquée et leur capacité à moduler certaines fonctions fibroblastiques. Ces propriétés, associées à leur rôle dans le remodelage et l'homéostasie tissulaire soutiennent notre hypothèse principale d'une participation active des TC au remodelage vasculaire de la phase de régression de l'HI.

Ainsi, l'objectif principal de cette thèse a été de mieux comprendre le rôle des TC au cours de la phase de régression de l'HI. Pour y répondre, nous avons, d'une part, approfondi les connaissances sur le devenir des vaisseaux sanguins au cours de cette phase, en développant une approche de microscopie 3D gros volume, pour visualiser de manière intégrée les mécanismes de réorganisation vasculaire et périvasculaire. D'autre part, nous avons cherché à préciser les fonctions des TC au cours de la régression, en combinant différentes approches complémentaires, cellulaires et moléculaires, allant du screening dirigé par qRT-PCR, à des analyses protéiques semi-dirigées (*Proteome Profiler*) et non dirigées (protéomique). L'ensemble de ces approches visait à déterminer dans quelle mesure les TC contribuent à la modulation et à l'orchestration du remodelage vasculaire caractéristique de la phase de régression de l'HI.

Avant la mise en place de ce projet, l'analyse de la vascularisation de l'HI reposait sur des approches d'imagerie en coupes histologiques. Si celles-ci permettaient d'observer certains phénomènes, comme la raréfaction des lumières vasculaires ou encore l'élargissement luminal des vaisseaux GLUT-1^{+} persistants, elles ne donnaient qu'une vision fragmentée de l'architecture vasculaire et ne permettaient pas de suivre la trajectoire des vaisseaux dans leur continuité [273]. Afin d'obtenir une vision globale et 3D du réseau vasculaire, nous avons décidé d'adapter les protocoles de transparisation développés initialement en neurosciences et de les appliquer à des échantillons humains cutanés [18]. Cette transposition a conduit au développement de Skin-iDISCO^{+}, une approche permettant d'explorer la morphométrie des vaisseaux à l'échelle du réseau entier. L'un des principaux défis rencontrés résidait dans la pigmentation intrinsèque de la peau, qui rendait la transparisation difficile. Nous avons donc optimisé et adapté les étapes critiques du protocole afin de surmonter cette contrainte, ce qui

nous a permis d'obtenir des biopsies de patients transparentes et directement observables en microscopie 3D, sans avoir recours au sectionnement physique (**Résultats, partie 1**).

Nos observations ont permis de mieux caractériser la dynamique vasculaire de l'HI au cours de ses différentes phases (**Résultats, partie 2.1**, **Figure 85**). Durant la prolifération, le réseau se met en place de façon anarchique, avec des structures vasculaires particulièrement abondantes, tortueuses et volumineuses. L'hétérogénéité des diamètres des vaisseaux est marquée, certaines lumières apparaissent dilatées tandis que d'autres sont écrasées. Cette instabilité pourrait refléter une faible cohésion endothéliale, une hypothèse qu'il conviendra de vérifier par l'étude tissulaire de marqueurs de jonctions tels que la VE-cadhérine, ou des études de fuite vasculaire par marquages de protéines plasmatiques comme les IgG ou le fibrinogène. Malgré cette organisation désordonnée, nous n'avons pas mis en évidence de défaut majeur de couverture péricytaire, comme observé en 2D [323].

La phase de régression s'accompagne en revanche d'une évolution progressive du réseau. Contrairement à l'hypothèse selon laquelle la raréfaction des lumières refléterait une apoptose rapide de réseaux entiers, nos données ne montrent pas de perte brutale des structures vasculaires. En réalité, ce qui apparaît en coupe comme de multiples lumières vasculaires lobulaires correspond à un nombre limité de vaisseaux extrêmement tortueux, qui repassent plusieurs fois dans le même plan de coupe. La diminution apparente des lumières reflète donc davantage un dépliement progressif des vaisseaux au cours de leur maturation qu'une disparition par apoptose. Ce phénomène de dépliement pourrait d'ailleurs être mécaniquement favorisé par la restauration d'un flux sanguin plus efficace, qui contribue à allonger et homogénéiser les structures. De la même manière, il pourrait résulter au moins en partie au relâchement des contraintes mécaniques imposées par la MEC. Dans un contexte de MEC très dense, comme par exemple de la phase proliférative, les vaisseaux pourraient être contraints dans des trajectoires sinueuses. À l'inverse, la relaxation et le remodelage de la MEC permettrait un dépliement passif des structures vasculaires (**Annexe 11**).

Ainsi, le remodelage observé apparaît fin et continu, avec une tendance à se rapprocher de valeurs morphométriques physiologiques. Le réseau vasculaire devient moins dense mais plus étendu, moins tortueux et plus homogène en diamètre. Cette évolution pourrait refléter une normalisation vasculaire, non seulement morphologique comme démontré, mais aussi potentiellement fonctionnelle, caractérisée par une maturation accrue des vaisseaux persistants et un *pruning* sélectif des segments immatures ou aberrants. Ce processus de *pruning* correspond à l'élimination progressive des portions vasculaires les moins stables et les moins perfusées, tout en préservant et consolidant les structures matures [60,61]. Contrairement à une involution, reposant sur une apoptose étendue, le *pruning* s'accompagne d'un faible niveau d'apoptose et semble impliquer le recyclage des EC,

incorporées dans les vaisseaux restants, ce qui pourrait contribuer à l'élargissement luminal de certains d'entre eux [273]. Enfin, ces observations morphologiques trouvent un écho au niveau moléculaire. La phase proliférative est marquée par la surproduction de facteurs pro-angiogéniques tels que le VEGF-A, l'IGF-2 et le FGF-2 (**Résultats, partie 2.1**), induisant une suractivation endothéliale et donc la formation de vaisseaux instables et désorganisés [273]. La normalisation vasculaire morphologique que nous décrivons pourrait refléter, en parallèle une normalisation du ratio entre facteurs pro- et anti-angiogéniques, traduisant de l'émergence d'un environnement moléculaire plus équilibré qui soutient la stabilisation et la maturation des vaisseaux.

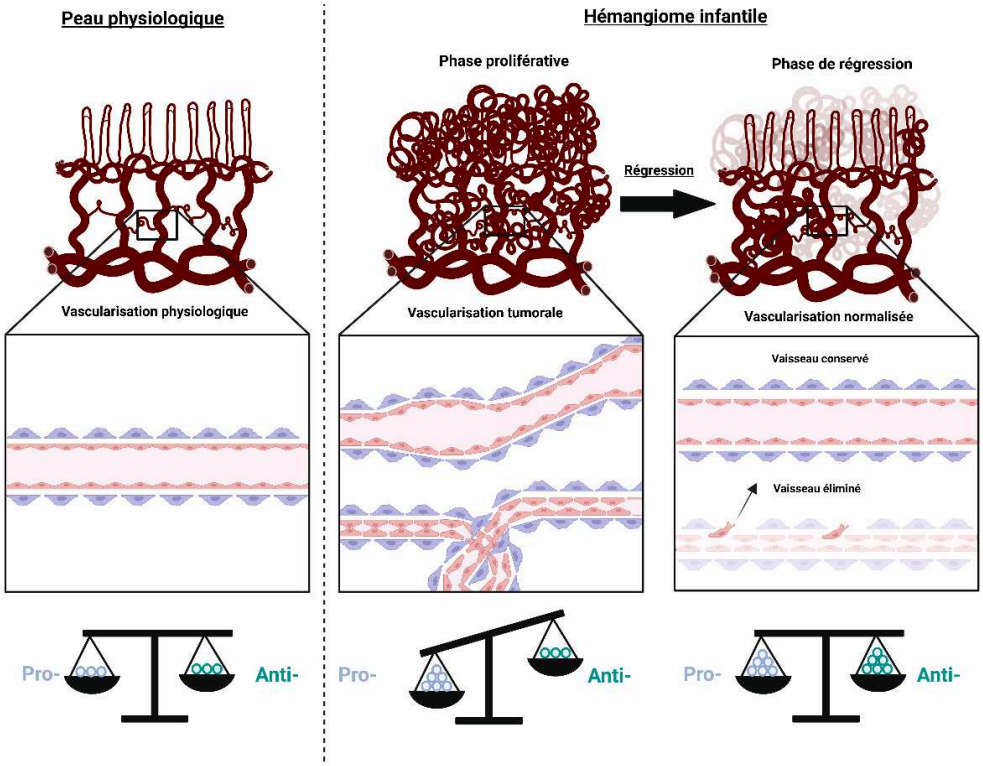


Figure 85: Dynamique de la vascularisation d'hémangiome infantile

Nos résultats soulignent que les modifications vasculaires observées au cours de la régression de l'HI s'accompagnent également de profondes réorganisations dans l'espace périvasculaire, notamment au niveau des TC (**Résultats, partie 2.1**). Leur morphologie et leur disposition évoluent en fonction du stade, suggérant un rôle actif dans le processus. Durant la phase proliférative, les TC adoptent une forme en feuillet, organisée en gaine continue autour des structures vasculaires, une organisation aussi observée dans la peau physiologique. En revanche, au cours de la phase involutive et plus particulièrement lors des phases actives de régression, les TC adoptent une morphologie dendritique et stellaire, s'organisant en maillage périvasculaire. Ce changement structurel pourrait traduire un

changement fonctionnel : la dendricité accrue pourrait refléter une activation spécifique des TC et l'acquisition de nouvelles propriétés angiogéniques.

Nos données fonctionnelles confirment que ces changements morphologiques s'accompagnent d'une réorientation de leurs fonctions angiogéniques. Les TC en feuillet, prédominants dans la phase proliférative et de manière similaire aux TC physiologiques, n'ont pas d'effet notable sur le comportement des EC. En revanche, les TC dendritiques, caractéristiques de la phase de régression, exercent une influence marquée sur l'endothélium. Ces derniers exposent des propriétés anti-angiogéniques paracrines démontrées par le blocage de bourgeonnement endothélial (**Résultats, partie 2.1**). Ce processus serait médié par quatre fonctions majoritaires (**Figure 86**).

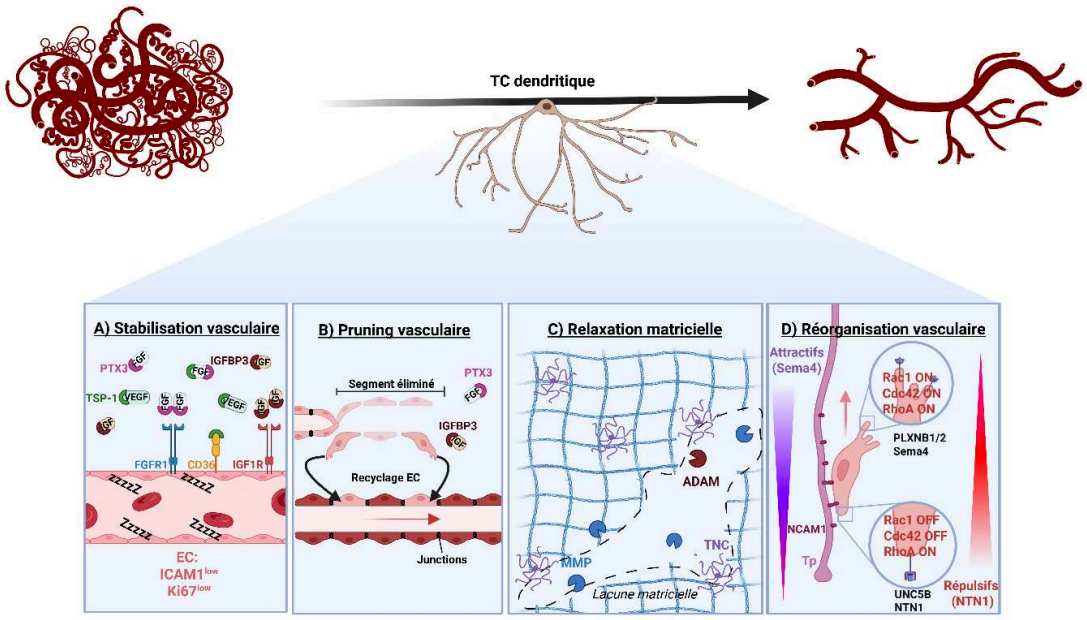


Figure 86: Fonctions cellulaires et moléculaires des TC dendritiques au cours de la régression de l'HI

Premièrement, les TC dendritiques participent à la **stabilisation de l'endothélium** en bloquant à la fois sa prolifération et son activation. L'arrêt de prolifération des EC reflète une limitation de l'exposition aux signaux pro-angiogéniques, tandis que la diminution d'activation se traduit par une baisse d'expression de molécules de réactivité telles qu'ICAM1. Cette stabilisation repose sur la capacité des TC dendritiques à réduire la biodisponibilité des facteurs pro-angiogéniques, qui en condition proliférative, stimulent fortement la division et l'activation endothéliale. Nos données expérimentales démontrent qu'un mécanisme central impliqué dans ce processus de blocage est la voie des FGF. Les TC sécrètent la PTX3, qui agit comme leurre en fixant le FGF-2 et en empêchant son interaction avec les FGFR. La neutralisation de ce signal majeur de prolifération se traduit par une

diminution de la division cellulaire et une réduction du bourgeonnement vasculaire dans un modèle 3D de fibrine (**Résultats, partie 2.1**). De plus, nos analyses préliminaires de screening suggèrent plusieurs mécanismes additionnels, qui restent à confirmer expérimentalement. Les TC d'HI produiraient notamment des enzymes clés impliquées dans la sulfatation des HSPG (**Résultats, partie 3),** ce qui pourrait accroître leur affinité pour les FGF et limiter leur relargage dans le microenvironnement. De plus, la sécrétion de TSP-1 (top 5 *Proteome profiler*, top 3 panel qRT-PCR) pourrait contribuer à la régulation négative de l'angiogenèse, en se liant aux VEGF et aux FGF et en interférant avec leurs voies de signalisations pro-angiogéniques transduites via CD36. Enfin, la voie des IGF pourrait également être freinée, possiblement par la sécrétion d'IGFBP-3 (*top 2 Proteome profiler et panel qRT-PCR),* une protéine de liaison identifiée dans nos analyses, capable de piéger l'IGF-2 et de réduire l'accessibilité aux récepteurs (**Résultats, partie 2.1, partie 2.2**)

Dans un second temps, la stabilisation de l'endothélium prépare le terrain pour le ***pruning* vasculaire**. En effet, c'est uniquement quand le réseau endothélial est stabilisé, c'est-à-dire en arrêt de prolifération et d'activation, que le *pruning* peut avoir lieu. Les TC dendritiques jouent aussi un rôle clé dans ce processus en modulant la dynamique des jonctions endothéliales. Nos données expérimentales montrent qu'en bloquant la voie du FGF-2, ils réduisent un signal habituellement impliqué dans le renforcement des complexes de jonctions de VE-cadhérine. En neutralisant le FGF-2, la PTX3 réduit l'activation des voies PI3K/Akt et Rac1 mais aussi de la signalisation ERK (**Résultats, partie 2.1**). Or, ces voies participent respectivement à la formation du cytosquelette d'actine corticale qui permet l'ancrage des jonctions, ainsi qu'au maintien du complexe p120-caténine-VE-cadhérine favorisant sa stabilité et son ancrage au cytosquelette. L'activation de FGFR-1 inhibe aussi l'activation de la kinase SHP2, responsable de son endocytose [90]. La PTX3 favoriserait alors aussi l'internalisation des jonctions d'adhérence.

Par ailleurs, nos analyses issues des approches de screening suggèrent d'autres mécanismes potentiellement impliqués, mais restent aussi à confirmer expérimentalement (**Résultats, partie 2.1, partie 2.2**). Le piégeage des IGF par l'IGFBP-3 peut induire des mécanismes similaires. Ce blocage entraine une perte de cohésion modérée ce qui facilite le détachement et la migration des EC issues des vaisseaux en cours d'élimination. En plus, les TC dendritiques favorisent le cycle des petites GTPase et le remodelage du cytosquelette d'actine, ce qui pourrait expliquer leurs propriétés pro-migratoires sur les EC en culture (**Résultats, partie 3**). Nous n'avons cependant pas encore fonctionnellement identifié le(s) facteur(s) conférant cette propriété. Cette activation migratoire, couplée à la redistribution des EC, constitue un levier essentiel au *pruning* vasculaire. Elle permet l'élimination

progressive des segments aberrants, tout en renforçant les structures matures et fonctionnelles du réseau.

Troisièmement, au-delà de leurs effets directs sur l'endothélium, les TC dendritiques exercent également une fonction clé de **remodelage matriciel**, qui accompagne et amplifie les étapes de stabilisation et de *pruning*. La régression de l'HI ne peut en effet s'opérer sans une adaptation dynamique de l'environnement extracellulaire. Nos données de protéomique suggèrent une redéfinition qualitative et quantitative de la MEC. Cette spécificité confère aux TC dendritiques un profil matriciel singulier par rapport aux TC physiologiques, qui pourrait avoir un impact direct sur la dynamique des vaisseaux. L'appauvrissement en nidogène-2, un constituant habituellement enrichi dans les lames basales vasculaires, est susceptible de réduire la résistance mécanique des vaisseaux. À l'inverse, l'induction de composant cutanés typiques comme le collagène de type I, témoigne d'une tendance au remplacement du compartiment vasculaire par un stroma fibreux, marquant une transition vers une cicatrisation, typique de l'HI. Aussi, l'expression de protéines matricielles développementales antiadhésives comme la TNC, favorisent la motilité cellulaire. Ce remodelage matriciel s'appuie également sur une activité protéolytique soutenue, en lien avec l'expression de MMP et d'ADAM. La dégradation ciblée de la MEC peut générer des zones de moindre résistance ou des lacunes matricielles qui guident la migration des EC (**Annexe 11**).

Pour finir, nos analyses de protéomique et d'expression (qRT-PCR) montrent que les TC dendritiques activent des **programmes de guidage axonal**, conférant à ces cellules une fonction de coordination spatiale du remodelage vasculaire. Nos données expérimentales ont identifié la sécrétion de la NTN1, un facteur impliqué dans la répulsion des cellules vasculaires (**Résultats, partie 2.2**). Son engagement sur son récepteur canonique induit la rétractation des EC, probablement via l'activation de la GTPase RhoA [456].

Nos données préliminaires de protéomique confortent ces résultats, car les analyses d'enrichissement prédisent la « guidance axonale » comme première voie enrichie (**Résultats, partie 3).** L'expression de molécules telles que NCAM1, les sémaphorines et les éphrines, combinées à la présence de leurs récepteurs sur les EC (**Annexe 9C**), suggère un dialogue direct modulant migration et structuration du réseau. Parmi ces acteurs, NCAM1, exclusivement exprimé par les TC d'HI en régression pourrait favoriser les contacts TC-EC et guider l'endothélium par des signaux attractifs comme les sémaphorines de classe 4. Le rôle de guidage « physique » des TC a déjà été documenté dans le cœur, où les observations en microscopie électronique ont montré que les cellules souches cardiaques migrent le long de leurs télopodes [434]. Ces mécanismes putatifs suggèrent alors que les TC

dendritiques exercent aussi un effet sur l'organisation spatiale des vaisseaux persistants, en contribuant activement au processus de remodelage vasculaire. Ces effets pourraient en plus être finement régulés par la disposition des télopodes et la formation de synapses stromales.

Vers la compréhension de la transition angiogénique des TC :

Si une association entre la morphologie et les fonctions des TC a été mise en évidence, les mécanismes qui gouvernent la transition d'un état « inactif » vers un état anti-angiogénique restent à élucider. Les analyses prédictives des *upstream regulators* de nos données de protéomiques suggèrent que cette transition pourrait reposer sur des mécanismes de **reprogrammation/ activation inflammatoire et épigénétique (Résultats, partie 3).**

▪ L'activation inflammatoire :

La première hypothèse concerne l'**activation inflammatoire** des TC au cours du cycle de l'HI. Nos analyses prédictives d'*upstream regulators* mettent en évidence le TNFα parmi les cinq régulateurs les plus probables. Ce résultat suggère que les TC dendritiques présents dans le microenvironnement tumoral pourraient être soumis à une activation inflammatoire soutenue. Le TNFα est en effet un médiateur central de l'inflammation, capable d'induire des modifications transcriptionnelles profondes, en particulier sur les capacités à sécréter des cytokines et remodeler le microenvironnement. Au niveau moléculaire, la signalisation induite par le TNFα est initiée par la fixation du ligand sur ses récepteurs membranaires. Le récepteur TNFR1 est ubiquitaire alors que TNFR2 est restreint au compartiment immunitaire.

La liaison du TNFα sur TNFR1 permet le recrutement de la protéine adaptatrice TRADD (**Figure 87**). Elle permet de recruter et d'activer la kinase TAK1, qui phosphoryle le complexe IκκB, composé des protéines NEMO, IκκBα et IκκBβ. La forme phosphorylée de IκκBβ permet à son tour de phosphoryler la protéine IκB. IκB, sous sa forme phosphorylée est ubiquitinylée et dégradée par le protéasome. Sa dégradation libère le complexe NF-κB, composé de deux sous-unités (p50 et p65), qui transloquent dans le noyau. Dans le noyau, il recrute le coactivateur CBP, pour induire la transcription de gènes cibles. Ceux-ci peuvent être regroupés en plusieurs catégories : (**i**) Cytokines pro-inflammatoires : TNFα, IL-1β, IL-8, PTX3 ou MCP-1 qui favorisent le recrutement des cellules immunitaires ; (**ii**) Facteurs anti-angiogéniques : TSP-1, IGFBP-3, NTN1, CXCL10 qui limitent la néo angiogenèse ; (**iii**) Médiateurs du remodelage matriciel : MMP-2, MMP-9, VCAM et (**iv**) Gènes de survie comme Bcl-2 qui bloquent l'apoptose. Nos données préliminaires (**Annexe 12E**) ont en effet confirmé que l'ajout de TNFα

recombinant dans les cultures cellulaires de TC inactifs (TC HI prolifératif et TC physiologiques) permettaient d'activer la transcription des gènes anti-angiogéniques étudiés au cours de ce travail (PTX3, NTN1, TSP-1 et IGFBP-3). Il favorise l'acquisition d'un phénotype anti-angiogénique, similaire à celui des TC dendritiques, même lorsqu'ils ne présentaient initialement pas ces propriétés. Le TNFα apparaît ainsi comme un candidat pertinent pour induire l'état anti-angiogénique des TC. Des études complémentaires seront néanmoins nécessaires pour déterminer si cette stimulation s'accompagne d'un véritable changement morphologique et d'une reprogrammation moléculaire, rapprochant ces cellules de l'état observé chez les TC dendritiques, issus d'HI involutifs.

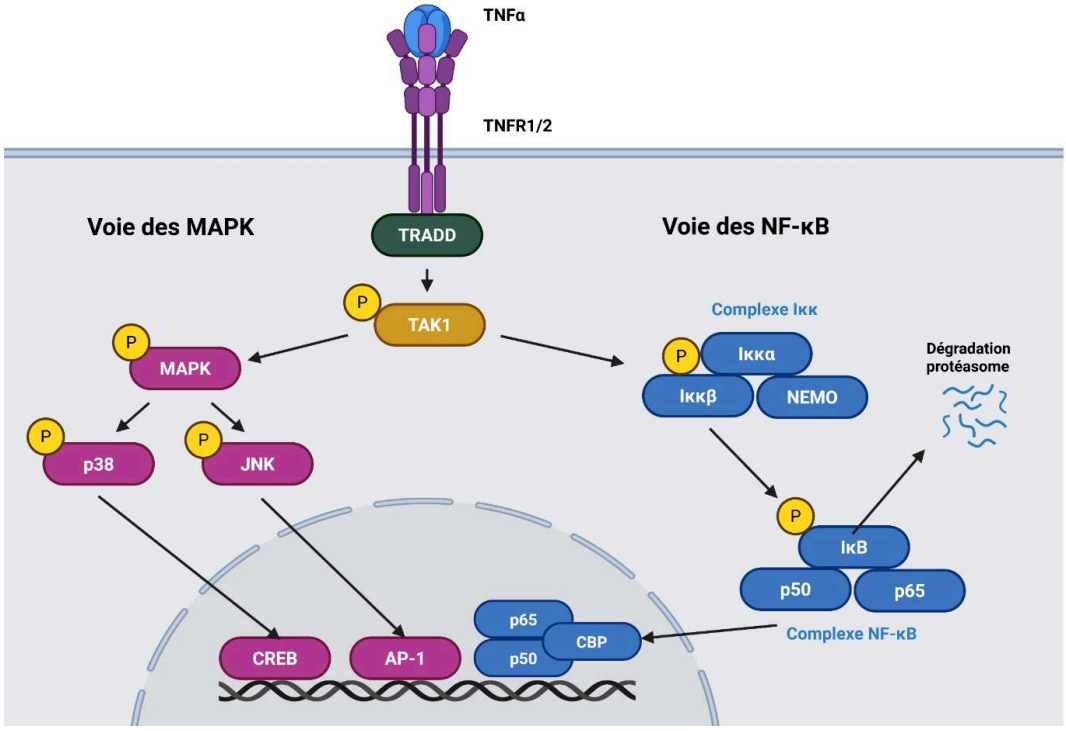


Figure 87: Signalisation du TNFα

Créé sur Biorender

Dans l'HI, la source naturelle de TNFα peut être multiple. Les EC, soumises à des contraintes environnementales fortes pourraient en produire. En particulier, le stress oxydatif et le stress cellulaire liés à la croissance rapide de la tumeur constituent des signaux connus pour induire la production locale de TNFα principalement sous l'activation du facteur de transcription NF-κB lui-même[506,507]. Le TNFα est synthétisé sous forme de pro- TNFα, ancré à la membrane plasmique. Cette forme membranaire est biologiquement active et peut agir de manière juxtacrine. Aussi, le clivage extra-cellulaire de la forme membranaire est assuré par la protéase TACE (ADAM17), qui est exprimée dans

le derme par les EC, les TC et les fibroblastes (**Annexe 13A**). En plus de l'inflammation, d'autres éléments contribuent au déclenchement de sa production. C'est notamment le cas de l'hypoxie, du stress oxydatif (ROS), du stress mécanique et hémodynamique ainsi que le stress métabolique (acidose). Ainsi, la production de TNFα pourrait s'accentuer en fin de phase proliférative. L'augmentation de la masse cellulaire, associée à la présence de nombreux vaisseaux immatures et mal perfusés contribue à une hypoxie et une compression cellulaire marquées, source de stress cellulaire.

Parallèlement, d'anciens travaux montrent que la transition de la prolifération vers la régression semblerait s'accompagner d'une repolarisation des macrophages vers un phénotype M1[327,508]. Ces macrophages constituent aussi une source majeure de TNFα, qu'ils sécrètent de manière soutenue et massive[508].

Un autre aspect à considérer est l'impact potentiel du propranolol sur la production de TNFα (**Figure 88**). Une étude suggère en effet que ce traitement pourrait stimuler la signalisation voire la production de TNFα par les EC[300]. Ce phénomène pourrait s'expliquer par l'inhibition de la voie β-adrénergique, connue pour exercer un effet de frein sur la signalisation NF-κB. L'activation des récepteurs β-adrénergiques et des petites protéines G active l'adénylate cyclase. L'adénylate cyclase convertit l'ATP en AMP cyclique (AMPc), ce qui active la voie des MAPK ainsi que la *Protein Kinase A* (PKA)[509,510]. Cette dernière agit comme un régulateur négatif de NF-κB par plusieurs mécanismes complémentaires : (**i**) En phosphorylant CREB, PKA augmente son affinité pour le coactivateur CBP, réduisant sa disponibilité pour le complexe NF-κB ; (**ii**) Parmi les gènes activés par CREB figure *NFKBIA*, qui code pour l'inhibiteur IκB, favorisant la rétention cytosolique de NF-κB ; (**iii**) PKA peut phosphoryler la sous-unité p65 de NF-κB, diminuant son affinité pour CBP, ainsi que TAK1, ce qui limite l'activation du complexe Iκκ.

Ainsi, en bloquant la voie β-adrénergique, le propranolol supprime ces mécanismes inhibiteurs et favorise une activation de NF-κB, pouvant conduire à une augmentation de la transcription et de la sécrétion de TNFα par les EC.

Nos récentes données préliminaires montrent que le milieu conditionné d'EC traitées par propranolol stimule la production des gènes inductibles au TNFα, comme *PTX3 (**Annexe 13F, G***).

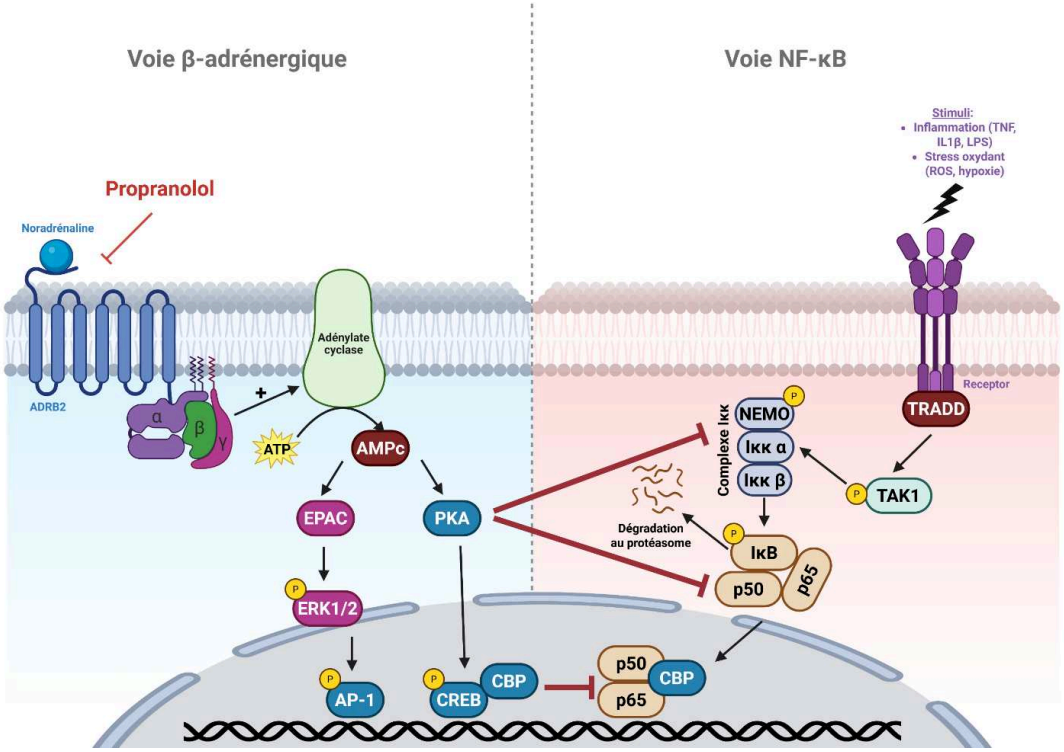


Figure 88: Hypothèse du crosstalk de la voie β-adrénergique et NF-κB

Créé sur Biorender

- **<u>La reprogrammation épigénétique :</u>**

Dans l'HI, l'absence de mutations récurrentes majeures identifiées et la réversibilité des états cellulaires suggèrent que la transition des TC repose largement sur une **reprogrammation épigénétique** plutôt que sur des altérations génomiques fixes. Nos analyses prédictives de protéomique indiquant l'activation du complexe SWI/SNF (BAF) convergent avec cette hypothèse.
Le complexe SWI/SNF se compose de plusieurs sous-unités, comprenant notamment SMARCA4 et ARID1A, prédites comme actives en protéomique (**Figure 89**).

Il est impliqué dans la décondensation de la chromatine. En effet, il déplace et éjecte les nucléosomes des gènes à exprimer, afin de libérer l'ADN, alors accessible par les facteurs de transcription spécifiques. Il antagonise aussi le complexe PRC2, levant alors la répression exercée par les marques H3K27me3[511]. Ses bromodomaines reconnaissent des marques épigénétiques activatrices des *enhancers*, comme l'H3K27ac ou l'H3K4me1 ce qui lui permet de se positionner au niveau des gènes à transcrire[512,513].

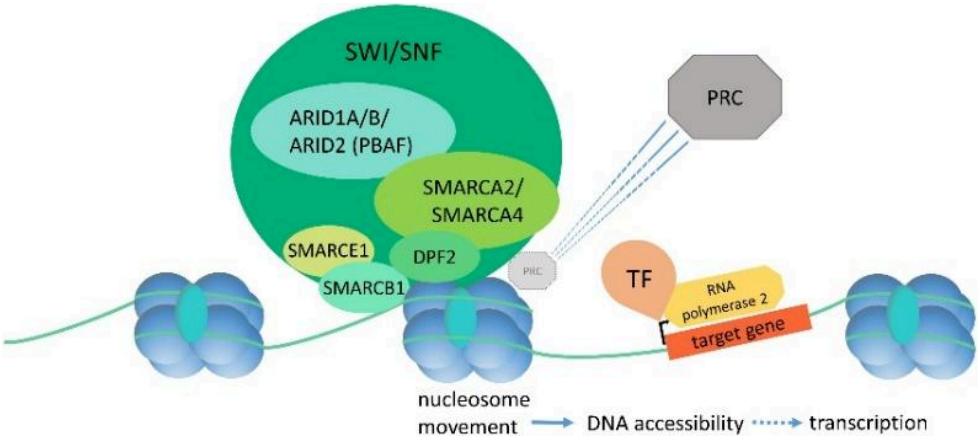


Figure 89: Structure du complexe SWI/SNF[514]

Le complexe SWI/SNF est essentiel à la mise en route et au maintien de programmes de différenciation. Dans plusieurs modèles, notamment de myogenèse et neurogenèse, l'inhibition de SMARCA4 bloque l'engagement différenciatif, alors que son activation favorise la transition vers un état spécialisé[515]. Il agit de façon active dans les cellules peu différenciées, ce qui, selon nos résultats précédemment présentés, est suggéré pour les TC. En reprogrammation cellulaire, il favorise la reconfiguration de la chromatine pour permettre les changements d'identité. Dans le cancer, il joue un rôle clé de gardien de la différenciation. Sa perte, dans 20% des tumeurs malignes, empêche l'engagement dans des programmes spécialisés, favorisant des états indifférenciés associés à l'agressivité tumorale[505].

Dans notre contexte, ce complexe pourrait constituer un moteur central de la transition phénotypique et angiogénique des TC. L'activation d'ARID1A/SMARCA4 favoriserait l'ouverture des régions de chromatine associées à l'activation des propriétés anti-angiogéniques. Le gène de PTX3 possède notamment des *enhancers* enrichis en H3K27ac[136]. De manière similaire, le gène codant pour la TSP-1 a déjà été relié à la présence d'ARID1A sur ses régions régulatrices[512].

Plusieurs signaux présents dans le microenvironnement de l'HI en régression pourraient expliquer son activation dans les TC. Sur le plan fonctionnel, l'inflammation (NF-κB), l'hypoxie chronique (HIF1α) ou les contraintes mécaniques favorisent le recrutement et l'activité de ARID1A et SMARCA4.

- **<u>Vision intégrée du processus de transition fonctionnelle des TC :</u>**

Les deux hypothèses que nous proposons, centrées sur l'inflammation et sur les régulations épigénétiques ne sont pas forcément exclusives et peuvent être complémentaires (**Figure 90**). L'inflammation, l'hypoxie et le stress mécanique stimulent d'une part la production de TNFα par les EC et d'autre part, l'expression des composants du complexe SWI/SNF (ARID1A, SMARCA4) dans les TC.

Le TNFα se lie à son récepteur TNFR1 sur les TC et active les voies MAPK et NF-κB, conduisant à la translocation nucléaire d'AP-1 et de NF-κB. Ces facteurs de transcription se fixent sur des régions *enhancers*, et NF-κB favorise en parallèle le recrutement du complexe SWI/SNF. Le complexe SWI/SNF décale les nucléosomes et ouvre la chromatine au niveau des *enhancers* et du promoteur des gènes cibles, permettant le recrutement de la machinerie transcriptionnelle, la liaison des facteurs de transcription des *enhancers* et l'initiation de la transcription. Parmi les gènes activés se trouvent des acteurs clés de l'inflammation, du remodelage matriciel et surtout du blocage de l'angiogenèse, expliquant la transition des TC inactifs vers des TC anti-angiogéniques.

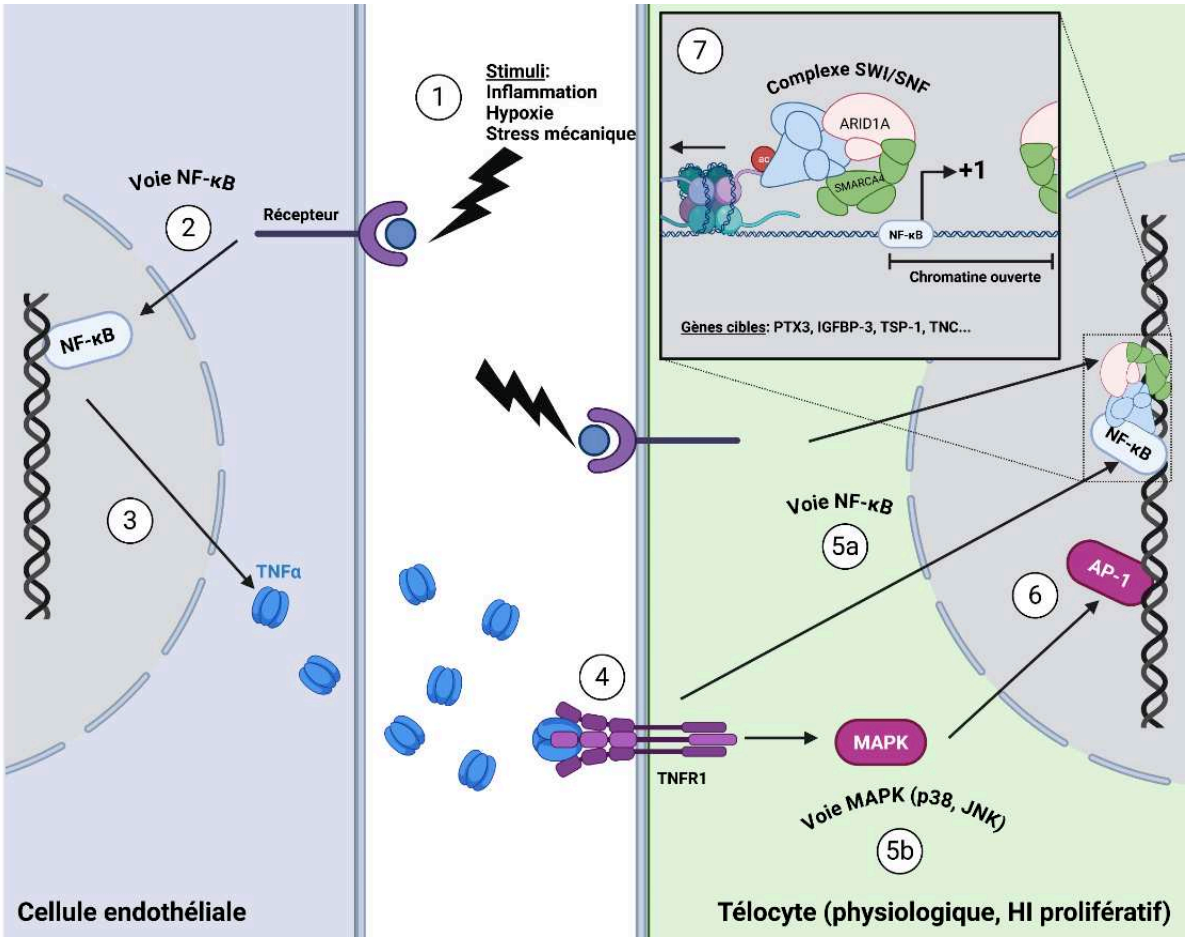


Figure 90: Hypothèse du crosstalk de la reprogrammation inflammatoire et épigénétique

De futures expériences d'activation de TC inactifs par le TNFα avec ou sans inhibiteurs du complexe SWI/SNF (siRNA, CRISPRi ou l'inhibiteur pharmacologique PFI-3) permettront de confirmer ou non si la transition phénotypique est dépendante de ce complexe moléculaire.

La caractérisation en ATAC-seq des TC traités ou non au TNFα permettra de cartographier l'accessibilité de la chromatine au cours de la transition des TC. En comparant les profils d'accessibilité

avant et après stimulation, nous pourrions identifier les régions génomiques qui s'ouvrent spécifiquement, notamment au niveau des enhancers de *PTX3* et de *THBS1*. L'inhibition de SWI/SNF, suivie d'ATAC-seq permettra de vérifier si l'ouverture de ces régions dépend bien de ce complexe régulateur. L'intégration de ces données avec des profils de ChIP-seq (contre NF-kB et AP-1) renforcera aussi le lien entre l'accessibilité et le recrutement des facteurs de transcription.

- **Limites et futures approches : caractérisation par Single-Cell transcriptomique**

Nos données de protéomique en *bulk* apportent une première vision intégrée des voies activées dans les TC dendritiques, mais elles sont limitées par l'effet de moyenne qui masque l'hétérogénéité et les états intermédiaires. De plus, dans nos analyses, nous avons comparé des TC physiologiques à ceux isolés d'HI en phase involutive. Ces données fournissent des indications précieuses au vu de la proximité des TC physiologiques et ceux de la phase prolifération. Néanmoins, pour réellement comprendre les mécanismes de transition phénotypique et fonctionnelle, il serait idéal de comparer directement des TC issus d'HI à différents stades évolutifs. Cette approche est rendue difficile par une contrainte technique majeure : la plupart des approches omiques nécessitent un grand nombre de cellules, ce qui impose de mettre les TC en culture afin d'amplifier la faible proportion obtenue après tri. Or, les TC d'HI prolifératifs ne se maintiennent pas en culture et perdent rapidement leurs caractéristiques initiales. En revanche, grâce à leur grande sensibilité, les approches de Single-Cell transcriptomique permettent d'analyser directement les cellules après dissociation tumorale et enrichissement cellulaire, sans passage en culture et d'explorer ainsi la diversité des états cellulaires, les trajectoires de transition et les programmes moléculaires associés.

Cette étude est déjà engagée et les échantillons préparés sont en cours d'analyse. Les résections tumorales d'HI à différents stades ont été dissociées et enrichies en cellules $CD34^+$ (EC et TC), afin d'analyser directement ces populations sans passage en culture (**Figure 91**).

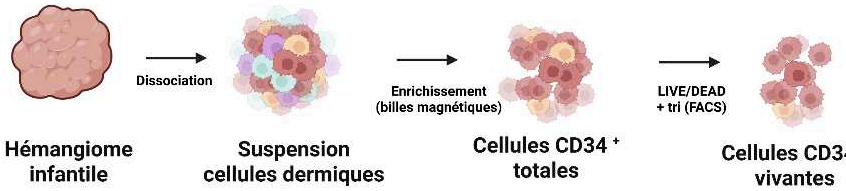


Figure 91: Protocole de préparation des cellules pour l'analyse Single-Cell transcriptomique

L'analyse bio-informatique des données permettra d'explorer la transition des TC à plusieurs niveaux. Dans un premier temps, l'identification de gènes différentiellement exprimés et de signatures transcriptomiques spécifiques entre TC issus d'HI prolifératifs et involutifs permettra de définir les marqueurs associés à chaque état. L'approche de clustering mettra en évidence l'hétérogénéité cellulaire et permettra d'estimer le nombre de sous-populations distinctes, incluant d'éventuels états intermédiaires, traduisant une dynamique de transition. Des analyses de trajectoires pseudo-temporelles (ex : Monocle) permettront ensuite de reconstituer la progression des TC et de prédire si les TC d'HI prolifératifs évoluent effectivement vers les TC involutifs, et de prédire les étapes moléculaires qui jalonnent cette reprogrammation. Enfin, l'étude des interactions ligands-récepteurs (ex : Liana) entre les sous-populations de TC et les EC offrira des informations précieuses sur la façon dont les différents états des TC influencent la dynamique vasculaire de l'HI.

Perspectives :

L'HI constitue un modèle unique de régression et de normalisation vasculaire et nos résultats suggèrent que les TC peuvent adopter un état protecteur anti-angiogénique. Transposé au contexte d'angiogenèse pathologique, ce processus pourrait être exploité pour induire une normalisation vasculaire, approche considérée aujourd'hui comme un levier thérapeutique prometteur. Le mélanome, par exemple, représente une tumeur hautement vasculaire et agressive, dont la progression et le potentiel métastatique sont étroitement liés à la dynamique des vaisseaux. Pourtant, les thérapies anti-angiogéniques classiques s'y sont révélées inefficaces, suggérant que la simple inhibition d'une voie pro-angiogénique ne suffit pas. Dans ce contexte, la capacité des TC à induire un état vasculaire normalisé par des actions multiples pourrait constituer une alternative innovante, visant non pas à détruire les vaisseaux, mais à en restaurer la structure et la fonction. De manière similaire, certaines anomalies vasculaires comme les hémangiomes congénitaux, qui ne répondent pas au propranolol, et les formes non ou partiellement involutives (*NICH* et *PICH*) pourraient bénéficier d'une modulation des TC. Enfin, au-delà des tumeurs, il est envisageable que les propriétés

stabilisatrices des TC puissent également être mises à profit dans le contexte des malformations vasculaires, où la perte d'organisation et de hiérarchisation du réseau vasculaire est au cœur de la pathologie. Ainsi, les projets futurs visant à décrypter les mécanismes gouvernant la transition des TC permettront d'envisager leur reprogrammation artificielle, soit en laboratoire pour développer des approches de thérapie cellulaire, soit directement *in vivo* via des traitements ciblant les voies impliquées. À terme, les TC pourraient devenir des outils de modulation de la vascularisation pathologique, ouvrant la voie à de nouvelles stratégies anti-cancéreuses et vasculo-correctrices.

CONCLUSION

Ce travail de thèse a permis de mieux définir l'identité et les fonctions des TC cutanés, notamment en les distinguant des fibroblastes par des marqueurs spécifiques et également en définissant leur rôle unique de cellules plastiques, communicantes et immunomodulatrices. Les rôles identifiés semblent l'inscrire en acteur majeur de l'homéostasie vasculaire.

Dans l'HI, le développement de Skin-iDISCO$^+$ a permis de suivre, pour la première fois, la morphométrie 3D du réseau vasculaire de l'HI au cours de sa régression. Cette analyse révèle un processus de normalisation vasculaire progressive, marqué par l'élimination des vaisseaux aberrants par pruning et la maturation des segments persistants, conduisant à une architecture plus physiologique. Ce remodelage s'accompagne d'un changement phénotypique et fonctionnel des TC périvasculaires, qui adoptent une morphologie dendritique et acquièrent des propriétés anti-angiogéniques paracrines majeures. Parmi les médiateurs identifiés, la PTX3 joue un rôle central en piégeant le FGF-2 et inhibant la signalisation FGF-2/FGFR-1, contribuant à rééquilibrer les signaux angiogéniques disponibles. D'autres acteurs, identifiés par nos approches de screening, actuellement en cours de validation pourraient aussi participer à cette reprogrammation angiogénique et au rééquilibrage des facteurs angiogéniques. Nos données préliminaires d'analyse de protéomique suggèrent que le changement phénotypique des TC reposerait sur une double reprogrammation, inflammatoire et épigénétique, conférant aux TC une plasticité fonctionnelle contrôlée. L'étude en cours de Single-Cell transcriptomique permettra de préciser ces trajectoires et d'identifier les états intermédiaires associés à la plasticité. Au-delà du modèle de l'HI, ces travaux positionnent les TC comme des acteurs centraux de la normalisation vasculaire. Exploiter leur capacité de reprogrammation pourrait représenter une nouvelle stratégie thérapeutique, visant non pas à détruire les vaisseaux, mais à restaurer leur structure, leur stabilité et leur fonction dans des contextes d'angiogenèse pathologique, notamment tumorale.

PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

1. Article publié

PECHTIMALDJIAN Léa, CARIO Muriel, TEILLON Jérémie, MARAIS Sébastien, DUPICHAUD Sébastien, REZVANI Hamid-Reza, MOISAN François. Skin-iDISCO^{+}: An optimized tissue-clearing and labeling protocol for morphometric analysis of human cutaneous vasculature.
STAR Protocols. 26 décembre 2024. Doi: 10.1016/j.xpro.2024.103524

2. Article soumis

PECHTIMALDJIAN Léa, JULLIE Marie-Laure, IDRISSI Yamina, LOOT Maya, CARIO Muriel, PREY Sorilla, TAIEB Alain, LEAUTE-LABREZE Christine, MATHIVET Thomas, MOISAN François. Telocytes-derived pentraxin-3 enables vascular pruning as a key driver in infantile hemangioma resolution. PNAS. En revision.

3. Articles en préparation

PECHTIMALDJIAN Léa*, ROUSSON Chloé*, IDRISSI Yamina, MATHIVET Thomas*, MOISAN François*. The axonal guidance factor netrin-1 secreted by telocytes drives anti-angiogenic and remodeling mechanisms during vascular regression in infantile hemangioma. En preparation.

PECHTIMALDJIAN Léa*, CLACHET Julie*, CLAVEROL Stéphane, CARIO Muriel*, MOISAN François*. Molecular and functional profiling of cutaneous telocytes from normal and infantile hemangiomas tissues. En preparation.

FERTITTA Laura, PASMANT Eric, BERGQVIST Christina, BEN KAHLA Marouanne, AYACHE Houda, MORYOUSSEF Sabine, FERKAL Salah, LE CORVOISIER Philippe, LUNATI-ROZIE Ariane, FUNALOT Benoit, DUONG Tu-Anh, BARAU Caroline, KALTENBACH Sophie, VILLARESE Patrick, MORICE-PICARD Fanny, LABREZE Christine, MARY-PREY Sorilla, MASLIAH PLANCHON Julien, PACOT Laurence, VIDAUD Dominique, SERRA Edu, LEGIUS Eric, FROST Michael, SARNOFF Herb, **PECHTIMALDJIAN Léa**, MOISAN François, EZZEDINE Khaled, TOPILKO Piotr, ORTONNE Nicolas et WOLKENSTEIN Pierre. Cherry angiomas as a specific feature in neurofibromatosis 1. En préparation, JAMA Dermatology.

4. Communications et congrès

4.1. Communications orales

- Congrès annuel de recherche en dermatologie. Poitier, France. 26-27 juin 2025. Poitier, France. Flash communication. **PECHTIMALDJIAN Léa**, JULLIE Marie-Laure, LOOT Maya, LEAUTE-LABREZE Christine, CARIO Muriel, MATHIVET Thomas, MOISAN François. Le télocyte : un nouvel acteur de la régression de la vascularisation tumorale de l'hémangiome infantile cutané. Premier prix jury.

- Congrès de la société française d'angiogenèse. 4-6 juin 2025. Autrans, France. Présentation orale. **PECHTIMALDJIAN Léa**, JULLIE Marie-Laure, LOOT Maya, LEAUTE-LABREZE Christine, CARIO Muriel, MATHIVET Thomas, MOISAN François. Telocyte: a new player in the regression of tumor vasculature in infantile hemangioma. Premier prix jury.

- Congrès annuel de recherche en dermatologie. Lyon, France. 27-28 juin 2024. Communication orale. **PECHTIMALDJIAN Léa**, JULLIE Marie-Laure, LOOT Maya, LEAUTE-LABREZE Christine, CARIO Muriel, MATHIVET Thomas, MOISAN François. Le télocyte : un nouvel acteur de la normalisation vasculaire des tumeurs cutanées ? Exemple de l'hémangiome infantile. Premier prix jury.

- Symposium d'imagerie et modèles 3D. Bordeaux, France. 20 juin 2024.Communication orale. **PECHTIMALDJIAN Léa**, JULLIE Marie-Laure, LEAUTE-LABREZE Christine, TEILLON Jérémie, MARAIS Sébastien, CORDELIERES Fabrice, MATHIVET Thomas, CARIO Muriel, REZVANI Hamid-Reza Hamid, MOISAN François. From volumetric imaging of tumor vascular network to a patient-derived 3D model of infantile hemangioma. Premier prix jury.

- Journée Scientifique du Département Sciences Biologiques et médicales. Flash présentation. Bordeaux, France. 11 décembre 2023. **PECHTIMALDJIAN Léa**, JULLIE Marie-Laure, LOOT Maya, TEILLON Jérémie, LEAUTE-LABREZE Christine, MATHIVET Thomas, CARIO Muriel, REZVANI Hamid-Reza, MOISAN François. Unraveling vascular and telocytes remodeling in cutaneous infantile hemangioma using large-volume 3D imaging. Premier prix public.

- Journée ENLIGHT. Flash présentation. Bordeaux, France. 28-29 septembre 2023. **PECHTIMALDJIAN Léa**, JULLIE Marie-Laure, LOOT Maya, TEILLON Jérémie, LEAUTE-LABREZE Christine, MATHIVET Thomas, CARIO Muriel, REZVANI Hamid-Reza, MOISAN François. Unraveling vascular and telocytes remodeling in cutaneous infantile hemangioma using large-volume 3D imaging. Premier prix public.

4.2. Communications affichées

- Symposium du Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon. Lyon, France. 29-31 janvier 2025. **PECHTIMALDJIAN Léa**, JULLIE Marie-Laure, LOOT Maya, LEAUTE-LABREZE Christine, MATHIVET Thomas, CARIO Muriel, MOISAN François. Telocyte: a new player in the regression of tumor vasculature? Example of infantile hemangioma.

- Journée Scientifique du Département Sciences Biologiques et médicales. Bordeaux, France. 5 décembre 2024. **PECHTIMALDJIAN Léa**, JULLIE Marie-Laure, LOOT Maya, LEAUTE-LABREZE Christine, MATHIVET Thomas, CARIO Muriel, MOISAN François. Telocyte: a new player in the regression of tumor vasculature? Example of infantile hemangioma.

- Journée Scientifique de l'école doctorale Sciences de la Vie et de la Santé. Bordeaux, France. 30 avril 2024. **PECHTIMALDJIAN Léa**, JULLIE Marie-Laure, LOOT Maya, LEAUTE-LABREZE Christine, MATHIVET Thomas, CARIO Muriel, MOISAN François. Are telocytes new players in the normalization of tumor vasculature? Deuxième prix public.

- Journée Scientifique du Département Sciences Biologiques et médicales. Bordeaux, France. 11 décembre 2023. **PECHTIMALDJIAN Léa**, JULLIE Marie-Laure, LOOT Maya, TEILLON Jérémie, LEAUTE-LABREZE Christine, MATHIVET Thomas, CARIO Muriel, REZVANI Hamid-Reza, MOISAN François. Unraveling vascular and telocytes remodeling in cutaneous infantile hemangioma using large-volume 3D imaging. Troisième prix jury.

- Cancéropôle du Grand Sud-Ouest. Arcachon, France. 22-24 novembre 2023. **PECHTIMALDJIAN Léa**, JULLIE Marie-Laure, LOOT Maya, TEILLON Jérémie, LEAUTE-LABREZE Christine, MATHIVET

Thomas, CARIO Muriel, REZVANI Hamid-Reza, MOISAN François. Unraveling vascular and telocytes remodeling in cutaneous infantile hemangioma using large-volume 3D imaging.

- Congrès de la société française d'angiogenèse. Arcachon, France. 11-13 octobre 2023. **PECHTIMALDJIAN Léa**, JULLIE Marie-Laure, LOOT Maya, TEILLON Jérémie, LEAUTE-LABREZE Christine, MATHIVET Thomas, CARIO Muriel, REZVANI Hamid-Reza, MOISAN François. Unraveling vascular and telocytes remodeling in cutaneous infantile hemangioma using large-volume 3D imaging.

- Journée ENLIGHT. Bordeaux, France. 28-29 septembre 2023. **PECHTIMALDJIAN Léa**, JULLIE Marie-Laure, LOOT Maya, TEILLON Jérémie, LEAUTE-LABREZE Christine, MATHIVET Thomas, CARIO Muriel, REZVANI Hamid-Reza, MOISAN François. Unraveling vascular and telocytes remodeling in cutaneous infantile hemangioma using large-volume 3D imaging.

5. Autres

- Interview du département Sciences Biologiques et Médicales : **PECHTIMALDJIAN Léa**, CARIO Muriel et MOISAN François. Skin-iDISCO+ : rendre la peau transparente pour révéler sa vascularisation. Lien : Skin-iDISCO+ : rendre la peau transparente pour révéler sa vascularisation :: Département SBM

- Scientist-stories for Proteintech company: **PECHTIMALDJIAN Léa**. Advancing 3D vascular imaging with FlexAble Technology. Lien: Scientist Stories: Léa Pechtimaldjian on Advancing 3D Vascular Imaging with FlexAble Technology | Proteintech Group

RÉFÉRENCES

1. Service d'angiologie Au Coeur de la Circulation.
2. Fenestrated Capillary Histology. https://animalia-life.club/qa/pictures/fenestrated-capillary-histology.
3. PEAU - Encyclopædia Universalis. https://www.universalis.fr/encyclopedie/peau/.
4. Tout sur la peau - N.A.T STORY COSMÉTIQUES. https://natstory-cosmetiques.fr/tout-sur-la-peau/.
5. (PDF) Etude de l'effet d'un polluant atmosphérique (NO2) sur le microbiote cutané. https://www.researchgate.net/publication/351266516_Etude_de_l%27effet_d%27un_polluant_atmospherique_NO2_sur_le_microbiote_cutane/figures?lo=1.
6. Braverman, I. M. The cutaneous microcirculation. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings* 5, 3–9 (2000).
7. Huggenberger, R. & Detmar, M. The cutaneous vascular system in chronic skin inflammation. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings* 15, 24–32 (2011).
8. Flavahan, N. A. The Normal Structure and Function of the Cutaneous Vascular System. *Raynaud's Phenomenon: From Pathogenesis to Management, Second Edition* 41–59 (2024) doi:10.1007/978-3-031-52581-0_4.
9. Yáñez, C., DeMas-Giménez, G. & Royo, S. Overview of Biofluids and Flow Sensing Techniques Applied in Clinical Practice. *Sensors 2022, Vol. 22, Page 6836* 22, 6836 (2022).
10. Kollias, N. & Baqer, A. Spectroscopic Characteristics of Human Melanin In Vivo. *Journal of Investigative Dermatology* 85, 38–42 (1985).
11. Zijlstra, W. G., Buursma, A. & Meeuwsen-Van Der Roest, W. P. Absorption spectra of human fetal and adult oxyhemoglobin, de-oxyhemoglobin, carboxyhemoglobin, and methemoglobin. *Clin Chem* 37, 1633–1638 (1991).
12. (PDF) In vitro and in vivo applications of reporter genes in Trypanozoon. https://www.researchgate.net/publication/267256602_In_vitro_and_in_vivo_applications_of_reporter_genes_in_Trypanozoon/figures?lo=1.
13. Jacques, S. L. Optical properties of biological tissues: A review. *Phys Med Biol* 58, (2013).
14. Thick skin 2 HES. https://www.histologie.u-bordeaux.fr/Appareil_tegumentaire/4-Peau_Epaisse_2_HES-SA.htm.
15. Molbay, M., Kolabas, Z. I., Todorov, M. I., Ohn, T.-L. & Ert€ Urk, A. A guidebook for DISCO tissue clearing Tissue transparency. *Mol Syst Biol* 17, 9807 (2021).
16. Korytowski, W. & Sarna, T. Bleaching of melanin pigments. Role of copper ions and hydrogen peroxide in autooxidation and photooxidation of synthetic dopa-melanin. *Journal of Biological Chemistry* 265, 12410–12416 (1990).
17. Ertürk, A. *et al.* Three-dimensional imaging of solvent-cleared organs using 3DISCO. *Nat Protoc* 7, 1983–1995 (2012).
18. Renier, N. *et al.* IDISCO: A simple, rapid method to immunolabel large tissue samples for volume imaging. *Cell* 159, 896–910 (2014).
19. Jing, D. *et al.* Tissue clearing of both hard and soft tissue organs with the PEGASOS method. *nature.comD Jing, S Zhang, W Luo, X Gao, Y Men, C Ma, X Liu, Y Yi, A Bugde, BO Zhou, Z ZhaoCell research, 2018•nature.com* https://doi.org/10.1038/s41422-018-0049-z doi:10.1038/s41422-018-0049-z.
20. Deng, Y. *et al.* A robust vessel-labeling pipeline with high tissue clearing compatibility for 3D mapping of vascular networks. *iScience* 27, (2024).
21. Tian, T., Yang, Z. & Li, X. Tissue clearing technique: Recent progress and biomedical applications. *J Anat* 238, 489–507 (2021).
22. Renier, N. *et al.* Mapping of Brain Activity by Automated Volume Analysis of Immediate Early Genes. *Cell* 165, 1789–1802 (2016).
23. Kirst, C. *et al.* Mapping the Fine-Scale Organization and Plasticity of the Brain Vasculature. *Cell* 180, 780-795.e25 (2020).
24. Damon-Soubeyrand, C. *et al.* Three-dimensional imaging of vascular development in the mouse epididymis. *Elife* 12, (2023).
25. Frenkel, N. *et al.* Tissue clearing and immunostaining to visualize the spatial organization of vasculature and tumor cells in mouse liver. https://doi.org/10.3389/fonc.2023.1062926 (2023) doi:10.3389/fonc.2023.1062926.
26. Merlini, M. *et al.* Three-dimensional Imaging of Fibrinogen and Neurovascular Alterations in Alzheimer's Disease. *Methods Mol Biol* 2561, 87 (2023).
27. Cohen, P. *et al.* Three-Dimensional Imaging Provides Detailed Atherosclerotic Plaque Morphology and Reveals Angiogenesis After Carotid Artery Ligation. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.119.315804 (2020) doi:10.1161/CIRCRESAHA.119.315804.

28. Hofmann, J. & Keppler, S. J. Tissue clearing and 3D imaging-putting immune cells into context. https://doi.org/10.1242/jcs.258494 (2021) doi:10.1242/jcs.258494.

29. Hofmann, J., Gadjalova, I., Mishra, R., Ruland, J. & Keppler, S. J. Efficient Tissue Clearing and Multi-Organ Volumetric Imaging Enable Quantitative Visualization of Sparse Immune Cell Populations During Inflammation. *Front Immunol* 11, 599495 (2021).

30. Schubert, R. *et al.* CRISPR-clear imaging of melanin-rich B16-derived solid tumors. *COMMUNICATIONS BIOLOGY* | 6, 370 (2023).

31. Tan, Y. *et al.* 3-Dimensional Optical Clearing and Imaging of Pruritic Atopic Dermatitis and Psoriasis Skin Reveals Downregulation of Epidermal Innervation. *Journal of Investigative Dermatology* 139, 1201–1204 (2019).

32. Lamalice, L., Le Boeuf, F. & Huot, J. Endothelial cell migration during angiogenesis. *Circ Res* 100, 782–794 (2007).

33. Canalis, E., Economides, A. N. & Gazzerro, E. BMP9 et BMP10 dans le remodelage vasculaire périnatal. *Endocr Rev* 24, 218–235 (2013).

34. Andrique, L., Recher, G., Nassoy, P. & Bikfalvi, A. Postnatal vasculogenesis. *Tumor Vascularization* 100, 101–112 (2020).

35. Vittet, D., Buchou, T., Schweitzer, A., Dejana, E. & Huber, P. Targeted null-mutation in the vascular endothelial-cadherin gene impairs the organization of vascular-like structures in embryoid bodies. 94, 6273–6278 (1997).

36. Eichmann, A. *et al.* Ligand-dependent development of the endothelial and hemopoietic lineages from embryonic mesodermal cells expressing vascular endothelial growth factor receptor 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 5141–5146 (1997).

37. Sato, T. N., Qin, Y., Kozak, C. A. & Audus, K. L. Tie-1 and tie-2 define another class of putative receptor tyrosine kinase genes expressed in early embryonic vascular system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 9355–9358 (1993).

38. Caduff, J. H., Fischer, L. C. & Burri, P. H. Scanning electron microscope study of the developing microvasculature in the postnatal rat lung. *Anat Rec* 216, 154–164 (1986).

39. Kolte, D., McClung, J. A. & Aronow, W. S. Vasculogenesis and Angiogenesis. *Translational Research in Coronary Artery Disease: Pathophysiology to Treatment* 49–65 (2016) doi:10.1016/B978-0-12-802385-3.00006-1.

40. Konerding, M. A. *et al.* Inflammation-induced intussusceptive angiogenesis in murine colitis. *Anatomical Record* 293, 849–857 (2010).

41. Mentzer, S. J. & Konerding, M. A. Intussusceptive Angiogenesis: Expansion and Remodeling of Microvascular Networks. *Angiogenesis* 17, 499 (2014).

42. Ricard, N., Bailly, S., Guignabert, C. & Simons, M. The quiescent endothelium: signalling pathways regulating organ-specific endothelial normalcy. *Nat Rev Cardiol* 18, 565–580 (2021).

43. Ramakrishnan, S., Anand, V. & Roy, S. Vascular Endothelial growth factor signaling in hypoxia and Inflammation. *J Neuroimmune Pharmacol* 9, 142 (2014).

44. Szymborska, A. & Gerhardt, H. Hold Me, but Not Too Tight—Endothelial Cell–Cell Junctions in Angiogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 10, a029223 (2018).

45. Gerhardt, H. *et al.* VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *Journal of Cell Biology* 161, 1163–1177 (2003).

46. Suchting, S. & Eichmann, A. Jagged Gives Endothelial Tip Cells an Edge. *Cell* 137, 988–990 (2009).

47. Siemerink, M. J. *et al.* CD34 marks angiogenic tip cells in human vascular endothelial cell cultures. *Angiogenesis* 15, 151 (2012).

48. Ray, J. M. & Stetler-Stevenson, W. G. The role of matrix metalloproteases and their inhibitors in tumour invasion, metastasis and angiogenesis. *European Respiratory Journal* 7, 2062–2072 (1994).

49. Han, K. Y., Chang, J. H., Lee, H. & Azar, D. T. Proangiogenic Interactions of Vascular Endothelial MMP14 With VEGF Receptor 1 in VEGFA-Mediated Corneal Angiogenesis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 57, 3313 (2016).

50. Phng, L. K., Stanchi, F. & Gerhardt, H. Filopodia are dispensable for endothelial tip cell guidance. *Development (Cambridge)* 140, 4031–4040 (2013).

51. Fischer, R. S., Lam, P. Y., Huttenlocher, A. & Waterman, C. M. Filopodia and focal adhesions: An integrated system driving branching morphogenesis in neuronal pathfinding and angiogenesis. *Dev Biol* 451, 86–95 (2019).

52. Fantin, A. *et al.* Tissue macrophages act as cellular chaperones for vascular anastomosis downstream of VEGF-mediated endothelial tip cell induction. *Blood* 116, 829–840 (2010).

53. Kamei, M. *et al.* Endothelial tubes assemble from intracellular vacuoles in vivo. *Nature* 442, 453–456 (2006).

54. Hellström, M., Kalén, M., Lindahl, P., Abramsson, A. & Betsholtz, C. Role of PDGF-B and PDGFR-β in recruitment of vascular smooth muscle cells and pericytes during embryonic blood vessel formation in the mouse. *Development* 126, 3047–3055 (1999).

55. Lindahl, P., Johansson, B. R., Levéen, P. & Betsholtz, C. Pericyte loss and microaneurysm formation in PDGF-B-deficient mice. *Science (1979)* 277, 242–245 (1997).

56. Levéen, P. *et al.* Mice deficient for PDGF B show renal, cardiovascular, and hematological abnormalities. *Genes Dev* 8, 1875–1887 (1994).

57. Nwadozi, E., Rudnicki, M. & Haas, T. L. Metabolic Coordination of Pericyte Phenotypes: Therapeutic Implications. *Front Cell Dev Biol* 8, 514719 (2020).

58. Reynolds, L. E. *et al.* Dual role of pericyte α6β1-integrin in tumour blood vessels. *J Cell Sci* 130, 1583–1595 (2017).

59. Daneman, R., Zhou, L., Kebede, A. A. & Barres, B. A. Pericytes are required for bloodğ€"brain barrier integrity during embryogenesis. *Nature* 468, 562–566 (2010).

60. Fruttiger, M. Development of the retinal vasculature. *Angiogenesis* 10, 77–88 (2007).

61. Duan, L. J. & Fong, G. H. Developmental vascular pruning in neonatal mouse retinas is programmed by the astrocytic oxygen-sensing mechanism. *Development* 146, dev175117 (2019).

62. Dai, C. *et al.* Concurrent Physiological and Pathological Angiogenesis in Retinopathy of Prematurity and Emerging Therapies. *Int J Mol Sci* 22, 4809 (2021).

63. Woods, J. & Biswas, S. Retinopathy of prematurity: from oxygen management to molecular manipulation. *Mol Cell Pediatr* 10, 12 (2023).

64. Franco, C. A. *et al.* Dynamic Endothelial Cell Rearrangements Drive Developmental Vessel Regression. *PLoS Biol* 13, e1002125 (2015).

65. Lenard, A. *et al.* Endothelial Cell Self-fusion during Vascular Pruning. *PLoS Biol* 13, e1002126 (2015).

66. Korn, C. & Augustin, H. G. Mechanisms of Vessel Pruning and Regression. *Dev Cell* 34, 5–17 (2015).

67. Watson, E. C., Grant, Z. L. & Coultas, L. Endothelial cell apoptosis in angiogenesis and vessel regression. *SpringerEC Watson, ZL Grant, L CoultasCellular and Molecular Life Sciences, 2017•Springer* 74, 4387–4403 (2017).

68. Ito, M. & Yoshioka, M. Regression of the hyaloid vessels and pupillary membrane of the mouse. *SpringerM Ito, M YoshiokaAnatomy and embryology, 1999•Springer* 200, 403–411 (1999).

69. Kishimoto, A. *et al.* Histochemical characteristics of regressing vessels in the hyaloid vascular system of neonatal mice: Novel implication for vascular atrophy. *Exp Eye Res* 172, 1–9 (2018).

70. Wang, Z., Liu, C. H., Huang, S. & Chen, J. Assessment and characterization of hyaloid vessels in mice. *J Vis Exp* 2019, 10.3791/59222 (2019).

71. Modlich, U., Kaup, F. J. & Augustin, H. G. Cyclic angiogenesis and blood vessel regression in the ovary: blood vessel regression during luteolysis involves endothelial cell detachment and vessel occlusion. *Lab Invest* 74, 771–780 (1996).

72. Walker, N. I., Bennett, R. E. & Kerr, J. F. R. Cell death by apoptosis during involution of the lactating breast in mice and rats. *American Journal of Anatomy* 185, 19–32 (1989).

73. Watson, E. C., Whitehead, L., Adams, R. H., Dewson, G. & Coultas, L. Endothelial cell survival during angiogenesis requires the pro-survival protein MCL1. *nature.comEC Watson, L Whitehead, RH Adams, G Dewson, L CoultasCell Death & Differentiation, 2016•nature.com* 23, 1371–1379 (2016).

74. Lobov, I. *et al.* WNT7b mediates macrophage-induced programmed cell death in patterning of the vasculature. *nature.comIB Lobov, S Rao, TJ Carroll, JE Vallance, M Ito, JK Ondr, S Kurup, DA Glass, MS PatelNature, 2005•nature.com* https://www.nature.com/articles/nature03928.

75. Mitchell, C. A., Risau, W. & Drexler, H. C. A. Regression of vessels in the tunica vasculosa lentis is initiated by coordinated endothelial apoptosis: A role for vascular endothelial growth factor as a survival factor for endothelium. *Developmental Dynamics* 213, 322–333 (1998).

76. Olsson, A. K., Dimberg, A., Kreuger, J. & Claesson-Welsh, L. VEGF receptor signalling ? in control of vascular function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology 2006 7:5* 7, 359–371 (2006).

77. Xu, Y. *et al.* Neuropilin-2 mediates VEGF-C-induced lymphatic sprouting together with VEGFR3. *Journal of Cell Biology* 188, 115–130 (2010).

78. Alitalo, K., Tammela, T. & Petrova, T. V. Lymphangiogenesis in development and human disease. *Nature 2005 438:7070* 438, 946–953 (2005).

79. Bokhari, S. M. Z. & Hamar, P. Vascular Endothelial Growth Factor-D (VEGF-D): An Angiogenesis Bypass in Malignant Tumors. *International Journal of Molecular Sciences 2023, Vol. 24, Page 13317* 24, 13317 (2023).

80. Senger, D. R. *et al.* Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science (1979)* 219, 983–985 (1983).

81. Leung, D. W., Cachianes, G., Kuang, W. J., Goeddel, D. V. & Ferrara, N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science (1979)* 246, 1306–1309 (1989).

82. Forsythe, J. A. *et al.* Activation of Vascular Endothelial Growth Factor Gene Transcription by Hypoxia-Inducible Factor 1. *Mol Cell Biol* 16, 4604–4613 (1996).

83. Gavard, J. & Gutkind, J. S. VEGF Controls endothelial-cell permeability promoting β-arrestin-dependent Endocytosis VE-cadherin. *Nat Cell Biol* 8, 1223–1234 (2006).

84. Abedi, H. & Zachary, I. Vascular endothelial growth factor stimulates tyrosine phosphorylation and recruitment to new focal adhesions of focal adhesion kinase and paxillin in endothelial cells. *Journal of Biological Chemistry* 272, 15442–15451 (1997).

85. Chen, X. L. *et al.* VEGF-Induced Vascular Permeability Is Mediated by FAK. *Dev Cell* 22, 146–157 (2012).

86. Nilsson, M. & Heymach, J. V. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Pathway. *Journal of Thoracic Oncology* 1, 768–770 (2006).

87. Xie, Y. *et al.* FGF/FGFR signaling in health and disease. *Signal Transduct Target Ther* 5, 181 (2020).

88. Itoh, N., Ohta, H., Nakayama, Y. & Konishi, M. Roles of FGF signals in heart development, health, and disease. *Front Cell Dev Biol* 4, 215638 (2016).

89. Ornitz, D. M. & Itoh, N. The fibroblast growth factor signaling pathway. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* 4, 215–266 (2015).

90. Beenken, A. & Mohammadi, M. The FGF family: biology, pathophysiology and therapy. *Nature Reviews Drug Discovery 2009 8:3* 8, 235–253 (2009).

91. Friesel, R. E. & Maciag, T. Molecular mechanisms of angiogenesis: fibroblast growth factor signal transduction. *The FASEB Journal* 9, 919–925 (1995).

92. Murakami, M. & Simons, M. Regulation of vascular integrity. *J Mol Med* 87, 571–582 (2009).

93. Seghezzi, G. *et al.* Fibroblast growth factor-2 (FGF-2) induces vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in the endothelial cells of forming capillaries: An autocrine mechanism contributing to angiogenesis. *Journal of Cell Biology* 141, 1659–1673 (1998).

94. Ye, F. *et al.* Advancements in clinical aspects of targeted therapy and immunotherapy in breast cancer. *Mol Cancer* 22, (2023).

95. Balasubramanian, R. & Zhang, X. Mechanisms of FGF gradient formation during embryogenesis. *Semin Cell Dev Biol* 53, 94 (2015).

96. Hua, L. *et al.* Dietary Intake Regulates White Adipose Tissues Angiogenesis via Liver Fibroblast Growth Factor 21 in Male Mice. *Endocrinology* 162, 1–11 (2021).

97. Li, R. *et al.* Fibroblast Growth Factor 13 Facilitates Peripheral Nerve Regeneration through Maintaining Microtubule Stability. *Oxid Med Cell Longev* 2021, 5481228 (2021).

98. Osher, E. & Macaulay, V. M. Therapeutic Targeting of the IGF Axis. *Cells 2019, Vol. 8, Page 895* 8, 895 (2019).

99. LeRoith, D., Holly, J. M. P. & Forbes, B. E. Insulin-like growth factors: Ligands, binding proteins, and receptors. *Mol Metab* 52, 101245 (2021).

100. Saldana, S. M. The Role of Type I Insulin-Like Growth Factor Receptor Signaling in Breast Cancer Brain Metastasis. (2013).

101. Hintz, R. L. & Liu, F. Demonstration of Specific Plasma Protein Binding Sites For Somatomedin. *J Clin Endocrinol Metab* 45, 988–995 (1977).

102. Guler, H. P., Zapf, J., Schmid, C. & Froesch, E. R. Insulin-like growth factors I and II in healthy man. *Acta Endocrinol (Copenh)* 121, 753–758 (1989).

103. Kim, H. *et al.* Structural basis for assembly and disassembly of the IGF/IGFBP/ALS ternary complex. *Nat Commun* 13, 4434 (2022).

104. Yamada, P. M. & Lee, K. W. Perspectives in mammalian IGFBP-3 biology: Local vs. systemic action. *Am J Physiol Cell Physiol* 296, (2009).

105. Kendall, R. L. & Thomas, K. A. Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 10705–10709 (1993).

106. Kinghorn, K. *et al.* A defined clathrin-mediated trafficking pathway regulates sFLT1/VEGFR1 secretion from endothelial cells. *Angiogenesis 2023 27:1* 27, 67–89 (2023).

107. Wu, W. K. *et al.* IL-4 Regulates Specific Arg-1+ Macrophage sFlt-1-Mediated Inhibition of Angiogenesis. *American Journal of Pathology* 185, 2324–2335 (2015).

108. Maynard, S. E. *et al.* Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *Journal of Clinical Investigation* 111, 649–658 (2003).

109. Adams, J. C. & Lawler, J. Cell-type specific adhesive interactions of skeletal myoblasts with thrombospondin-1. *Mol Biol Cell* 5, 423 (1994).

110. Mumby, S. M., Abbott-Brown, D., Raugi, G. J. & Bornstein, P. Regulation of thrombospondin secretion by cells in culture. *J Cell Physiol* 120, 280–288 (1984).

111. Taraboletti, G., Roberts, D., Liotta, L. A. & Giavazzi, R. Platelet thrombospondin modulates endothelial cell adhesion, motility, and growth: A potential angiogenesis regulatory factor. *Journal of Cell Biology* 111, 765–772 (1990).

112. Wang, S., Wu, Z., Sorenson, C. M., Lawler, J. & Sheibani, N. Thrombospondin-1–deficient mice exhibit increased vascular density during retinal vascular development and are less sensitive to hyperoxia-mediated vessel obliteration. *Developmental Dynamics* 228, 630–642 (2003).

113. Gupta, K., Gupta, P., Wild, R., Ramakrishnan, S. & Hebbel, R. P. Binding and displacement of vascular endothelial growth factor (VEGF) by thrombospondin: Effect on human microvascular endothelial cell proliferation and angiogenesis. *Angiogenesis* 3, 147–158 (1999).

114. Zhang, X. *et al.* Thrombospondin-1 modulates vascular endothelial growth factor activity at the receptor level. *The FASEB Journal* 23, 3368–3376 (2009).

115. Chu, L. Y., Ramakrishnan, D. P. & Silverstein, R. L. Thrombospondin-1 modulates VEGF signaling via CD36 by recruiting SHP-1 to VEGFR2 complex in microvascular endothelial cells. *Blood* 122, 1822–1832 (2013).

116. Hammond, E., Khurana, A., Shridhar, V. & Dredge, K. The Role of Heparanase and Sulfatases in the Modification of Heparan Sulfate Proteoglycans within the Tumor Microenvironment and Opportunities for Novel Cancer Therapeutics. *Front Oncol* 4, 195 (2014).

117. Wang, S. *et al.* QSulf1, a heparan sulfate 6-O-endosulfatase, inhibits fibroblast growth factor signaling in mesoderm induction and angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 4833–4838 (2004).

118. Breviario, F. *et al.* Interleukin-1-inducible genes in endothelial cells. Cloning of a new gene related to C-reactive protein and serum amyloid P component. *Journal of Biological Chemistry* 267, 22190–22197 (1992).

119. Basile, A. *et al.* Characterization of the promoter for the human long pentraxin PTX3: Role of NF-κB in tumor necrosis factor-α and interleukin-1β regulation. *Journal of Biological Chemistry* 272, 8172–8178 (1997).

120. Noone, D. P. *et al.* PTX3 structure determination using a hybrid cryoelectron microscopy and AlphaFold approach offers insights into ligand binding and complement activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 119, (2022).

121. Inforzato, A. *et al.* The angiogenic inhibitor long pentraxin PTX3 forms an asymmetric octamer with two binding sites for FGF2. *Journal of Biological Chemistry* 285, 17681–17692 (2010).

122. Balhara, J., Koussih, L., Zhang, J. & Gounni, A. S. Pentraxin 3: An immuno-regulator in the lungs. *Front Immunol* 4, 48773 (2013).

123. Vouret-Craviari, V. *et al.* Expression of a long pentraxin, PTX3, by monocytes exposed to the mycobacterial cell wall component lipoarabinomannan. *Infect Immun* 65, 1345–1350 (1997).

124. Norata, G. D. *et al.* Long pentraxin 3, a key component of innate immunity, is modulated by high-density lipoproteins in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28, 925–931 (2008).

125. Guo, P., Zhang, S. Z., He, H., Zhu, Y. T. & Tseng, S. C. G. PTX3 Controls Activation of Matrix Metalloproteinase 1 and Apoptosis in Conjunctivochalasis Fibroblasts. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 53, 3414 (2012).

126. Daigo, K., Mantovani, A. & Bottazzi, B. The yin-yang of long pentraxin PTX3 in inflammation and immunity. *Immunol Lett* 161, 38 (2014).

127. Garianda, C. *et al.* Non-redundant role of the long pentraxin PTX3 in anti-fungal innate immune response. *Nature* 420, 182–186 (2002).

128. Bozza, S. *et al.* Pentraxin 3 protects from MCMV infection and reactivation through TLR sensing pathways leading to IRF3 activation. *Blood* 108, 3387–3396 (2006).

129. Dias, A. A. M. *et al.* TSG-14 transgenic mice have improved survival to endotoxemia and to CLP-induced sepsis. *J Leukoc Biol* 69, 928–936 (2001).

130. Camozzi, M. *et al.* Identification of an antiangiogenic FGF2-binding site in the N terminus of the soluble pattern recognition receptor PTX3. *Journal of Biological Chemistry* 281, 22605–22613 (2006).

131. Presta, M., Foglio, E., Schuind, A. C. & Ronca, R. Long Pentraxin-3 Modulates the Angiogenic Activity of Fibroblast Growth Factor-2. *Front Immunol* 9, 2327 (2018).

132. Rusnati, M. *et al.* Selective recognition of fibroblast growth factor-2 by the long pentraxin PTX3 inhibits angiogenesis. *Blood* 104, 92–99 (2004).

133. Camaioni, A., Klinger, F. G., Campagnolo, L. & Salustri, A. The influence of pentraxin 3 on the ovarian function and its impact on fertility. *Front Immunol* 9, 425501 (2018).

134. Shindo, A. *et al.* Astrocyte-derived pentraxin 3 supports blood-brain barrier integrity under acute phase of stroke. *Stroke* 47, 1094–1100 (2016).

135. Jiang, Y. *et al.* Protective effect of pentraxin 3 on pathological retinal angiogenesis in an in vitro model of diabetic retinopathy. *Arch Biochem Biophys* 725, 109283 (2022).

136. Rubino, M. *et al.* Epigenetic regulation of the extrinsic oncosuppressor PTX3 gene in inflammation and cancer. *Oncoimmunology* 6, e1333215 (2017).

137. Jaillon, S. *et al.* Endogenous PTX3 translocates at the membrane of late apoptotic human neutrophils and is involved in their engulfment by macrophages. *Cell Death Differ* 16, 465–474 (2009).

138. Jaillon, S. *et al.* The humoral pattern recognition receptor PTX3 is stored in neutrophil granules and localizes in extracellular traps. *Journal of Experimental Medicine* 204, 793–804 (2007).

139. Albiston, A. L., Saffery, R. & Herington, A. C. Cloning and characterization of the promoter for the rat insulin-like growth factor-binding protein-3 gene. *Endocrinology* 136, 696–704 (1995).

140. Varma Shrivastav, S., Bhardwaj, A., Pathak, K. A. & Shrivastav, A. Insulin-Like Growth Factor Binding Protein-3 (IGFBP-3): Unraveling the Role in Mediating IGF-Independent Effects Within the Cell. *Front Cell Dev Biol* 8, (2020).

141. Jogie-Brahim, S., Feldman, D. & Oh, Y. Unraveling Insulin-Like Growth Factor Binding Protein-3 Actions in Human Disease. *Endocr Rev* 30, 417 (2009).

142. Bach, L. A. Endothelial cells and the IGF system. *J Mol Endocrinol* 54, R1–R13 (2015).

143. Amabile, G. *et al.* Targeting of the IGFBP3/TMEM219 pathway restores intestinal stem cells capability of healing mucosa in gastrointestinal autoimmune disorders. *Pharmacol Res* 219, 107901 (2025).

144. Schedlich, L. J. *et al.* Nuclear import of Insulin-like Growth Factor-binding Protein-3 and -5 is mediated by the importin β subunit. *Journal of Biological Chemistry* 275, 23462–23470 (2000).

145. Kim, J. H. *et al.* Antiangiogenic antitumor activities of IGFBP-3 are mediated by IGF-independent suppression of Erk1/2 activation and Egr-1–mediated transcriptional events. *Blood* 118, 2622–2631 (2011).

146. Oh, S. H. *et al.* Insulin-like growth factor binding protein-3 suppresses vascular endothelial growth factor expression and tumor angiogenesis in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Sci* 103, 1259 (2012).

147. Lofqvist, C. *et al.* IGFBP3 suppresses retinopathy through suppression of oxygen-induced vessel loss and promotion of vascular regrowth. *PNAS* www.pnas.orgcgidoi10.1073pnas.0702031104 (2007).

148. Woelfle, J. & Rotwein, P. In vivo regulation of growth hormone-stimulated gene transcription by STAT5b. https://doi.org/10.1152/ajpendo.00389.2003.-The (2004) doi:10.1152/ajpendo.00389.2003.-The.

149. Jiangming, L. & Murphy, L. J. Regulation of insulin-like growth factor binding protein-3 expression by dexamethasone. *Mol Cell Endocrinol* 74, 213–219 (1990).

150. Jux, C. *et al.* Dexamethasone Impairs Growth Hormone (GH)-Stimulated Growth by Suppression of Local Insulin-Like Growth Factor (IGF)-I Production and Expression of GH- and IGF-I-Receptor in Cultured Rat Chondrocytes. *Endocrinology* 139, 3296–3305 (1998).

151. Maekawa, T., Takeuchi, S., Kanayama, M. & Takahashi, S. Estradiol, progesterone, and transforming growth factor alpha regulate insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP3) expression in mouse endometrial cells. *Zoolog Sci* 26, 131–138 (2009).

152. Schedlich, L. J., Yenson, V. M. & Baxter, R. C. TGF-β-induced expression of IGFBP-3 regulates IGF1R signaling in human osteosarcoma cells. *Mol Cell Endocrinol* 377, 56–64 (2013).

153. Hanafusa, T. *et al.* Functional promoter upstream p53 regulatory sequence of IGFBP3 that is silenced by tumor specific methylation. *BMC Cancer* 5, 9 (2005).

154. Bunn, R. C. & Fowlkes, J. L. Insulin-like growth factor binding protein proteolysis. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 14, 176–181 (2003).

155. Hoeck, W. G. & Mukku, V. R. Identification of the major sites of phosphorylation in IGF binding protein-3. *J Cell Biochem* 56, 262–273 (1994).

156. Klagsbrun, M. & Eichmann, A. A role for axon guidance receptors and ligands in blood vessel development and tumor angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev* 16, 535–548 (2005).

157. Eichmann, A., Makinen, T. & Alitalo, K. Neural guidance molecules regulate vascular remodeling and vessel navigation. *Genes Dev* 19, 1013–1021 (2005).

158. Fig-1-Structures-of-netrin-1-and-its-receptors-Netrin-1-interacts-with-its-receptors.jpg (850×796). https://www.researchgate.net/publication/359014146/figure/fig1/AS:11431281124484911@1677960286344/Fig-1-Structures-of-netrin-1-and-its-receptors-Netrin-1-interacts-with-its-receptors.jpg.

159. Bradford, D. K., Cole, S. J. & Cooper, H. M. Netrin-1: Diversity in development. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 41, 487–493 (2009).

160. Rajasekharan, S. & Kennedy, T. E. The netrin protein family. *Genome Biol* 10, 239 (2009).

161. Tu, T. *et al.* CD146 acts as a novel receptor for netrin-1 in promoting angiogenesis and vascular development. *Cell Res* 25, 275–287 (2015).

162. Larrivée, B. *et al.* Activation of the UNC5B receptor by Netrin-1 inhibits sprouting angiogenesis. *Genes Dev* 21, 2433 (2007).

163. Freitas, C., Larrivée, B. & Eichmann, A. Netrins and UNC5 receptors in angiogenesis. *Angiogenesis* 11, 23–29 (2008).

164. Boyé, K. *et al.* Endothelial Unc5B controls blood-brain barrier integrity. *Nature Communications 2022 13:1* 13, 1–15 (2022).

165. Luo, P. M., Gu, X., Chaney, C., Carroll, T. & Cleaver, O. Stromal netrin-1 coordinates renal arteriogenesis and mural cell differentiation. *Development (Cambridge)* 150, (2023).

166. Sherwood, L. M., Parris, E. E. & Folkman, J. Tumor Angiogenesis: Therapeutic Implications. *New England Journal of Medicine* 285, 1182–1186 (1971).

167. Hanahan, D. & Folkman, J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 86, 353–364 (1996).

168. Hanahan, D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov* 12, 31–46 (2022).

169. Liu, X. *et al.* Decoding tumor angiogenesis: pathways, mechanisms, and future directions in anti-cancer strategies. *Biomarker Research 2025 13:1* 13, 1–29 (2025).

170. Treps, L. & Gavard, J. Tumor angiogenesis: When the Tree of Life turns bad. *Medecine/Sciences* 31, 989–995 (2015).

171. Nico, B. *et al.* Intussusceptive microvascular growth in human glioma. *Clin Exp Med* 10, 93–98 (2010).

172. Patan, S., Munn, L. L. & Jain, R. K. Intussusceptive Microvascular Growth in a Human Colon Adenocarcinoma Xenograft: A Novel Mechanism of Tumor Angiogenesis. *Microvasc Res* 51, 260–272 (1996).

173. Ribatti, D. *et al.* Microvascular density, vascular endothelial growth factor immunoreactivity in tumor cells, vessel diameter and intussusceptive microvascular growth in primary melanoma. *Oncol Rep* 14, 81–84 (2005).

174. Greenfield, J. P., Cobb, W. S. & Lyden, D. Resisting arrest: a switch from angiogenesis to vasculogenesis in recurrent malignant gliomas. *J Clin Invest* 120, 663–667 (2010).

175. Lyden, D. *et al.* Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth. *Nat Med* 7, 1194–1201 (2001).

176. Maniotis, A. J. *et al.* Vascular Channel Formation by Human Melanoma Cells in Vivo and in Vitro: Vasculogenic Mimicry. *Am J Pathol* 155, 739–752 (1999).

177. Wechman, S. L., Emdad, L., Sarkar, D., Das, S. K. & Fisher, P. B. Vascular mimicry: Triggers, molecular interactions and in vivo models. *Adv Cancer Res* 148, 27 (2020).

178. Angara, K., Borin, T. F. & Arbab, A. S. Vascular Mimicry: A Novel Neovascularization Mechanism Driving Anti-Angiogenic Therapy (AAT) Resistance in Glioblastoma. *Transl Oncol* 10, 650–660 (2017).

179. Hendrix, M. J. C. *et al.* Tumor cell vascular mimicry: Novel targeting opportunity in melanoma. *Pharmacol Ther* 159, 83–92 (2016).

180. Luo, Q. *et al.* Vasculogenic mimicry in carcinogenesis and clinical applications. *Journal of Hematology & Oncology 2020 13:1* 13, 1–15 (2020).

181. Kuczynski, E. A., Vermeulen, P. B., Pezzella, F., Kerbel, R. S. & Reynolds, A. R. Vessel co-option in cancer. *Nature Reviews Clinical Oncology 2019 16:8* 16, 469–493 (2019).

182. García-Gómez, P. & Valiente, M. Vascular co-option in brain metastasis. *Angiogenesis* 23, 3–8 (2020).

183. Carbonell, W. S., Ansorga, O., Sibson, N. & Muschel, R. The Vascular Basement Membrane as "Soil" in Brain Metastasis. *PLoS One* 4, e5857 (2009).

184. Wang, R. *et al.* Glioblastoma stem-like cells give rise to tumour endothelium. *Nature* 468, 829–835 (2010).

185. Nagy, J. A., Chang, S. H., Shih, S. C., Dvorak, A. M. & Dvorak, H. F. Heterogeneity of the Tumor Vasculature. *Semin Thromb Hemost* 36, 321 (2010).

186. Swe, H. W. W. *et al.* The specific shapes of capillaries are associated with worse prognosis in patients with invasive breast cancer. *Pathol Int* 74, 394 (2024).

187. Maj, E., Papiernik, D. & Wietrzyk, J. Antiangiogenic cancer treatment: The great discovery and greater complexity (Review). *Int J Oncol* 49, 1773–1784 (2016).

188. (PDF) Neoadjuvant multimodal therapy in rectal cancer. https://www.researchgate.net/publication/294263061_Neoadjuvant_multimodal_therapy_in_rectal_cancer.

189. Hashizume, H. *et al.* Openings between Defective Endothelial Cells Explain Tumor Vessel Leakiness. *Am J Pathol* 156, 1363 (2000).

190. Morikawa, S. *et al.* Abnormalities in Pericytes on Blood Vessels and Endothelial Sprouts in Tumors. *Am J Pathol* 160, 985 (2002).

191. Nagy, J. A. *et al.* Permeability properties of tumor surrogate blood vessels induced by VEGF-A. *Laboratory Investigation* 86, 767–780 (2006).

192. Stubbs, M., McSheehy, P. M. J., Griffiths, J. R. & Bashford, C. L. Causes and consequences of tumour acidity and implications for treatment. *Mol Med Today* 6, 15–19 (2000).

193. Santos, G. C., Zielenska, M., Prasad, M. & Squire, J. A. Chromosome 6p amplification and cancer progression. *J Clin Pathol* 60, 1 (2006).

194. Yang, J. *et al.* Genetic Amplification of the VEGF Pathway Genes Including VEGFA in Human Osteosarcoma. *Cancer* 117, 4925 (2011).

195. Semenza, G. L. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 3, 721–732 (2003).

196. Boudria, A. *et al.* VEGF165b, a splice variant of VEGF-A, promotes lung tumor progression and escape from anti-angiogenic therapies through a β1 integrin/VEGFR autocrine loop. *Oncogene 2018 38:7* 38, 1050–1066 (2018).

197. Kazemi, M. *et al.* VEGF121 and VEGF165 differentially promote vessel maturation and tumor growth in mice and humans. *Cancer Gene Therapy 2016 23:5* 23, 125–132 (2016).

198. Geraldo, L. H. *et al.* SLIT2/ROBO signaling in tumor-associated microglia and macrophages drives glioblastoma immunosuppression and vascular dysmorphia. *Journal of Clinical Investigation* 131, (2021).

199. Mathivet, T. *et al.* Dynamic stroma reorganization drives blood vessel dysmorphia during glioma growth. *EMBO Mol Med* 9, 1629 (2017).

200. Modi, S. J. & Kulkarni, V. M. Vascular Endothelial Growth Factor Receptor (VEGFR-2)/KDR Inhibitors: Medicinal Chemistry Perspective. *Med Drug Discov* 2, 100009 (2019).

201. Eelen, G., Treps, L., Li, X. & Carmeliet, P. Basic and Therapeutic Aspects of Angiogenesis Updated. *Circ Res* 127, 310–329 (2020).

202. Hooglugt, A., van der Stoel, M. M., Boon, R. A. & Huveneers, S. Endothelial YAP/TAZ Signaling in Angiogenesis and Tumor Vasculature. *Front Oncol* 10, 612802 (2021).

203. Damioli, V., Salvadori, A., Beretta, G. P., Ravelli, C. & Mitola, S. Multi-physics interactions drive VEGFR2 relocation on endothelial cells. *Sci Rep* 7, 1–11 (2017).

204. Morin, E. *et al.* VEGF receptor-2/neuropilin 1 trans-complex formation between endothelial and tumor cells is an independent predictor of pancreatic cancer survival. *J Pathol* 246, 311 (2018).

205. Sasagawa, T. *et al.* Production of an anti-angiogenic factor sFLT1 is suppressed via promoter hypermethylation of FLT1 gene in choriocarcinoma cells. *BMC Cancer* 20, 112 (2020).

206. Zhao, H., Wang, X. & Fang, B. HIF1A promotes miR-210/miR-424 transcription to modulate the angiogenesis in HUVECs and HDMECs via sFLT1 under hypoxic stress. *Mol Cell Biochem* 477, 2107–2119 (2022).

207. Lawler, J. *et al.* Thrombospondin-1 Gene Expression Affects Survival and Tumor Spectrum of p53-Deficient Mice. *Am J Pathol* 159, 1949–1956 (2001).

208. Sundaram, P. *et al.* p53-responsive miR-194 inhibits thrombospondin-1 and promotes angiogenesis in colon cancers. *Cancer Res* 71, 7490–7501 (2011).

209. Volpert, O. V. *et al.* Id1 regulates angiogenesis through transcriptional repression of thrombospondin-1. *Cancer Cell* 2, 473–483 (2002).

210. Korc, M. & Friesel, R. E. The Role of Fibroblast Growth Factors in Tumor Growth. *Curr Cancer Drug Targets* 9, 639 (2009).

211. Nagel, S. *et al.* Aberrantly expressed OTX homeobox genes deregulate B-cell differentiation in Hodgkin lymphoma. *PLoS One* 10, (2015).

212. Shi, Y. *et al.* Epigenetic upregulation of FGF2 promotes glioblastoma progression by enhancing the Warburg effect. *Cell Signal* 135, 112011 (2025).

213. Chotani, M. A., Touhalisky, K. & Chiu, I. M. The Small GTPases Ras, Rac, and Cdc42 Transcriptionally Regulate Expression of Human Fibroblast Growth Factor 1. *Journal of Biological Chemistry* 275, 30432–30438 (2000).

214. Im, J. H. *et al.* FGF2 alters macrophage polarization, tumour immunity and growth and can be targeted during radiotherapy. *Nat Commun* 11, 1–14 (2020).

215. Barclay, C. *et al.* Basic Fibroblast Growth Factor (FGF-2) Overexpression Is a Risk Factor for Esophageal Cancer Recurrence and Reduced Survival, which Is Ameliorated by Coexpression of the FGF-2 Antisense Gene. *Clinical Cancer Research* 11, 7683–7691 (2005).

216. Edirisinghe, O., Ternier, G., Alraawi, Z. & Suresh Kumar, T. K. Decoding FGF/FGFR Signaling: Insights into Biological Functions and Disease Relevance. *Biomolecules 2024, Vol. 14, Page 1622* 14, 1622 (2024).

217. Ardizzone, A. *et al.* Role of Basic Fibroblast Growth Factor in Cancer: Biological Activity, Targeted Therapies, and Prognostic Value. *Cells 2023, Vol. 12, Page 1002* 12, 1002 (2023).

218. Netti, G. S. *et al.* Role of PTX3 and complement modulation in the tumor microenvironment. *Biocell* 46, 2235–2239 (2022).

219. Bonavita, E. *et al.* PTX3 is an extrinsic oncosuppressor regulating complement-dependent inflammation in cancer. *Cell* 160, 700–714 (2015).

220. Wang, J. X., He, Y. L., Zhu, S. T., Yang, S. & Zhang, S. T. Aberrant methylation of the 3q25 tumor suppressor gene PTX3 in human esophageal squamous cell carcinoma. *World Journal of Gastroenterology : WJG* 17, 4225 (2011).

221. Ronca, R. *et al.* Long pentraxin-3 inhibits epithelial-Mesenchymal transition in melanoma cells. *Mol Cancer Ther* 12, 2760–2771 (2013).

222. Rodrigues, P. F. *et al.* Long pentraxin 3-mediated fibroblast growth factor trapping impairs fibrosarcoma growth. *Front Oncol* 8, 412880 (2018).

223. Qian, F. & Huo, D. Circulating Insulin-Like Growth Factor-1 and Risk of Total and 19 Site-specific Cancers: Cohort Study Analyses from the UK Biobank. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 29, 2332 (2020).

224. Haruta, M. *et al.* Duplication of paternal IGF2 or loss of maternal IGF2 imprinting occurs in half of Wilms tumors with various structural WT1 abnormalities. *Genes Chromosomes Cancer* 47, 712–727 (2008).

225. Zhan, S., Shapiro, D. N. & Helman, L. J. Activation of an imprinted allele of the insulin-like growth factor II gene implicated in rhabdomyosarcoma. *Journal of Clinical Investigation* 94, 445–448 (1994).

226. Zhang, Y. *et al.* Pan-Cancer Analysis of IGF-1 and IGF-1R as Potential Prognostic Biomarkers and Immunotherapy Targets. *Front Oncol* 11, 755341 (2021).

227. Correlation between Insulin-like Growth Factor-binding Protein-3 Promoter Methylation and Prognosis of Patients with Stage I Non-Small Cell Lung Cancer1 | Clinical Cancer Research | American Association for Cancer Research. https://aacrjournals.org/clincancerres/article/8/12/3669/199783/Correlation-between-Insulin-like-Growth-Factor?utm_source=chatgpt.com.

228. Grimberg, A. p53 and IGFBP-3: Apoptosis and cancer protection. *Mol Genet Metab* 70, 85–98 (2000).

229. Salahifar, H., Baxter, R. C. & Martin, J. L. Insulin-like Growth Factor Binding Protein (IGFBP)-3 Protease Activity Secreted by MCF-7 Breast Cancer Cells: Inhibition by IGFs Does Not Require IGF-IGFBP Interaction. *Endocrinology* 138, 1683–1690 (1997).

230. Siemann, D. W. The unique characteristics of tumor vasculature and preclinical evidence for its selective disruption by Tumor-Vascular Disrupting Agents. *Cancer Treat Rev* 37, 63–74 (2011).

231. Jang, H. J., Kim, B. J., Kim, J. H. & Kim, H. S. The addition of bevacizumab in the first-line treatment for metastatic colorectal cancer: an updated meta-analysis of randomized trials. *Oncotarget* 8, 73009 (2017).

232. Kabbinavar, F. *et al.* Phase i I, randomized trial comparing bevacizumab plus fluorouracil (FU)/Leucovorin (LV) with FU/LV alone in patients with metastatic colorectal cancer. *Journal of Clinical Oncology* 21, 60–65 (2003).

233. Sandler, A. Bevacizumab in Non–Small Cell Lung Cancer. *Clinical Cancer Research* 13, 4613s–4616s (2007).

234. Gridelli, C. *et al.* Safety and Efficacy of Bevacizumab Plus Standard-of-Care Treatment Beyond Disease Progression in Patients With Advanced Non–Small Cell Lung Cancer: The AvaALL Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol* 4, e183486–e183486 (2018).

235. Bevacizumab Fails to Up Breast Cancer Survival. *Cancer Discov* 3, OF2–OF2 (2013).

236. De Groot, J. F. *et al.* Phase II study of aflibercept in recurrent malignant glioma: A North American brain tumor consortium study. *Journal of Clinical Oncology* 29, 2689–2695 (2011).

237. Effing, S. M. A. & Gyawali, B. Assessing the risk-benefit profile of ramucirumab in patients with advanced solid tumors: A meta-analysis of randomized controlled trials. *EClinicalMedicine* 25, 100458 (2020).

238. Paller, A. S. Responses to Anti-Angiogenic Therapies. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings* 5, 83–86 (2000).

239. Ronca, R. *et al.* Long-Pentraxin 3 Derivative as a Small-Molecule FGF Trap for Cancer Therapy. *Cancer Cell* 28, 225–239 (2015).

240. Buzatu, I. M. *et al.* A Review of FDA-Approved Multi-Target Angiogenesis Drugs for Brain Tumor Therapy. *International Journal of Molecular Sciences 2025, Vol. 26, Page 2192* 26, 2192 (2025).

241. Greene, L. M., Meegan, M. J. & Zisterer, D. M. Combretastatins: More Than Just Vascular Targeting Agents? *J Pharmacol Exp Ther* 355, 212–227 (2015).

242. Siemann, D. W., Chaplin, D. J. & Walicke, P. A. A review and update of the current status of the vasculature-disabling agent combretastatin-A4 phosphate (CA4P). *Expert Opin Investig Drugs* 18, 189–197 (2009).

243. Liu, Y. *et al.* The first study on therapeutic efficacies of a vascular disrupting agent CA4P among primary hepatocellular carcinomas with a full spectrum of differentiation and vascularity: Correlation of MRI-microangiography-histopathology in rats. *Int J Cancer* 143, 1817–1828 (2018).

244. Monk, B. J. *et al.* Randomized phase II evaluation of bevacizumab versus bevacizumab plus fosbretabulin in recurrent ovarian, tubal, or peritoneal carcinoma: an NRG oncology. *ascopubs.orgBJ Monk, MW Sill, JL Walker, CJ Darus, G Sutton, KS Tewari, LP Martin, JM SchilderJournal of Clinical Oncology, 2016•ascopubs.org* 34, 2279–2286 (2016).

245. Smolarczyk, R. *et al.* Antitumor effect of RGD-4C-GG-D (KLAKLAK) 2 peptide in mouse B16 (F10) melanoma model. *frontierspartnerships.orgR Smolarczyk, T Cichoń, K Graja, J Hucz, A Sochanik, S SzalaActa Biochimica Polonica, 2006•frontierspartnerships.org* 53, 801–805 (2006).

246. Gill, J., Rockley, K., … C. D. S.-P. & & 2019, undefined. Vascular Disrupting Agents in cancer treatment: Cardiovascular toxicity and implications for co-administration with other cancer chemotherapeutics. *ElsevierJH Gill, KL Rockley, C De Santis, AK MohamedPharmacology & therapeutics, 2019•Elsevier* https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0163725819301081.

247. Tumor angiogenesis | Oncohema Key. https://oncohemakey.com/tumor-angiogenesis-2/.

248. Tong, R. T. *et al.* Vascular Normalization by Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2 Blockade Induces a Pressure Gradient Across the Vasculature and Improves Drug Penetration in Tumors. *Cancer Res* 64, 3731–3736 (2004).

249. Magnussen, A. L. & Mills, I. G. Vascular normalisation as the stepping stone into tumour microenvironment transformation. *Br J Cancer* 125, 324 (2021).

250. Winkler, F. *et al.* Kinetics of vascular normalization by VEGFR2 blockade governs brain tumor response to radiation: Role of oxygenation, angiopoietin-1, and matrix metalloproteinases. *Cancer Cell* 6, 553–563 (2004).

251. Huang, Y. *et al.* Improving immune-vascular crosstalk for cancer immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 18, 195–203 (2018).

252. Guelfi, S., Hodivala-Dilke, K. & Bergers, G. Targeting the tumour vasculature: from vessel destruction to promotion. *Nat Rev Cancer* 24, 655–675 (2024).

253. ISSVA classification for vascular anomalies ©.

254. Mansur, A. & Radovanovic, I. Vascular malformations: An overview of their molecular pathways, detection of mutational profiles and subsequent targets for drug therapy. *Front Neurol* 14, 1099328 (2023).

255. Kritharis, A., Al-Samkari, H. & Kuter, D. J. Hereditary hemorrhagic telangiectasia: Diagnosis and management from the hematologist's perspective. *Haematologica* 103, 1433–1443 (2018).

256. Barreau, M. & Dompmartin, A. Les malformations cutanées vasculaires non syndromiques Non-syndromic cutaneous vascular malformations. *Ann Dermatol Venereol* 141, 56–67 (2014).

257. Gilony, D. *et al.* Treatment of lymphatic malformations: a more conservative approach. *J Pediatr Surg* 47, 1837–1842 (2012).

258. Vascular Anomalies & Malformations | The Vascular Care Group. https://thevascularcaregroup.com/malformations/.

259. Cras, T. D. Le & Boscolo, E. Cellular and molecular mechanisms of PIK3CA-related vascular anomalies. *Vascular Biology* 1, H33–H40 (2019).

260. Canaud, G., Hammill, A. M., Adams, D., Vikkula, M. & Keppler-Noreuil, K. M. A review of mechanisms of disease across PIK3CA-related disorders with vascular manifestations. *Orphanet J Rare Dis* 16, 1–10 (2021).

261. Bichsel, C. & Bischoff, J. A somatic missense mutation in GNAQ causes capillary malformation. *Curr Opin Hematol* 26, 179 (2019).

262. Langbroek, G. B. *et al.* Characterization of Patient-Derived GNAQ Mutated Endothelial Cells from Capillary Malformations. *Journal of Investigative Dermatology* 144, 1378-1388.e1 (2024).

263. Braun, V. *et al.* Congenital haemangiomas: a single-centre retrospective review. *BMJ Paediatr Open* 4, e000816 (2020).

264. Mukhtar, F., Ilozumba, M., Utuama, O. & Cimenler, O. Change in pattern of secondary cancers after kaposi sarcoma in the era of antiretroviral therapy. *JAMA Oncol* 4, 48–53 (2018).

265. Ayturk, U. M. *et al.* Somatic Activating Mutations in GNAQ and GNA11 Are Associated with Congenital Hemangioma. *Am J Hum Genet* 98, 789 (2016).

266. Sethuraman, G., Yenamandra, V. K. & Gupta, V. Management of Infantile Hemangiomas: Current Trends. *J Cutan Aesthet Surg* 7, 75 (2014).

267. Rotter, A. & de Oliveira, Z. N. P. Infantile hemangioma: pathogenesis and mechanisms of action of propranolol. *JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft* vol. 15 1185–1190 Preprint at https://doi.org/10.1111/ddg.13365 (2017).

268. Amir, J., Metzker, A., Krikler, R. & Reisner, S. H. Strawberry Hemangioma in Preterm Infants. *Pediatr Dermatol* 3, 331–332 (1986).

269. Haggstrom, A. N. *et al.* Prospective Study of Infantile Hemangiomas: Demographic, Prenatal, and Perinatal Characteristics. *J Pediatr* 150, 291–294 (2007).

270. Xu, W. & Zhao, H. Management of infantile hemangiomas: Recent advances. *Frontiers in Oncology* vol. 12 Preprint at https://doi.org/10.3389/fonc.2022.1064048 (2022).

271. Jung, H. L. Update on infantile hemangioma. *Clin Exp Pediatr* 64, 559–572 (2021).

272. Léauté-Labrèze, C., Prey, S. & Ezzedine, K. Infantile haemangioma: Part I. Pathophysiology, epidemiology, clinical features, life cycle and associated structural abnormalities. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* 25, 1245–1253 (2011).

273. Léauté-Labrèze, C., Harper, J. I. & Hoeger, P. H. Infantile haemangioma. *The Lancet* 390, 85–94 (2017).

274. Haggstrom, A. N. *et al.* Prospective study of infantile hemangiomas: Clinical characteristics predicting complications and treatment. *Pediatrics* 118, 882–887 (2006).

275. Ding, A. A., Gong, X., Li, J. & Xiong, P. Role of ultrasound in diagnosis and differential diagnosis of deep infantile hemangioma and venous malformation. *J Vasc Surg Venous Lymphat Disord* 7, 715–723 (2019).

276. Greenberger, S. & Bischoff, J. Pathogenesis of infantile haemangioma. *British Journal of Dermatology* 169, 12–19 (2013).

277. Aydin Köker, S. *et al.* Evaluation of GLUT1, IGF-2, VEGF, FGF 1, and angiopoietin 2 in infantile hemangioma. *Archives de Pediatrie* 28, 296–300 (2021).

278. Kaulanjan-Checkmodine, P. *et al.* Is Infantile Hemangioma a Neuroendocrine Tumor? *International Journal of Molecular Sciences 2022, Vol. 23, Page 5140* 23, 5140 (2022).

279. Boscolo, E. & Bischoff, J. Vasculogenesis in infantile hemangioma. *Angiogenesis* 12, 197–207 (2009).

280. Joseph, J. & Wain, T. Infantile haemangiomas. *Aust J Gen Pract* 50, 887–892 (2021).

281. Tavakoli, M. *et al.* Infantile Periocular Hemangioma. *J Ophthalmic Vis Res* 12, 205 (2017).

282. Bang, G. M. & Setabutr, P. Periocular Capillary Hemangiomas: Indications and Options for Treatment. *Middle East Afr J Ophthalmol* 17, 121 (2010).

283. Rešić, A., Barčot, Z., Habek, D., Pogorelić, Z. & Bašković, M. The Evaluation, Diagnosis, and Management of Infantile Hemangiomas—A Comprehensive Review. *J Clin Med* 14, 425 (2025).

284. Callahan, A. B. & Yoon, M. K. Infantile hemangiomas: A review. *Saudi Journal of Ophthalmology* 26, 283–291 (2012).

285. Chamlin, S. L. *et al.* Multicenter prospective study of ulcerated hemangiomas. *J Pediatr* 151, (2007).

286. Kim, H. J., Colombo, M. & Frieden, I. J. Ulcerated hemangiomas: clinical characteristics and response to therapy. *J Am Acad Dermatol* 44, 962–72 (2001).

287. Shin, H. T., Orlow, S. J. & Chang, M. W. Ulcerated haemangioma of infancy: a retrospective review of 47 patients. *Br J Dermatol* 156, 1050–1052 (2007).

288. Strand, M. & Smidt, A. C. Pain management for ulcerated infantile hemangiomas. *Pediatr Dermatol* 29, 124–126 (2012).

289. Sebaratnam, D. F., Rodríguez Bandera, A. l., Wong, L. C. F. & Wargon, O. Infantile hemangioma. Part 2: Management. *J Am Acad Dermatol* 85, 1395–1404 (2021).

290. Partie A - IHReS | IHReS. https://www.ihscoring.com/fr/step-1/.

291. Xu, M. *et al.* DeepIH: A deep learning-based near-patient system for treatment recommendation in infantile hemangiomas. *Biomed Signal Process Control* 108, 107849 (2025).

292. Léauté-Labrèze, C. *et al.* Propranolol for Severe Hemangiomas of Infancy. *New England Journal of Medicine* 358, 2649–2651 (2008).

293. Léauté-Labrèze, C. *et al.* A Randomized, Controlled Trial of Oral Propranolol in Infantile Hemangioma. *New England Journal of Medicine* vol. 372 735–746 Preprint at https://doi.org/10.1056/nejmoa1404710 (2015).

294. Léauté-Labrèze, C., Frieden, I. & Delarue, A. Early initiation of treatment with oral propranolol for infantile hemangioma improves success rate. *Pediatr Dermatol* 40, 261–264 (2023).

295. Ahogo, C. K. *et al.* Factors associated with the relapse of infantile haemangiomas in children treated with oral propranolol. *British Journal of Dermatology* 169, 1252–1256 (2013).

296. Chang, L. *et al.* When to stop propranolol for infantile hemangioma. *Sci Rep* 7, (2017).

297. Şen, H. S., Yalçın, B., Canpınar, H., Ocak, S. & Akyüz, C. Serum levels of vegf and bfgf in infantile hemangiomas treated with propranolol. *Turkish Journal of Pediatrics* 62, 979–985 (2020).

298. Park, M. *et al.* Serum cytokine profiles in infants with infantile hemangiomas on oral propranolol treatment: VEGF and bFGF, potential biomarkers predicting clinical outcomes. *Pediatr Res* 88, 749–755 (2020).

299. Kowalska, M. *et al.* Early plasma changes of HIF-1 alpha, matrix metalloproteinases-2 and − 9, and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 in patients with infantile hemangiomas treated with propranolol. *Pharmacological Reports* https://doi.org/10.1007/S43440-025-00762-1, (2025) doi:10.1007/S43440-025-00762-1,.

300. Kum, J. J. Y. & Khan, Z. A. Propranolol inhibits growth of hemangioma-initiating cells but does not induce apoptosis. *Pediatr Res* 75, 381–388 (2014).

301. Léaute-Labrèze, C. *et al.* Safety of oral propranolol for the treatment of infantile hemangioma: A systematic review. *Pediatrics* 138, (2016).

302. Theiler, M. *et al.* Sleep behavior of infants with infantile hemangioma treated with propranolol-a cohort study. *Eur J Pediatr* 180, 2655–2668 (2021).

303. Chakkittakandiyil, A. *et al.* Timolol maleate 0.5% or 0.1% gel-forming solution for infantile hemangiomas: A retrospective, multicenter, cohort study. *Pediatr Dermatol* 29, 28–31 (2012).

304. Püttgen, K. *et al.* Topical timolol maleate treatment of infantile hemangiomas. *Pediatrics* 138, (2016).

305. Research letter Safety and efficacy of topical timolol treatment of infantile haemangioma: a prospective trial. https://doi.org/10.1111/bjd.15865 (2017) doi:10.1111/bjd.15865.

306. Ji, Y. *et al.* Oral atenolol therapy for proliferating infantile hemangioma: A prospective study. *Medicine* 95, e3908 (2016).

307. Léauté-Labrèze, C. Medical management of vascular anomalies of the head and neck. *Journal of Oral Pathology and Medicine* 51, 837–843 (2022).

308. Cho, Y. J. *et al.* Effects of sirolimus in the treatment of unresectable infantile hemangioma and vascular malformations in children: A single-center experience. *J Vasc Surg Venous Lymphat Disord* 9, 1488–1494 (2021).

309. Ezekowitz, R. A. B., Mulliken, J. B. & Folkman, J. Interferon Alfa-2a Therapy for Life-Threatening Hemangiomas of Infancy. *New England Journal of Medicine* 326, 1456–1463 (1992).

310. Campolmi, P., Cannarozzo, G., Dragoni, F., Conti, R. & Moretti, S. Efficacy of Rhodamine Light in the Treatment of Superficial Vascular Lesions of the Face. *Medical Principles and Practice* 25, 477–482 (2016).

311. Railan, D., Parlette, E. C., Uebelhoer, N. S. & Rohrer, T. E. Laser treatment of vascular lesions. *Clin Dermatol* 24, 8–15 (2006).

312. Tay, Y. K. & Tan, S. K. Treatment of infantile hemangiomas with the 595-nm pulsed dye laser using different pulse widths in an Asian population. *Lasers Surg Med* 44, 93–96 (2012).

313. Combination therapy of infantile hemangiomas with pulsed dye laser and Nd:YAG laser is effective and safe. https://doi.org/10.1111/ddg.12354 (2014) doi:10.1111/ddg.12354.

314. Su, W., Ke, Y. & Xue, J. Beneficial effects of early treatment of infantile hemangiomas with a long-pulse Alexandrite laser. *Lasers Surg Med* 46, 173–179 (2014).

315. Boyd, V. C. *et al.* Surgery: The Treatment of Choice for Hemangiomas. https://doi.org/10.1055/s-2006-949118 doi:10.1055/s-2006-949118.

316. Khan, Z. A. *et al.* Multipotential stem cells recapitulate human infantile hemangioma in immunodeficient mice. *Journal of Clinical Investigation* 118, (2008).

317. Lorusso, B. *et al.* CD26 Is Differentially Expressed throughout the Life Cycle of Infantile Hemangiomas and Characterizes the Proliferative Phase. *Int J Mol Sci* 25, 9760 (2024).

318. Dosanjh, A. *et al.* In vitro characteristics of neonatal hemangioma endothelial cells: similarities and differences between normal neonatal and fetal endothelial cells. *J Cutan Pathol* 27, 441–450 (2000).

319. North, P. E., Waner, M., Mizeracki, A. & Mihm, M. C. GLUT1: A newly discovered immunohistochemical marker for juvenile hemangiomas. *Human Pathology* vol. 31 11–22 Preprint at https://doi.org/10.1016/S0046-8177(00)80192-6 (2000).

320. Fernandez-Flores, A., Cassarino, D. & Colmenero, I. Vascular Malformations: A Histopathologic and Conceptual Appraisal. *Actas Dermosifiliogr* 114, 213–228 (2023).

321. Boscolo, E., Mulliken, J. B. & Bischoff, J. Pericytes from Infantile Hemangioma Display Pro-angiogenic Properties and Dysregulated Angiopoietin-1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 33, 501 (2013).

322. Boscolo, E. *et al.* JAGGED1 signaling regulates hemangioma stem cell-to-pericyte/vascular smooth muscle cell differentiation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31, 2181–2192 (2011).

323. Itinteang, T., Withers, A. H. J., Davis, P. F. & Tan, S. T. Biology of Infantile Hemangioma. *Front Surg* 1, 38 (2014).

324. Ritter, M. R., Reinisch, J., Friedlander, S. F. & Friedlander, M. Myeloid Cells in Infantile Hemangioma. *Am J Pathol* 168, 621 (2006).

325. Wang, F.-Q., Chen, G. & Zhu, J.-Y. M2-polarised macrophages in infantile haemangiomas: correlation with promoted angiogenesis. *J Clin Pathol* 66, 1058–1064 (2013).

326. Rao, X. *et al.* Upregulated miR-27a-3p Indicates a Poor Prognosis in Pancreatic Carcinoma Patients and Promotes the Angiogenesis and Migration by Epigenetic Silencing of GATA6 and Activating VEGFA/VEGFR2 Signaling Pathway. *Onco Targets Ther* 12, 11241–11254 (2019).

327. Wu, K. Q. *et al.* M1 Macrophage–Induced Endothelial-to-Mesenchymal Transition Promotes Infantile Hemangioma Regression. *American Journal of Pathology* 187, 2102–2111 (2017).

328. Itinteang, T. *et al.* Mast cells in infantile haemangioma possess a primitive myeloid phenotype. *J Clin Pathol* 66, 597–600 (2013).

329. Xia, M., Liu, W. & Hou, F. Mast cell in infantile hemangioma. *Front Oncol* 14, 1304478 (2024).

330. Pasyk, K. A., Grabb, W. C. & Cherry, G. W. Ultrastructure of mast cells in growing and involuting stages of hemangiomas. *Hum Pathol* 14, 174–181 (1983).

331. Hou, F., Dai, Y., Fan, C. Y., Suen, J. Y. & Richter, G. T. Estrogen is involved in hemangioma regression associated with mast cells. *Orphanet J Rare Dis* 13, (2018).

332. Steel, R. & Day, D. Increased apoptosis and secretion of tryptase by mast cells in infantile haemangioma treated with propranolol. *Pathology* vol. 46 496–500 Preprint at https://doi.org/10.1097/PAT.0000000000000143 (2014).

333. Yuan, S. M. *et al.* The adipogenesis in infantile hemangioma and the expression of adipogenic-related genes. *Int J Clin Exp Pathol* 10, 11596 (2017).

334. Sun, Z. Y. *et al.* Infantile hemangioma is originated from placental trophoblast, fact or fiction? *Med Hypotheses* 71, 444–448 (2008).

335. Chen, X. D. *et al.* Maternal and Perinatal Risk Factors for Infantile Hemangioma: A Case-Control Study. *Pediatr Dermatol* 30, 457–461 (2013).

336. Itinteang, T. *et al.* A placental chorionic villous mesenchymal core cellular origin for infantile haemangioma. *J Clin Pathol* 64, 870–874 (2011).

337. Pittman, K. M. *et al.* No evidence for maternal-fetal microchimerism in infantile hemangioma: A molecular genetic investigation. *Journal of Investigative Dermatology* 126, 2533–2538 (2006).

338. Auger, N., Fraser, W. D., Arbour, L., Healy-Profitós, J. & Drolet, B. A. Pre-eclampsia and risk of infantile haemangioma. *British Journal of Dermatology* 176, 371–377 (2017).

339. Kleinman, M. E. *et al.* Hypoxia-induced mediators of stem/progenitor cell trafficking are increased in children with hemangioma. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27, 2664–2670 (2007).

340. Drolet, B. A. & Frieden, I. J. Characteristics of Infantile Hemangiomas as Clues to Pathogenesis: Does Hypoxia Connect the Dots? *Arch Dermatol* 146, 1295–1299 (2010).

341. Carbajo-Lozoya, J. *et al.* Angiotensin II modulates VEGF-driven angiogenesis by opposing effects of type 1 and type 2 receptor stimulation in the microvascular endothelium. *Cell Signal* 24, 1261–1269 (2012).

342. renin-angiotensin system -- Britannica Online Encyclopedia. https://www.britannica.com/print/article/498140.

343. Nose, A. *et al.* Regulation of Glucose Transporter (GLUT1) Gene Expression by Angiotensin II in Mesangial Cells: Involvement of HB-EGF and EGF Receptor Transactivation.

344. Lewko, B., Maryn, A., Latawiec, E., Daca, A. & Rybczynska, A. Angiotensin II Modulates Podocyte Glucose Transport. *Front Endocrinol (Lausanne)* 9, 418 (2018).

345. Blei, F., Walter, J., Orlow, S. J. & Marchuk, D. A. Familial segregation of hemangiomas and vascular malformations as an autosomal dominant trait. *Arch Dermatol* 134, 718–722 (1998).

346. Walter, J. W. *et al.* Genetic mapping of a novel familial form of infantile hemangioma. *Am J Med Genet* 82, 77–83 (1999).

347. Jinnin, M. *et al.* Suppressed NFAT-dependent VEGFR1 expression and constitutive VEGFR2 signaling in infantile hemangioma. *Nature Medicine* vol. 14 1236–1246 Preprint at https://doi.org/10.1038/nm.1877 (2008).

348. Acevedo, L. M. & Cheresh, D. A. Suppressing NFAT Increases VEGF Signaling in Hemangiomas. *Cancer Cell* vol. 14 429–430 Preprint at https://doi.org/10.1016/j.ccr.2008.11.009 (2008).

349. Walter, J. W. *et al.* Somatic mutation of vascular endothelial growth factor receptors in juvenile hemangioma. *Genes Chromosomes Cancer* 33, 295–303 (2002).

350. Chen, Q., Zheng, J. & Bian, Q. Cell Fate Regulation During the Development of Infantile Hemangioma. *Journal of Investigative Dermatology* 145, 266–279 (2025).

351. Greenberger, S., Boscolo, E., Adini, I., Mulliken, J. B. & Bischoff, J. Corticosteroid Suppression of VEGF-A in Infantile Hemangioma-Derived Stem Cells. *New England Journal of Medicine* 362, 1005–1013 (2010).

352. Chen, Q. *et al.* KLF2 Orchestrates Pathological Progression of Infantile Hemangioma through Hemangioma Stem Cell Fate Decisions. *Journal of Investigative Dermatology* 144, 1850-1864.e9 (2024).

353. Roach, E. E. *et al.* Intrinsic regulation of hemangioma involution by platelet-derived growth factor. *Cell Death & Disease 2012 3:6* 3, e328–e328 (2012).

354. Kleiman, A., Keats, E. C., Chan, N. G. & Khan, Z. A. Elevated IGF2 prevents leptin induction and terminal adipocyte differentiation in hemangioma stem cells. *Exp Mol Pathol* 94, 126–136 (2013).

355. Insulin-like growth factor I promotes adipogenesis in hemangioma stem cells from infantile hemangiomas. https://www.spandidos-publications.com/mmr/19/4/2825.

356. Pulze, L. *et al.* A new cellular type in invertebrates: First evidence of telocytes in leech Hirudo medicinalis. *Scientific Reports* vol. 7 13580 Preprint at https://doi.org/10.1038/s41598-017-13202-9 (2017).

357. Popescu, L. M. & Faussone-Pellegrini, M. S. TELOCYTES - a case of serendipity: The winding way from Interstitial Cells of Cajal (ICC), via Interstitial Cajal-Like Cells (ICLC) to TELOCYTES. *J Cell Mol Med* 14, 729–740 (2010).

358. Aleksandrovych, V. *et al.* Telocytes: facts, speculations and myths. *Folia Med Cracov* 1, 5–22 (2017).

359. Cretoiu, D. *et al.* FIB-SEM tomography of human skin telocytes and their extracellular vesicles. *J Cell Mol Med* 19, 714–722 (2015).

360. Cretoiu, D., Xu, J., Xiao, J. & Cretoiu, S. M. Telocytes and Their Extracellular Vesicles—Evidence and Hypotheses. *International Journal of Molecular Sciences 2016, Vol. 17, Page 1322* 17, 1322 (2016).

361. Abdel-Maksoud, F. M., Abd-Elhafeez, H. H. & Soliman, S. A. Morphological changes of telocytes in camel efferent ductules in response to seasonal variations during the reproductive cycle. *Sci Rep* 9, 4507 (2019).

362. Niculite, C. M. *et al.* Dynamics of telopodes (telocyte prolongations) in cell culture depends on extracellular matrix protein. *Mol Cell Biochem* 398, 157 (2014).

363. Vannucchi, M. G. & Faussone-Pellegrini, M. S. The telocyte subtypes. *Adv Exp Med Biol* 913, 115–126 (2016).

364. Popescu, L. M. *et al.* Interstitial cells of Cajal in pancreas. *J Cell Mol Med* 9, 169–190 (2005).

365. Ahmed, A. M. & Hussein, M. R. Telocytes in Cutaneous Biology: A Reappraisal. *Actas Dermosifiliogr* 114, 229–239 (2023).

366. Nicolescu, M. I., Bucur, A., Dinca, O., Rusu, M. C. & Popescu, L. M. Telocytes in parotid glands. *Anat Rec (Hoboken)* 295, 378–385 (2012).

367. Vannucchi, M. G., Traini, C., Manetti, M., Ibba-Manneschi, L. & Faussone-Pellegrini, M. S. Telocytes express PDGFRα in the human gastrointestinal tract. *J Cell Mol Med* 17, 1099–1108 (2013).

368. Kondo, A. & Kaestner, K. H. Emerging diverse roles of telocytes. https://doi.org/10.1242/dev.175018 (2019) doi:10.1242/dev.175018.

369. Perrin, C. Nail Telocytes: Identification, Potential Physiological Function, and Role in Pathology: A Reappraisal of the So-Called Onychofibroblasts/Onychodermis. *American Journal of Dermatopathology* 46, 346–352 (2024).

370. Song, D. *et al.* Roles of transforming growth factor-β and phosphatidylinositol 3-kinase isoforms in integrin β1-mediated bio-behaviors of mouse lung telocytes. *J Transl Med* 17, 1–14 (2019).

371. Aschacher, T. *et al.* Telocytes in the human ascending aorta: Characterization and exosome-related KLF-4/VEGF-A expression. *J Cell Mol Med* 25, 9697 (2021).

372. Bei, Y. *et al.* Cardiac Telocytes and Fibroblasts in Primary Culture: Different Morphologies and Immunophenotypes. *PLoS One* 10, e0115991 (2015).

373. Cretoiu, S. M. & Popescu, L. M. Telocytes revisited. *Biomolecular Concepts* vol. 5 353–369 Preprint at https://doi.org/10.1515/bmc-2014-0029 (2014).

374. Qi, G. *et al.* Telocytes in the human kidney cortex. *J Cell Mol Med* 16, 3116 (2012).

375. Pellegrini, M. S. F. & Popescu, L. M. Telocytes. *Biomol Concepts* 2, 481–489 (2011).

376. Bani, D. Telocytes in Cardiac Tissue Architecture and Development. *Adv Exp Med Biol* 913, 127–137 (2016).

377. Cretoiu, D., Hummel, E., Zimmermann, H., Gherghiceanu, M. & Popescu, L. M. Human cardiac telocytes: 3D imaging by FIB-SEM tomography. https://doi.org/10.1111/jcmm.12468 doi:10.1111/jcmm.12468.

378. Galiger, C. *et al.* Phenotypical and ultrastructural features of Oct4-positive cells in the adult mouse lung. *J Cell Mol Med* 18, 1321–1333 (2014).

379. Popescu, L. M. *et al.* Interstitial cells of Cajal in pancreas. *J Cell Mol Med* 9, 169 (2005).

380. Popescu, L. M., Ciontea, S. M. & Cretoiu, D. Interstitial Cajal-like cells in human uterus and fallopian tube. *Ann N Y Acad Sci* 1101, 139–165 (2007).

381. Moisan, F. *et al.* Critical role of Aquaporin-1 and telocytes in infantile hemangioma response to propranolol beta blockade. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* vol. 118 e2018690118 Preprint at https://doi.org/10.1073/pnas.2018690118 (2021).

382. Melissari, M. T. *et al.* Col6a1+/CD201+ mesenchymal cells regulate intestinal morphogenesis and homeostasis. *Cell Mol Life Sci* 79, 1 (2021).

383. Aoki, R. *et al.* Foxl1-Expressing Mesenchymal Cells Constitute the Intestinal Stem Cell Niche. https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2015.12.004 (2016) doi:10.1016/j.jcmgh.2015.12.004.

384. Pomerleau, V. *et al.* FOXL1+ Telocytes in mouse colon orchestrate extracellular matrix biodynamics and wound repair resolution. *J Proteomics* 271, 104755 (2023).

385. Bahar Halpern, K. *et al.* Lgr5+ telocytes are a signaling source at the intestinal villus tip. *Nature Communications 2020 11:1* 11, 1–12 (2020).

386. Chang, Y., Li, C., Lu, Z., Li, H. & Guo, Z. Multiple immunophenotypes of cardiac telocytes. *Exp Cell Res* 338, 239–244 (2015).

387. Rusu, M. C. *et al.* Subsets of telocytes: Myocardial telocytes. *Annals of Anatomy* 209, 37–44 (2017).

388. Petre, N., Rusu, M. C., Pop, F. & Jianu, A. M. Telocytes of the mammary gland stroma. *Folia Morphol (Warsz)* 75, 224–231 (2016).

389. Cretoiu, D., Cretoiu, S. M., Simionescu, A. A. & Popescu, L. M. Telocytes, a distinct type of cell among the stromal cells present in the lamina propria of jejunum. *Histol Histopathol* 27, 1067–1078 (2012).

390. Wang, L., Xiao, L., Zhang, R., Jin, H. & Shi, H. Ultrastructural and immunohistochemical characteristics of telocytes in human scalp tissue. *Sci Rep* 10, 1–7 (2020).

391. Vannucchi, M. G., Traini, C., Manetti, M., Ibba-Manneschi, L. & Faussone-Pellegrini, M. S. Telocytes express PDGFRα in the human gastrointestinal tract. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* vol. 17 1099–1108 Preprint at https://doi.org/10.1111/jcmm.12134 (2013).

392. Sirianni, F. E., Chu, F. S. F. & Walker, D. C. Human Alveolar Wall Fibroblasts Directly Link Epithelial Type 2 Cells to Capillary Endothelium. *Am J Respir Crit Care Med* 168, 1532–1537 (2003).

393. Rusu, M. C. *et al.* Tracheal telocytes. *J Cell Mol Med* 16, 401–405 (2012).

394. Popescu, L. M., Gherghiceanu, M., Suciu, L. C., Manole, C. G. & Hinescu, M. E. Telocytes and putative stem cells in the lungs: Electron microscopy, electron tomography and laser scanning microscopy. *Cell Tissue Res* 345, 391–403 (2011).

395. Fertig, E. T., Gherghiceanu, M. & Popescu, L. M. Extracellular vesicles release by cardiac telocytes: Electron microscopy and electron tomography. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* vol. 18 1938–1943 Preprint at https://doi.org/10.1111/jcmm.12436 (2014).

396. Zhaofu, L. & Dongqing, C. Cardiac telocytes in regeneration of myocardium after myocardial infarction. *Advances in Experimental Medicine and Biology* vol. 913 229–239 Preprint at https://doi.org/10.1007/978-981-10-1061-3_15 (2016).

397. Rusu, M. C. & Hostiuc, S. Critical review: Cardiac telocytes vs cardiac lymphatic endothelial cells. *Annals of Anatomy* vol. 222 40–54 Preprint at https://doi.org/10.1016/j.aanat.2018.10.011 (2019).

398. Zhang, H. Q. *et al.* Morphological Evidence of Telocytes in Mice Aorta. *Chin Med J (Engl)* 128, 348 (2015).

399. Suciu, L. *et al.* Telocytes in Human Term Placenta: Morphology and Phenotype. *Cells Tissues Organs* 192, 325–339 (2010).

400. Sanches, B. D. A. *et al.* Telocytes of the male reproductive system: dynamic tissue organizers. *Front Cell Dev Biol* 12, (2024).

401. Popescu, B. O., Gherghiceanu, M., Kostin, S., Ceafalan, L. & Popescu, L. M. Telocytes in meninges and choroid plexus. *Neurosci Lett* 516, 265–269 (2012).

402. Mirancea, N., Mirancea, G. V. & Moroşanu, A. M. Telocytes inside of the peripheral nervous system – a 3D endoneurial network and putative role in cell communication. *Romanian Journal of Morphology and Embryology* 63, 335 (2022).

403. Malong, L. *et al.* Characterization of the structure and control of the blood-nerve barrier identifies avenues for therapeutic delivery. *Dev Cell* 58, 174-191.e8 (2023).

404. Abd-Elhafeez, H. H. & Soliman, S. A. New Description of Telocyte Sheaths in the Bovine Uterine Tube: An Immunohistochemical and Scanning Microscopic Study. *Cells Tissues Organs* 203, 295–315 (2017).

405. Rusu, M. C. *et al.* Skin telocytes. *Annals of Anatomy* 194, 359–367 (2012).

406. Kang, Y. *et al.* Skin telocytes versus fibroblasts: Two distinct dermal cell populations. *J Cell Mol Med* 19, 2530–2539 (2015).

407. Kang, Y. *et al.* Skin telocytes versus fibroblasts: two distinct dermal cell populations. *J Cell Mol Med* 19, 2530 (2015).

408. Manole, C. G. *et al.* Skin Telocytes Could Fundament the Cellular Mechanisms of Wound Healing in Platelet-Rich Plasma Administration. *Cells 2024, Vol. 13, Page 1321* 13, 1321 (2024).

409. Ceafalan, L., Gherghiceanu, M., Popescu, L. M. & Simionescu, O. Telocytes in human skin - are they involved in skin regeneration? *J Cell Mol Med* 16, 1405–1420 (2012).

410. Shoshkes-Carmel, M. *et al.* Subepithelial telocytes are an important source of Wnts that supports intestinal crypts. *Nature* 557, 242–246 (2018).

411. Bahar Halpern, K. *et al.* Lgr5+ telocytes are a signaling source at the intestinal villus tip. *Nat Commun* 11, 1–12 (2020).

412. Dai, L. *et al.* Single-cell RNA sequencing reveals telocytes subsets of human lung. *Clinical and Translational Discovery* 4, e276 (2024).

413. Cismasiu, V. B. & Popescu, L. M. Telocytes transfer extracellular vesicles loaded with microRNAs to stem cells. *J Cell Mol Med* 19, 351 (2015).

414. Gherghiceanu, M. & Popescu, L. M. Cardiac telocytes - Their junctions and functional implications. *Cell Tissue Res* 348, 265–279 (2012).

415. Popescu, L. M., Fertig, E. T. & Gherghiceanu, M. Reaching out: junctions between cardiac telocytes and cardiac stem cells in culture. *J Cell Mol Med* 20, 370 (2015).

416. Faussone-Pellegrini, M.-S. & Gherghiceanu, M. Telocyte's contacts. *Semin Cell Dev Biol* 55, 3–8 (2016).

417. Aschacher, T. *et al.* The Role of Telocytes and Telocyte-Derived Exosomes in the Development of Thoracic Aortic Aneurysm. *J. Mol. Sci* 2022, 23 (2022).

418. Cucu, I., Nicolescu, M. I., Busnatu, Ștefan S. & Manole, C. G. Dynamic Involvement of Telocytes in Modulating Multiple Signaling Pathways in Cardiac Cytoarchitecture. *Int J Mol Sci* 23, 5769 (2022).

419. Aschacher, T. *et al.* Telocytes in the human ascending aorta: Characterization and exosome-related KLF-4/VEGF-A expression. *J Cell Mol Med* 25, 9697 (2021).

420. Yang, J., Li, Y., Xue, F., Liu, W. & Zhang, S. Exosomes derived from cardiac telocytes exert positive effects on endothelial cells. *Am J Transl Res* 9, 5375 (2017).

421. Rosa, I. *et al.* Skin Telocyte Secretome as Conditioned Medium Prevents Profibrotic Differentiation of Skin Fibroblasts into Myofibroblasts. *Int J Mol Sci* 26, 1284 (2025).

422. Greicius, G. *et al.* Telocytes deliver essential Wnts directly to murine intestinal stem cells via synapse-like contacts. *Dev Cell* https://doi.org/10.1016/J.DEVCEL.2025.06.040 (2025) doi:10.1016/J.DEVCEL.2025.06.040.

423. Vannucchi, M. G. The Telocytes: Ten Years after Their Introduction in the Scientific Literature. An Update on Their Morphology, Distribution, and Potential Roles in the Gut. *International Journal of Molecular Sciences 2020, Vol. 21, Page 4478* 21, 4478 (2020).

424. Doello, K. *et al.* Telocytes in Human Embryonic Development: A Preliminary Microscopic Anatomy Study Telocitos en el Desarrollo Embrionario Humano: Un Estudio Preliminar de Anatomía Microscópica. *Int. J. Morphol* 41, 1394–1399 (2023).

425. Bernier-Latmani, J. *et al.* ADAMTS18 + villus tip telocytes maintain a polarized VEGFA signaling domain and fenestrations in nutrient-absorbing intestinal blood vessels. https://doi.org/10.1038/s41467-022-31571-2 doi:10.1038/s41467-022-31571-2.

426. Díaz-Flores, L. *et al.* Comparison of the Behavior of Perivascular Cells (Pericytes and CD34+ Stromal Cell/Telocytes) in Sprouting and Intussusceptive Angiogenesis. *Int J Mol Sci* 23, 9010 (2022).

427. El-Sheikh, A. A. Telocytes: Exploring Their Influence on Angiogenesis and Therapeutic Interventions. *J Microsc Ultrastruct* https://doi.org/10.4103/JMAU.JMAU_61_24 (2024) doi:10.4103/JMAU.JMAU_61_24.

428. Ma, R., Wu, P., Shi, Q., Song, D. & Fang, H. Telocytes promote VEGF expression and alleviate ventilator-induced lung injury in mice. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 50, 817–825 (2018).

429. Zhao, J. *et al.* Telocytes regulate macrophages in periodontal disease. https://doi.org/10.7554/eLife.72128 doi:10.7554/eLife.72128.

430. Haberberger, R. V., Matusica, D., Shiers, S., Sankaranarayanan, I. & Price, T. J. Transcriptomic and Histological Characterization of Telocytes in the Human Dorsal Root Ganglion. *Journal of Comparative Neurology* 533, (2025).

431. Boroujerdi, A., Welser-Alves, J. V. & Milner, R. Matrix metalloproteinase-9 mediates post-hypoxic vascular pruning of cerebral blood vessels by degrading laminin and claudin-5. *Angiogenesis* 18, 255–264 (2015).

432. Rosa, I., Marini, M. & Manetti, M. Telocytes: An Emerging Component of Stem Cell Niche Microenvironment. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 69, 795–818 (2021).

433. El Maadawi, Z. M. A tale of two cells: Telocyte and stem cell unique relationship. *Adv Exp Med Biol* 913, 359–376 (2016).

434. Zhao, B. *et al.* Cardiac telocytes were decreased during myocardial infarction and their therapeutic effects for ischaemic heart in rat. *J Cell Mol Med* 17, 123–133 (2013).

435. Zhaofu, L., Dongqing, C., Zhaofu, L. & Dongqing, • C. Cardiac Telocytes in Regeneration of Myocardium After Myocardial Infarction. 913, (2016).

436. Babaei, M. & Rezaie, J. Application of stem cell-derived exosomes in ischemic diseases: opportunity and limitations. *J Transl Med* 19, (2021).

437. Wang, L. *et al.* Telocytes inhibited inflammatory factor expression and enhanced cell migration in LPS-induced skin wound healing models in vitro and in vivo. *J Transl Med* 18, 1–14 (2020).

438. Vannucchi, M.-G., Bani, D. & Faussone-Pellegrini, M.-S. Telocytes Contribute as Cell Progenitors and Differentiation Inductors in Tissue Regeneration. *Curr Stem Cell Res Ther* 11, 383–389 (2016).

439. Bei, Y., Wang, F., Yang, C. & Xiao, J. Telocytes in regenerative medicine. *J Cell Mol Med* 19, 1441–1454 (2015).

440. Shi, L., Dong, N., Chen, C. & Wang, X. Potential roles of telocytes in lung diseases. *Semin Cell Dev Biol* 55, 31–39 (2016).

441. Li, S., Shen, X. & He, S. Expression of toll-like receptors and their regulatory roles in murine cardiac telocytes. *J Cell Mol Med* 23, 5360 (2019).

442. Panganiban, R. P., McAninch, C., Chulkina, M. & Pinchuk, I. V. Telocytes in inflammatory bowel diseases: contributions to pathology and therapeutic potentials. *Front Cell Dev Biol* 12, (2024).

443. Zhang, Y. & Tian, H. Telocytes and inflammation: A review. *Medicine* 102, e35983 (2023).

444. Manole, C. G., Gherghiceanu, M. & Simionescu, O. Telocyte dynamics in psoriasis. *J Cell Mol Med* 19, 1504–1519 (2015).

445. Xu, Y. & Yu, J. TMC5 as a Marker of Tumor-Associated Telocytes in Hepatocellular Carcinoma. *Frontiers in Bioscience - Landmark* 30, 36583 (2025).

446. Xu, Y. *et al.* Telocytes promote hepatocellular carcinoma by activating the ERK signaling pathway and miR-942-3p/MMP9 axis. *Cell Death Discov* 7, 1–10 (2021).

447. Li, F. *et al.* Vascular endothelial growth factor facilitates the effects of telocytes on tumor cell proliferation and migration. *Front Cell Dev Biol* 12, 1474682 (2024).

448. Öksel, N., Erdoğdu, İ. H., Akgül, Ö. F., Bulut, M. & Yersal, Ö. Evaluation of Immunophenotypic Characteristics and Quantitative Differences of Telocytes Between Invasive Breast Cancer Subtypes. *Life* 15, 1040 (2025).

449. Babadag, S., Altundag-Erdogan, Ö., Akkaya-Ulum, Y. Z. & Çelebi-Saltik, B. The role of telocytes and miR-21-5p in tumorigenicity and metastasis of breast cancer stem cells. *Mol Biol Rep* 51, (2024).

450. Díaz-flores, L. *et al.* CD34+ Stromal Cells/Telocytes as a Source of Cancer-Associated Fibroblasts (CAFs) in Invasive Lobular Carcinoma of the Breast. *Int J Mol Sci* 22, 3686 (2021).

451. (PDF) Infrastructure of the telocytes from tumor stroma in the skin basal and squamous cell carcinomas. https://www.researchgate.net/publication/259627421_Infrastructure_of_the_telocytes_from_tumor_stroma_in_the_skin_basal_and_squamous_cell_carcinomas.

452. Manetti, M. *et al.* Evidence for progressive reduction and loss of telocytes in the dermal cellular network of systemic sclerosis. *J Cell Mol Med* 17, 482–496 (2013).

453. Rosa, I. *et al.* Scleroderma-like impairment in the network of telocytes/CD34+ stromal cells in the experimental mouse model of bleomycin-induced dermal fibrosis. *Int J Mol Sci* 22, (2021).

454. Kye, W. P. *et al.* The axonal attractant Netrin-1 is an angiogenic factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 16210 (2004).

455. Bouvrée, K. *et al.* Netrin-1 inhibits sprouting angiogenesis in developing avian embryos. *Dev Biol* 318, 172–183 (2008).

456. Picard, M. *et al.* Spatial and temporal activation of the small GTPases RhoA and Rac1 by the netrin-1 receptor UNC5a during neurite outgrowth. *Cell Signal* 21, 1961–1973 (2009).

457. Boyé, K. *et al.* Endothelial Unc5B controls blood-brain barrier integrity. https://doi.org/10.1038/s41467-022-28785-9 doi:10.1038/s41467-022-28785-9.

458. Miloudi, K. *et al.* Truncated netrin-1 contributes to pathological vascular permeability in diabetic retinopathy. *J Clin Invest* 126, 3006–3022 (2016).

459. Larrivée, B. *et al.* Activation of the UNC5B receptor by Netrin-1 inhibits sprouting angiogenesis. *Genes Dev* 21, 2433–2447 (2007).

460. Jiang, X.-J., Cretoiu, D., Shen, Z.-J. & Yang, X.-J. An in vitro investigation of telocytes-educated macrophages: morphology, heterocellular junctions, apoptosis and invasion analysis. *J Transl Med* 16, 85 (2018).

461. El-Sheikh, A. A. Telocytes: Exploring Their Influence on Angiogenesis and Therapeutic Interventions. *J Microsc Ultrastruct* https://doi.org/10.4103/JMAU.JMAU_61_24 (2024) doi:10.4103/JMAU.JMAU_61_24.

462. Kalyuzhny, E., Manole, C. G., Gherghiceanu, M., Ceafalan, L. C. & Hinescu, M. E. Dermal Telocytes: A Different Viewpoint of Skin Repairing and Regeneration. https://doi.org/10.3390/cells11233903 (2022) doi:10.3390/cells11233903.

463. Aleksandrovych, V., Gil, A. & Poniatowski, A. Notes about telocytes and immunity. *Folia Med Cracov* LXII, 101–109 (2022).

464. Romano, E. *et al.* A Two-Step Immunomagnetic Microbead-Based Method for the Isolation of Human Primary Skin Telocytes/CD34+ Stromal Cells. *International Journal of Molecular Sciences Article* https://doi.org/10.3390/ijms21165877 doi:10.3390/ijms21165877.

465. Pekarik, V. & Belmonte, J. C. I. NFIX - One gene, two knockouts, multiple effects. *J Biol* 7, 1–4 (2008).

466. Bui, T. M., Wiesolek, H. L. & Sumagin, R. ICAM-1: A master regulator of cellular responses in inflammation, injury resolution, and tumorigenesis. *J Leukoc Biol* 108, 787 (2020).

467. Halper, J. & Kjaer, M. Basic Components of Connective Tissues and Extracellular Matrix: Elastin, Fibrillin, Fibulins, Fibrinogen, Fibronectin, Laminin, Tenascins and Thrombospondins. *Adv Exp Med Biol* 802, 31–47 (2014).

468. Uitto, J., Olsen, D. R. & Fazio, M. J. Extracellular Matrix of the Skin: 50 Years of Progress. *Journal of Investigative Dermatology* 92, S61–S77 (1989).

469. Jiang, Y., Cheng, D. W., Crook, E. D. & Singh, L. P. Transforming growth factor-β1 regulation of laminin γ1 and fibronectin expression and survival of mouse mesangial cells. *Mol Cell Biochem* 278, 165–175 (2005).

470. Verrecchia, F., Rossert, J. & Mauviel, A. Blocking Sp1 Transcription Factor Broadly Inhibits Extracellular Matrix Gene Expression In Vitro and In Vivo: Implications for the Treatment of Tissue Fibrosis. *Journal of Investigative Dermatology* 116, 755–763 (2001).

471. Pavlakis, E. & Stiewe, T. p53's Extended Reach: The Mutant p53 Secretome. *Biomolecules* 10, 307 (2020).

472. Dzobo, K. & Dandara, C. The Extracellular Matrix: Its Composition, Function, Remodeling, and Role in Tumorigenesis. *Biomimetics 2023, Vol. 8, Page 146* 8, 146 (2023).

473. Edwards, D. R., Handsley, M. M. & Pennington, C. J. The ADAM metalloproteinases. *Mol Aspects Med* 29, 258–289 (2009).

474. Fu, S. *et al.* Telocytes in human liver fibrosis. https://doi.org/10.1111/jcmm.12542 doi:10.1111/jcmm.12542.

475. Wei, X. J., Chen, T. Q. & Yang, X. J. Telocytes in Fibrosis Diseases: From Current Findings to Future Clinical Perspectives. *Cell Transplantation* vol. 31 Preprint at https://doi.org/10.1177/09636897221105252 (2022).

476. Wilgus, T. A. Growth Factor–Extracellular Matrix Interactions Regulate Wound Repair. *Adv Wound Care (New Rochelle)* 1, 249 (2012).

477. Lu, D., Scully, M., Kakkar, V. & Lu, X. ADAM-15 Disintegrin-Like Domain Structure and Function. *Toxins (Basel)* 2, 2411 (2010).

478. Siwik, D. A., Chang, D. L. F. & Colucci, W. S. Interleukin-1 β and tumor necrosis factor-α decrease collagen synthesis and increase matrix metalloproteinase activity in cardiac fibroblasts in vitro. *Circ Res* 86, 1259–1265 (2000).

479. Conover, C. A. The IGF-p53 connection in cancer. *Growth Hormone & IGF Research* 39, 25–28 (2018).

480. Scheiffele, P., Fan, J., Choih, J., Fetter, R. & Serafini, T. Neuroligin expressed in nonneuronal cells triggers presynaptic development in contacting axons. *Cell* 101, 657–669 (2000).

481. Yamagata, M., Duan, X. & Sanes, J. R. Cadherins interact with synaptic organizers to promote synaptic differentiation. *Front Mol Neurosci* 11, 373496 (2018).

482. Hruska, M. & Dalva, M. B. Ephrin regulation of synapse formation, function and plasticity. *Mol Cell Neurosci* 50, 35 (2012).

483. Teo, S. & Salinas, P. C. Wnt-Frizzled Signaling Regulates Activity-Mediated Synapse Formation. *Front Mol Neurosci* 14, 683035 (2021).

484. Tomé, D., Dias, M. S., Correia, J. & Almeida, R. D. Fibroblast growth factor signaling in axons: from development to disease. *Cell Communication and Signaling 2023 21:1* 21, 1–19 (2023).

485. Wang, J., Zhao, X. & Wan, Y. Y. Intricacies of TGF-β signaling in Treg and Th17 cell biology. *Cellular & Molecular Immunology 2023 20:9* 20, 1002–1022 (2023).

486. Larson, C. *et al.* TGF-beta: a master immune regulator. *Expert Opin Ther Targets* 24, 427–438 (2020).

487. Marincola Smith, P., Means, A. L. & Beauchamp, R. D. Immunomodulatory Effects of TGF-β Family Signaling within Intestinal Epithelial Cells and Carcinomas. *Gastrointestinal Disorders 2019, Vol. 1, Pages 290-300* 1, 290–300 (2019).

488. Chen, S. *et al.* Macrophages in immunoregulation and therapeutics. *Signal Transduction and Targeted Therapy 2023 8:1* 8, 1–35 (2023).

489. Scott, T. E. *et al.* IL-4 and IL-13 induce equivalent expression of traditional M2 markers and modulation of reactive oxygen species in human macrophages. *Scientific Reports 2023 13:1* 13, 1–13 (2023).

490. Bernstein, Z. J., Shenoy, A., Chen, A., Heller, N. M. & Spangler, J. B. Engineering the IL-4/IL-13 axis for targeted immune modulation. *Immunol Rev* 320, 29–57 (2023).

491. Tam, H. Y. *et al.* Amelioration of premature aging in Werner syndrome stem cells by targeting SHIP/AKT pathway. *Cell Biosci* 15, 10 (2025).

492. Klein, D. C., Lardo, S. M., McCannell, K. N. & Hainer, S. J. FACT regulates pluripotency through proximal and distal regulation of gene expression in murine embryonic stem cells. *BMC Biol* 21, 1–23 (2023).

493. Solozobova, V. & Blattner, C. p53 in stem cells. *World J Biol Chem* 2, 202 (2011).

494. Molchadsky, A. *et al.* p53 Plays a Role in Mesenchymal Differentiation Programs, in a Cell Fate Dependent Manner. *PLoS One* 3, e3707 (2008).

495. Wang, X. *et al.* p53 functions as a negative regulator of osteoblastogenesis, osteoblast-dependent osteoclastogenesis, and bone remodeling. *Journal of Cell Biology* 172, 115–125 (2006).

496. Kouroupis, D., Kaplan, L. D., Huard, J. & Best, T. M. CD10-Bound Human Mesenchymal Stem/Stromal Cell-Derived Small Extracellular Vesicles Possess Immunomodulatory Cargo and Maintain Cartilage Homeostasis under Inflammatory Conditions. *Cells* 12, 1824 (2023).

497. Rahman, M. M. *et al.* CD13 promotes mesenchymal stem cell-mediated regeneration of ischemic muscle. *Front Physiol* 4, 402 (2014).

498. Bussolati, B. *et al.* Neural-cell adhesion molecule (NCAM) expression by immature and tumor-derived endothelial cells favors cell organization into capillary-like structures. *Exp Cell Res* 312, 913–924 (2006).

499. Francavilla, C. *et al.* The binding of NCAM to FGFR1 induces a specific cellular response mediated by receptor trafficking. *Journal of Cell Biology* 187, 1101–1116 (2009).

500. Kohfeldt, E., Sasaki, T., Göhring, W. & Timpl, R. Nidogen-2: A new basement membrane protein with diverse binding properties. *J Mol Biol* 282, 99–109 (1998).

501. Chiquet-Ehrismann, R. & Tucker, R. P. Tenascins and the Importance of Adhesion Modulation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3, a004960 (2011).

502. Midwood, K. S., Chiquet, M., Tucker, R. P. & Orend, G. Tenascin-C at a glance. *J Cell Sci* 129, 4321–4327 (2016).

503. Grossdorf, A., Tobias Obser, |, Wang, Y. & Gorzelanny, C. Single Molecule Force Spectroscopy at Cell Surfaces to Study Physical Properties of Heparan Sulfate Chains and Protein-Heparan Sulfate Interactions. *Proteoglycan Research* 3, e70017 (2025).

504. Kelso, T. W. R. *et al.* Chromatin accessibility underlies synthetic lethality of SWI/SNF subunits in ARID1A-mutant cancers. *Elife* 6, e30506 (2017).

505. Alver, B. H. *et al.* The SWI/SNF chromatin remodelling complex is required for maintenance of lineage specific enhancers. *Nat Commun* 8, 1–10 (2017).

506. Lewis, A. & Elks, P. M. Hypoxia induces macrophage tnfa expression via cyclooxygenase and prostaglandin E2 in vivo. *Front Immunol* 10, 2321 (2019).

507. Jin, F. *et al.* Impairment of hypoxia-induced angiogenesis by LDL involves a HIF-centered signaling network linking inflammatory TNFα and angiogenic VEGF. *Aging* 11, 328–349 (2019).

508. Zhang, W. *et al.* Macrophages Contribute to the Progression of Infantile Hemangioma by Regulating the Proliferation and Differentiation of Hemangioma Stem Cells. *Journal of Investigative Dermatology* 135, 3163–3172 (2015).

509. Takahashi, N., Tetsuka, T., Uranishi, H. & Okamoto, T. Inhibition of the NF-kappaB transcriptional activity by protein kinase A. *Eur J Biochem* 269, 4559–4565 (2002).

510. Christian, F., Smith, E. L. & Carmody, R. J. The Regulation of NF-κB Subunits by Phosphorylation. *Cells 2016, Vol. 5, Page 12* 5, 12 (2016).

511. Kadoch, C., Copeland, R. A. & Keilhack, H. PRC2 and SWI/SNF Chromatin Remodeling Complexes in Health and Disease. *Biochemistry* 55, 1600–1614 (2016).

512. Chandler, R. L. *et al.* ARID1a-DNA Interactions Are Required for Promoter Occupancy by SWI/SNF. *Mol Cell Biol* 33, 265 (2013).

513. Morrison, E. A. *et al.* DNA binding drives the association of BRG1/hBRM bromodomains with nucleosomes. *Nat Commun* 8, 16080 (2017).

514. Bögershausen, N. & Wollnik, B. Mutational Landscapes and Phenotypic Spectrum of SWI/SNF-Related Intellectual Disability Disorders. *Front Mol Neurosci* 11, 400386 (2018).

515. De la Serna, I. L., Carlson, K. A. & Imbalzano, A. N. Mammalian SWI/SNF complexes promote MyoD-mediated muscle differentiation. *Nat Genet* 27, 187–190 (2001).

ANNEXES

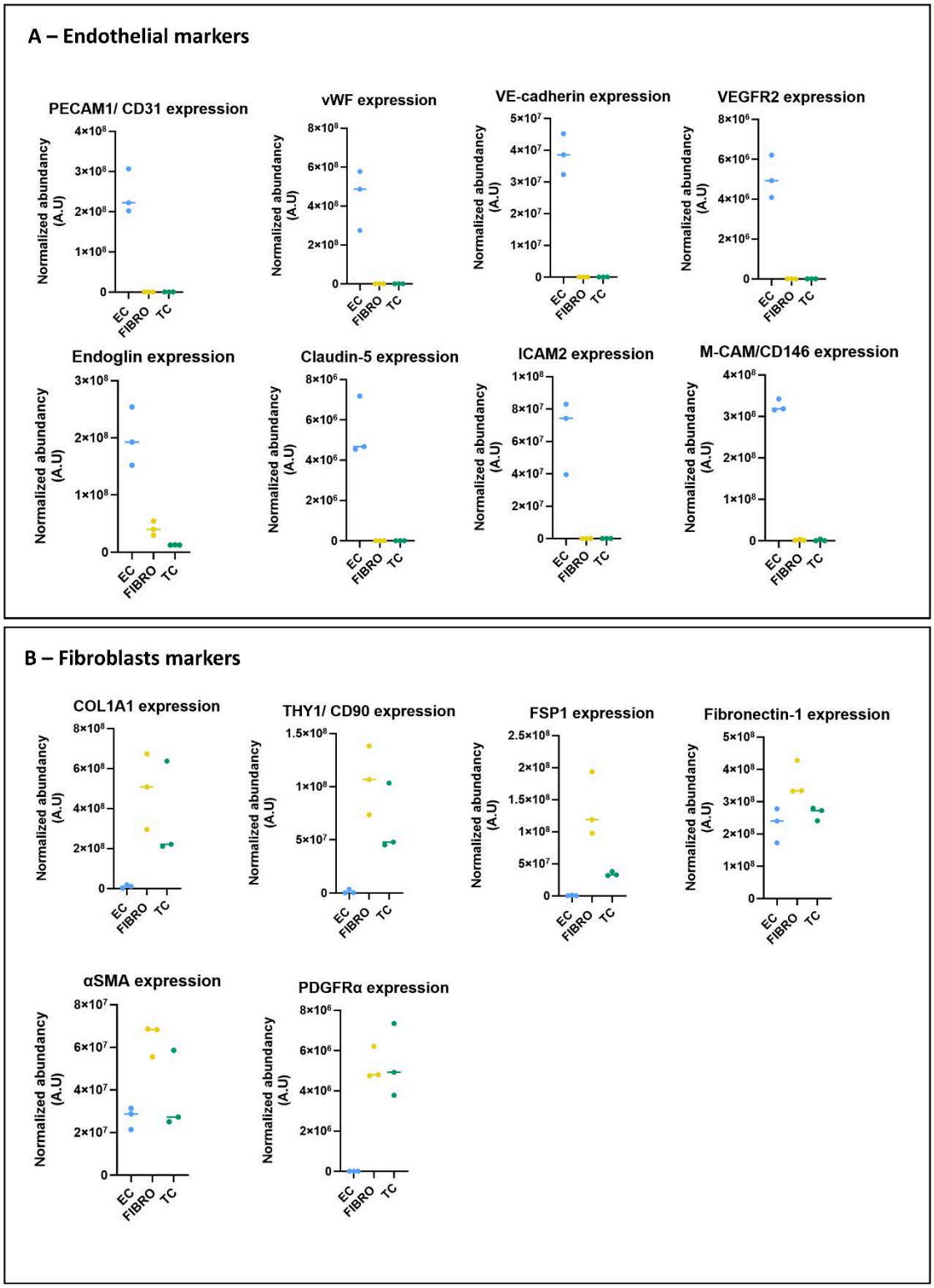


Figure 92: Annexe 1 -Contrôle qualité par vérification des marqueurs connus des EC (A) et FB (B).

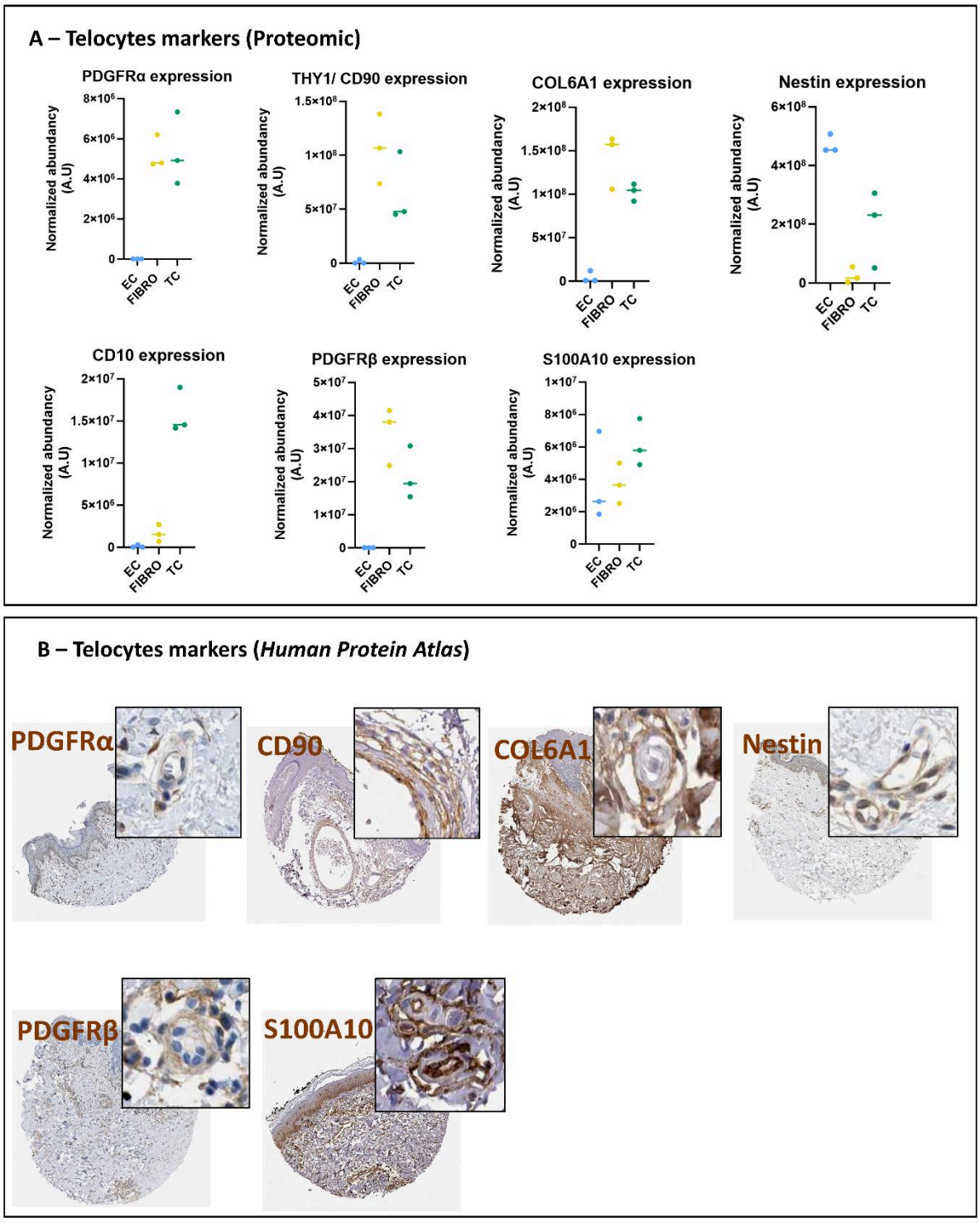


Figure 93: Annexe 2- Expression des marqueurs des TC de la littérature dans les TC cutanés

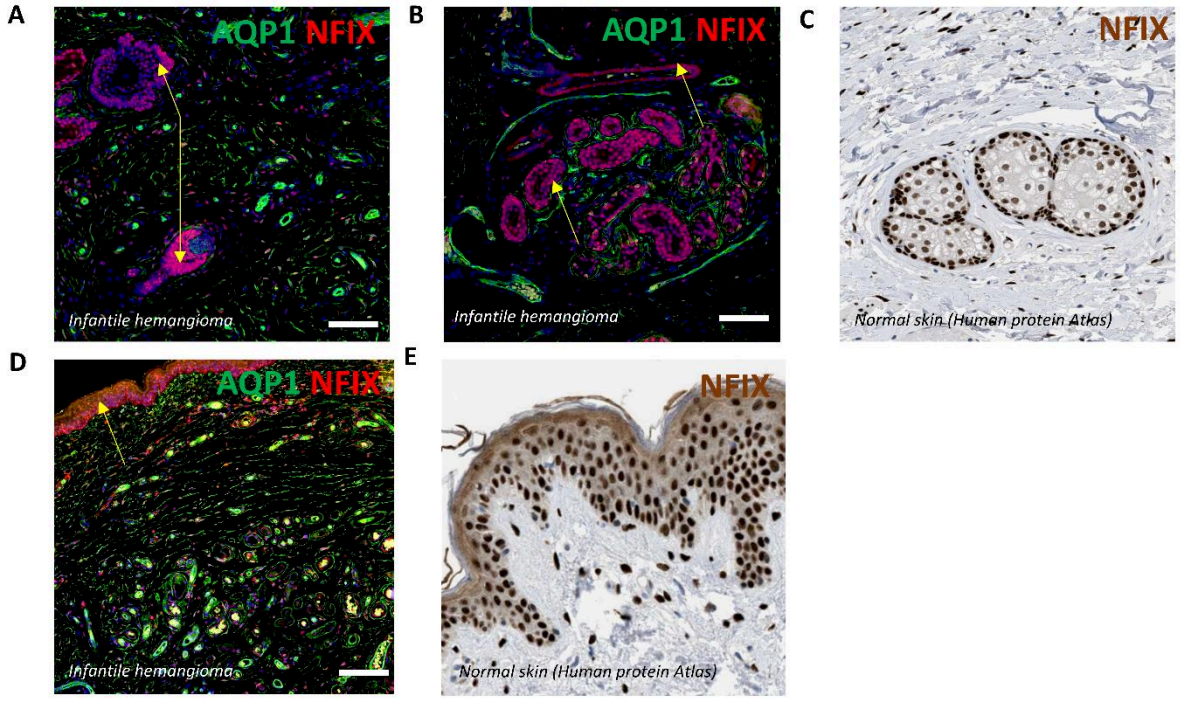


Figure 94: Annexe 3 – Cellules cutanées positives pour le marqueur NFIX

***A,B,D**) Immunofluorescence d'une coupe FFPE d'un hémangiome infantile des TC (AQP1 , vert) et du marqueur nucléaire NFIX (rouge). Les flèches jaunes montrent la positivité des A) kératinocytes des follicules pileux, Barre d'échelle = 50µm B) les cellules claires et sombres des glomérules des glandes sudoripares eccrines ainsi que les cellules canalaires des canaux, Barre d'échelle = 50µm D) kératinocytes de l'épiderme, Barre d'échelle = 200µm. **C-E**) Immunohistochimie de NFIX d'une peau saine (Human protein Altas) montrant l'expression de NFIX dans C) les cellules basales des glandes sudoripares et E) les kératinocytes de l'épiderme.*

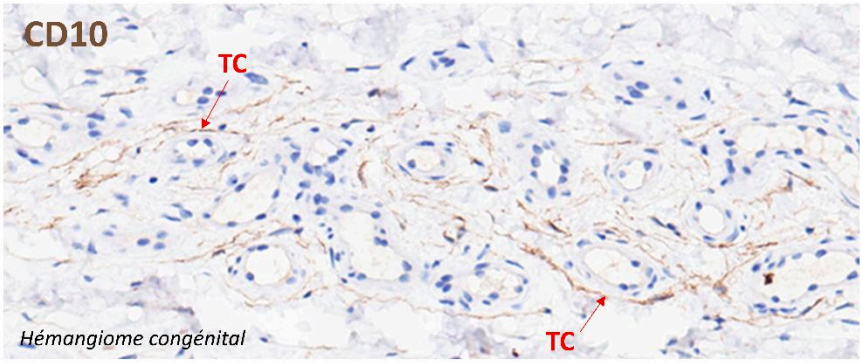


Figure 95: Annexe 4 - Immunohistochimie anti-CD10 d'un hémangiome congénital (NICH)

Immunohistochimie anti-CD10 d'un NICH. Les flèches rouges pointent les cellules périvasculaires positives (TC). Réalisé au service d'anatomo-histopathologie du CHU de Bordeaux par Marie-Laure Jullié.

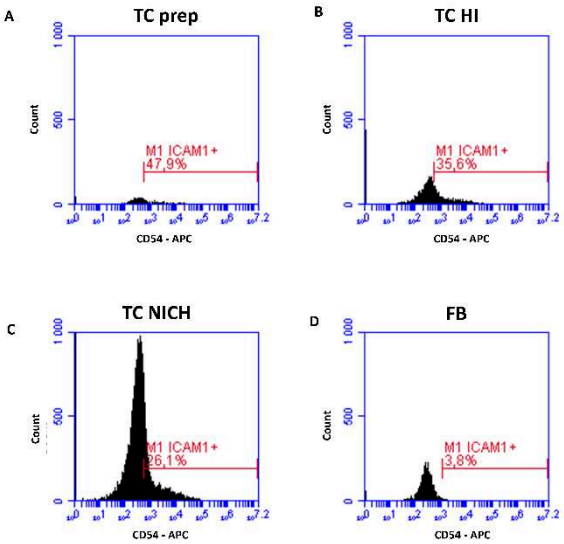


Figure 96: Annexe 5 - Etude de l'expression membranaire de ICAM1/CD54

***A-D**) Cytométrie en flux de CD54 membranaire des TC physiologiques (prépuce, A), d'hémangiome infantile (B), d'hémangiome congénital (C) et de fibroblastes physiologique (hFF-TERT, prépuce, D).*

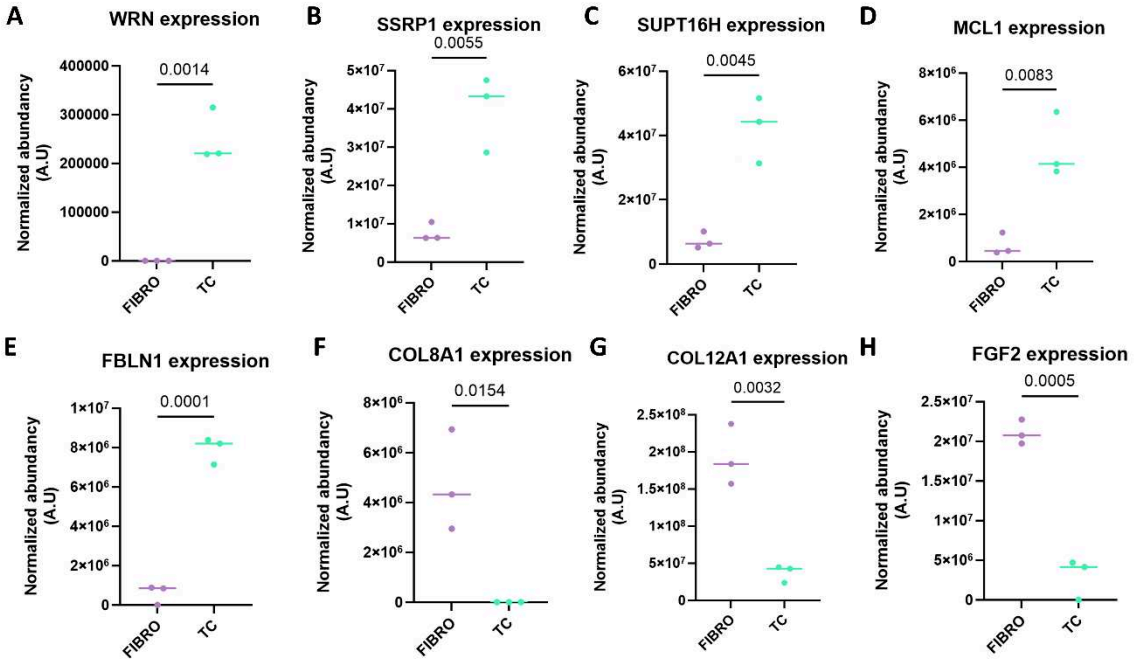


Figure 97: Annexe 6 - Analyses d'expression différentielles de protéines individuelles des FB vs TC

Comparaison des abondances normalisées entre les FB et les TC de prépuce. Test de Mann-Whitney, α = 0.05.

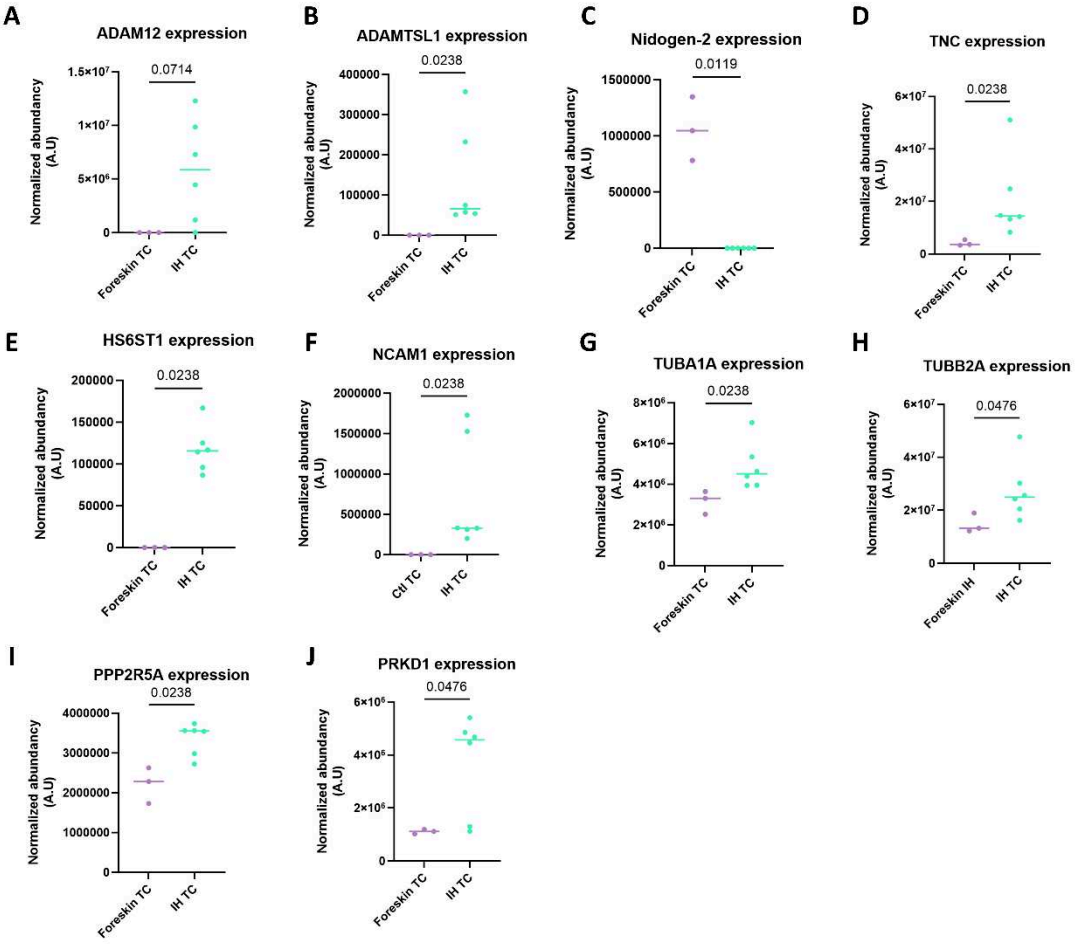


Figure 98: Annexe 7 - Analyses d'expression différentielles de protéines individuelles des TC de prépuce vs TC HI

Comparaison des abondances normalisées entre les FB et les TC de prépuce. Test de Mann-Whitney, α = 0.05.

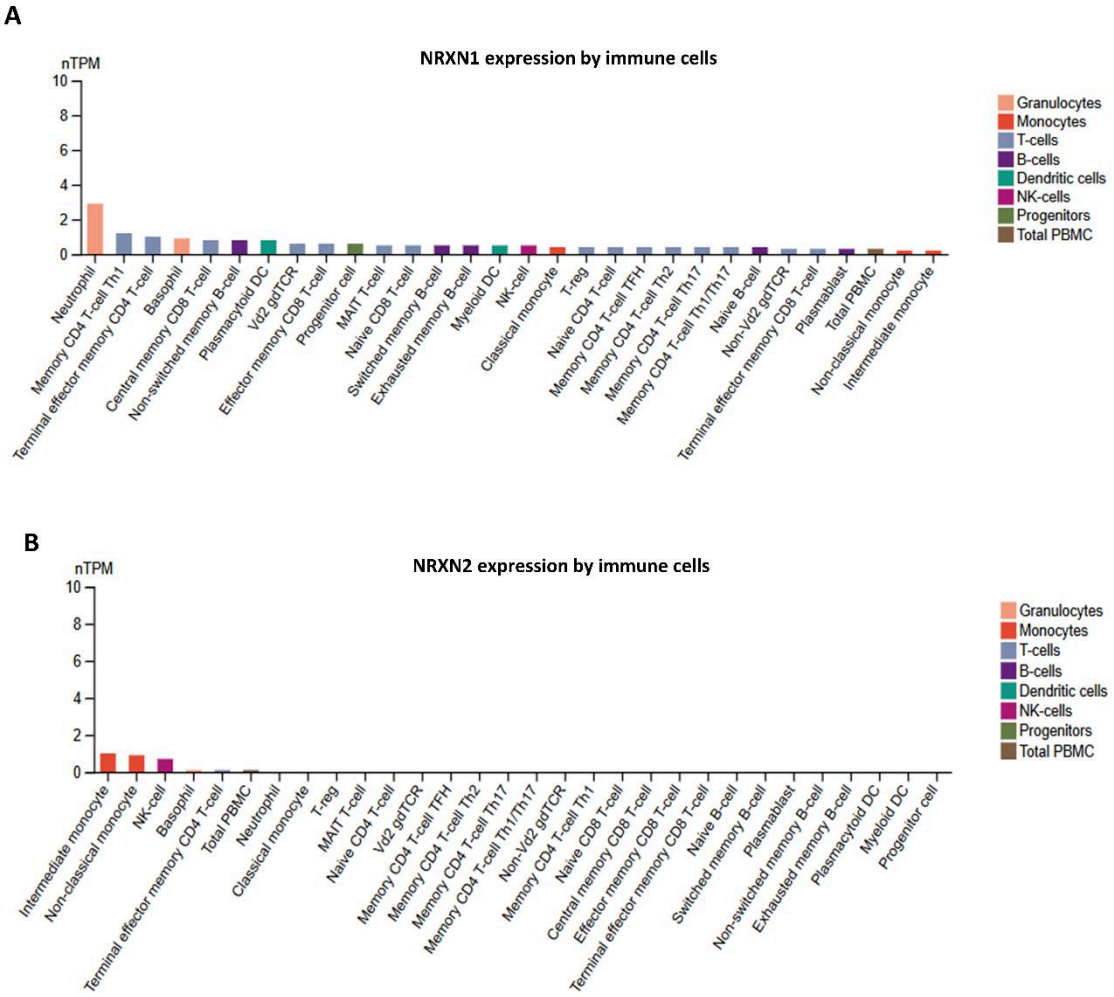


Figure 99: Annexe 8 - Expression de NRXN1 et NRXN2 par les cellules immunitaires

Données de Single-Cell Transcriptomique tirées de Human Protein Atlas montrant l'expression de NRXN1 (A) et NRXN2 (B) dans les cellules immunitaires.

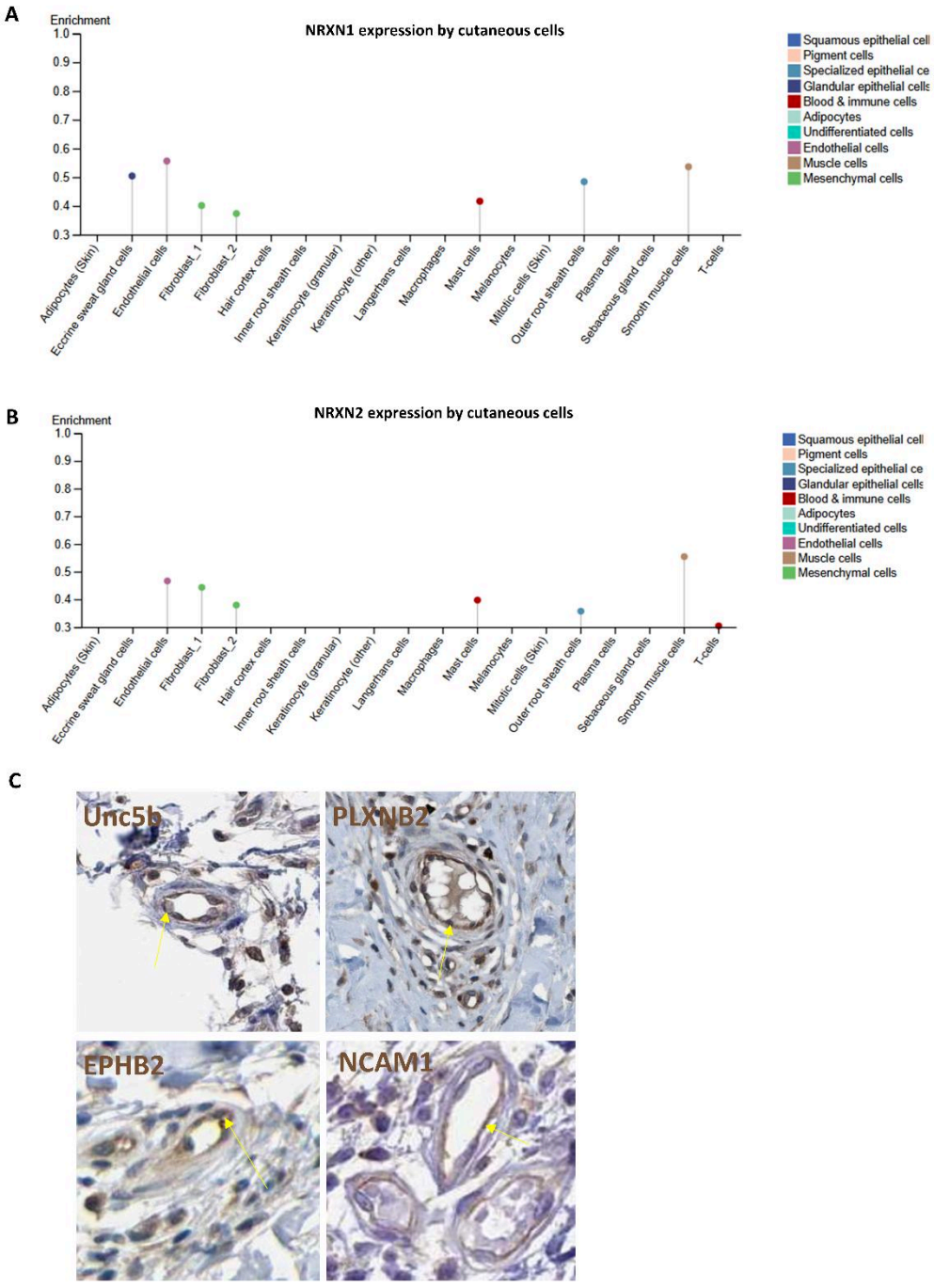


Figure 100: Annexe 9 - Expression des neurexines et des récepteurs aux facteurs de guidance axonal par les cellules cutanées

***A-B**) Données de Single-Cell Transcriptomique tirées de Human Protein Atlas, montrant l'expression de NRXN1 (A) et NRXN2 (B) dans les cellules cutanées. **C**) Immunohistochimies tirées de Human Protein Atlas des récepteurs aux facteurs de guidance axonale dans la peau saine. Les flèches jaunes pointent les cellules endothéliales.*

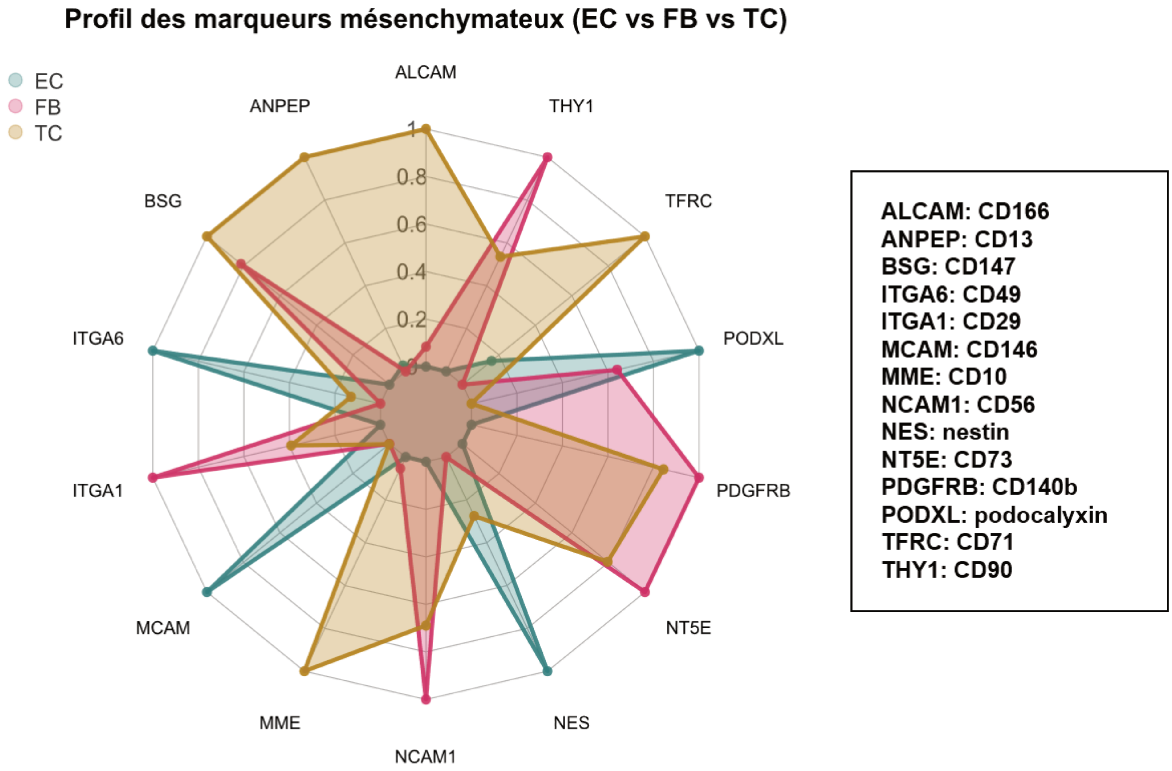


Figure 101: Annexe 10 - Radar plot des marqueurs de cellules souches mésenchymateuses exprimées par les EC, FB et TC

Les données ont été normalisées dans l'intervalle [0 ;1] par rapport aux données minimales (0) et maximales (1) détectées dans les EC, TC et FB. Ainsi, les valeurs situées à 0 ne sont pas forcément nulles.

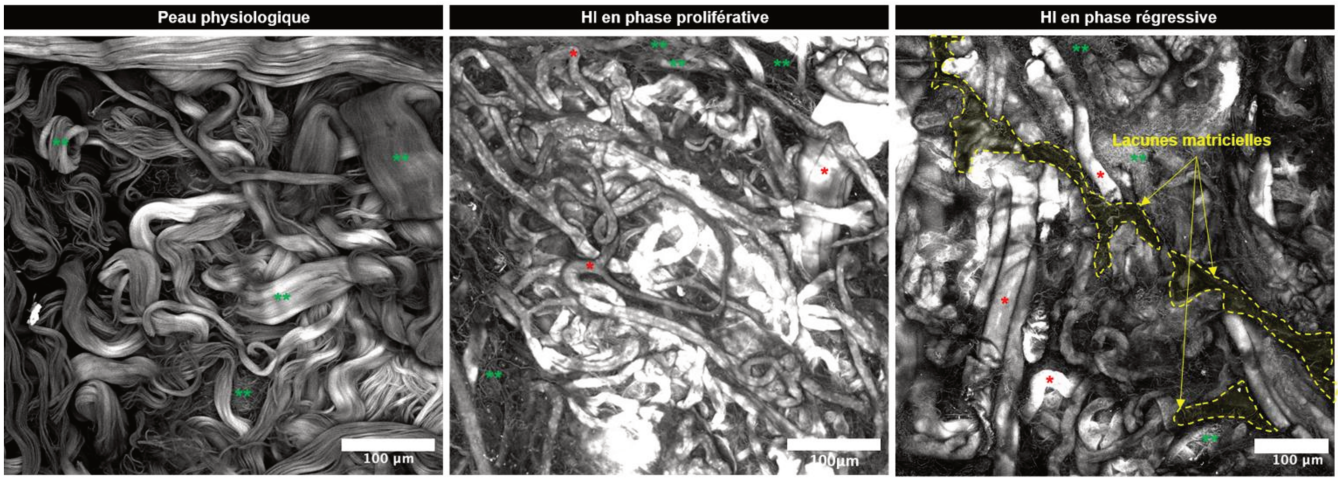


Figure 102: Annexe 11 - Immunofluorescence 3D des fibres de collagène dans la peau saine ou d'HI

Immunomarquage au Fast Green des fibres de collagène de peaux transparisées. Les astérisques verts montrent les fibres de collagène, les astérisques rouges montrent les capillaires sanguins. Les ROIs jaunes montrent les lacunes matricielles. Toutes les barres d'échelles = 100µm. Imagerie confocale (grossissement x20, z-stack = 400µm). Image en projection d'intensité maximale.

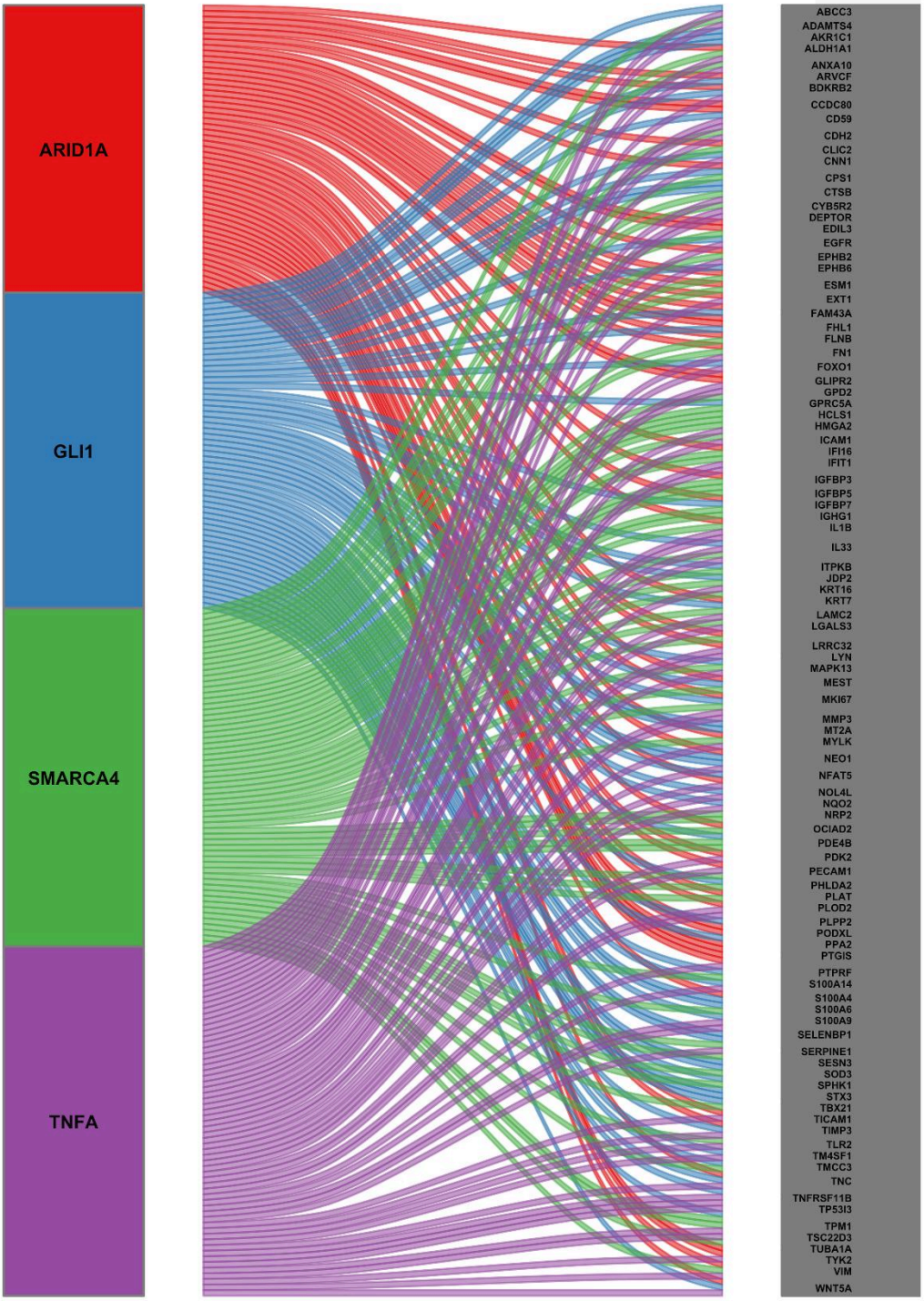


Figure 103: Annexe 12 - Sankey plot des principaux upstream regulators des TC HI et de leurs cibles.

La colonne de gauche représente les upstream regulators prédits. La colonne de droite représente les protéines surexprimées dans les TC d'HI pouvant être régulées par les upstream regulators.

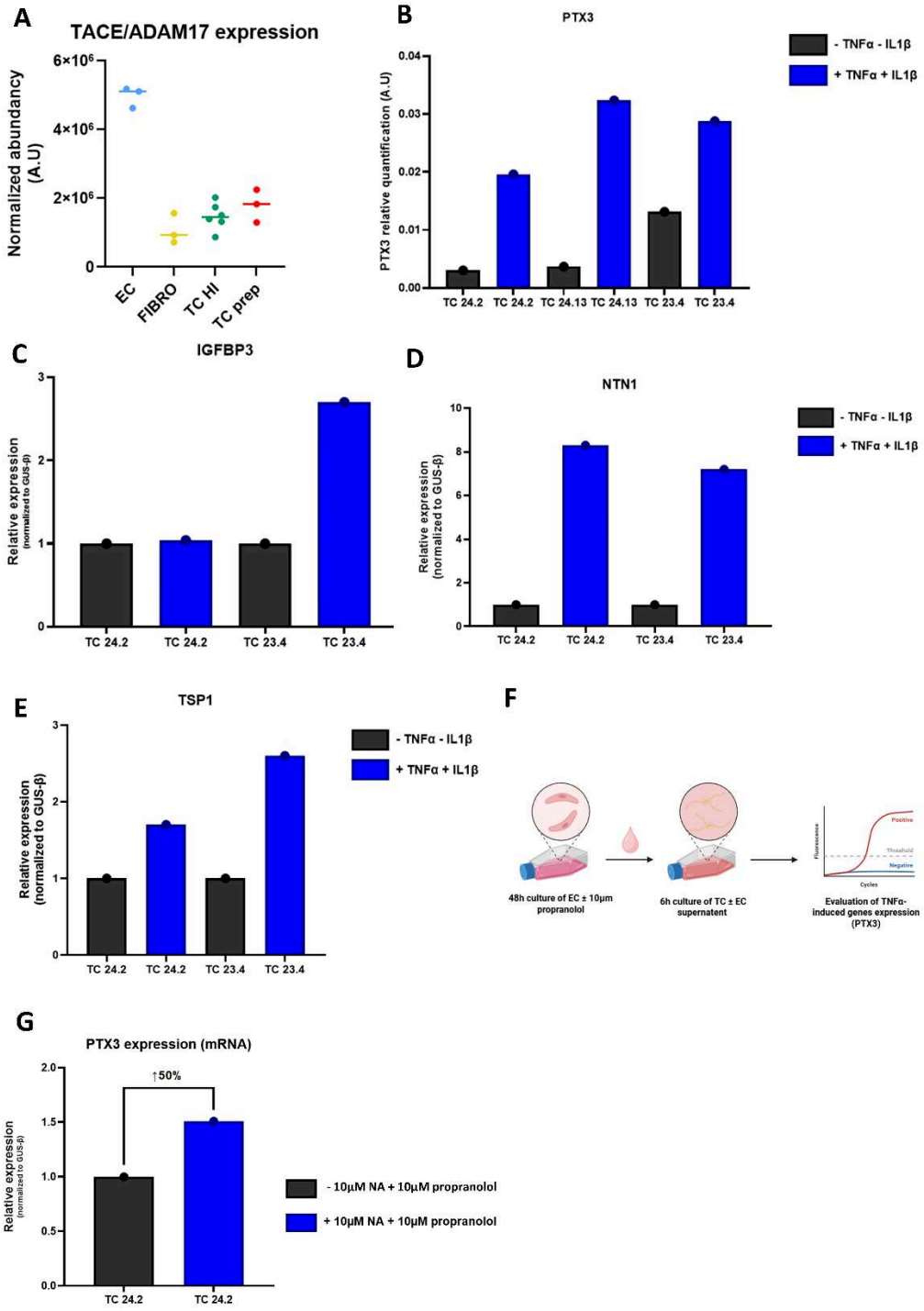


Figure 104: Annexe 13 : Reprogrammation inflammatoire des TC cutanés

***A**)Abondances normalisées de l'enzyme ADAM17 par les cellules stromales cutanées. **B-E**) Expression relative du gène PTX3 (B), IGFBP3 (C), NTN1 (D) et THBS1 (E) de télocytes cutanés physiologiques (TC 24.2, TC 24.13) ou d'HI prolifératifs (TC 23.4), stimulés ou non avec 10ng/mL de TNFα et IL1-β recombinant. **F**) Schéma expérimental de l'impact indirect du propranolol sur l'expression de PTX3 par les TC cutanés. **G**) Expression de PTX3 de TC exposés au surnageant d'EC stimulée ou non par 10µM de propranolol.*

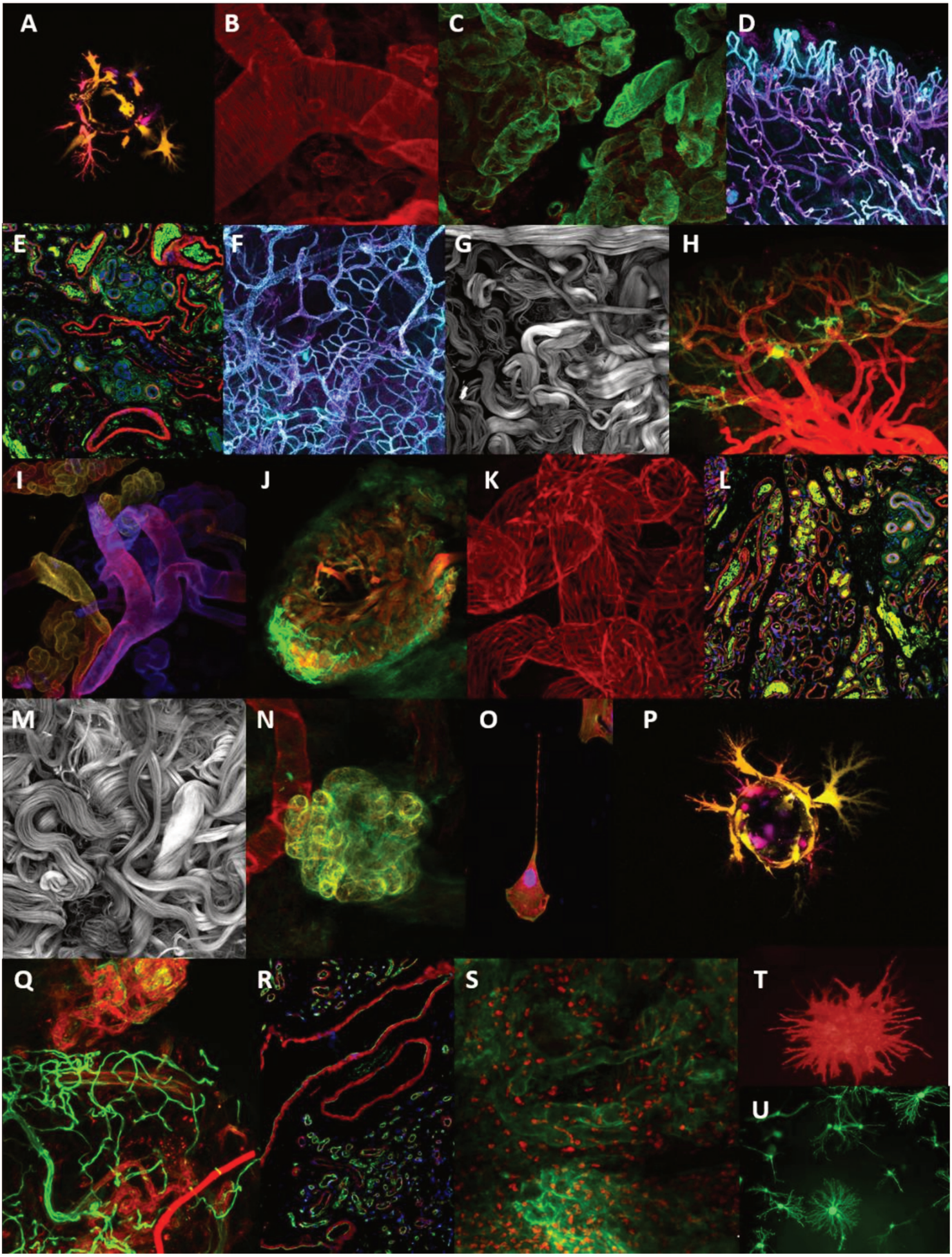

A
B
C
D
E
F
G
H
I
J
K
L
M
N
O
P
Q
R
S
T
U

Figure 105: Annexe 14 - Panel d'images non publiées ou présentées dans le manuscrit de thèse

***A-P**) : HUVEC sur une bille Cytodex incluses en hydrogel de fibrine. Les couleurs de pixels correspondent à leur position dans le stack (color depth coding). **B**) Péricytes (αSMA, rouge) des artères et artérioles d'un HI transparisé. **C**) Péricytes (αSMA, vert) et EC (CD34, rouge) de vaisseaux du HI transparisé. **D-F**) Vascularisation physiologique de prépuces transparisés, révélant les cellules endothéliales (CD34 et AQP1). **E-L**) Immunofluorescence sur coupe FFPE d'un HI, révélant les péricytes (αSMA, rouge) et les télocytes (AQP1, vert). **G-M**) Marquage des collagènes fibrillaires (fast-green) de prépuces transparisés **I**) Marquage des péricytes d'un HI prolifératif transparisé. Les couleurs de pixels correspondent à leur position dans le stack (color depth coding). **J**) Marquage des péricytes (αSMA, rouge) et des télocytes (AQP1, vert) d'un lobule de vaisseaux d'HI transparisé. **K**) Cellules myoépithéliales (αSMA, rouge) de canaux des glandes sudoripares eccrines d'un HI transparisé. **N**) Marquage des cellules myoépithéliales (αSMA, rouge) et des télocytes (AQP1, vert) d'un peloton eccrine d'un HI transparisé. **O**) Immunofluorescence d'un TC en culture marqué par CD34 (rouge) et la phalloïdine (actine, vert). Le télopode a une morphologie moniliforme. **Q**) Marquage de l'endothélium (ICAM1, rouge) et du maillage de télocytes (AQP1, vert) d'un HI en régression transparisé. **R**) Immunofluorescence FFPE d'un NICH révélant les péricytes (αSMA, rouge) et les EC (AQP1, vert). **S**) Marquage des télocytes (AQP1, vert) et des mastocytes (tryptase, rouge) d'un HI transparisé. **T**) Inclusion de sphéroïdes d'HUVEC dans un gel de fibrine. **U**) Inclusion de TC en culture dans un gel de fibrine.*

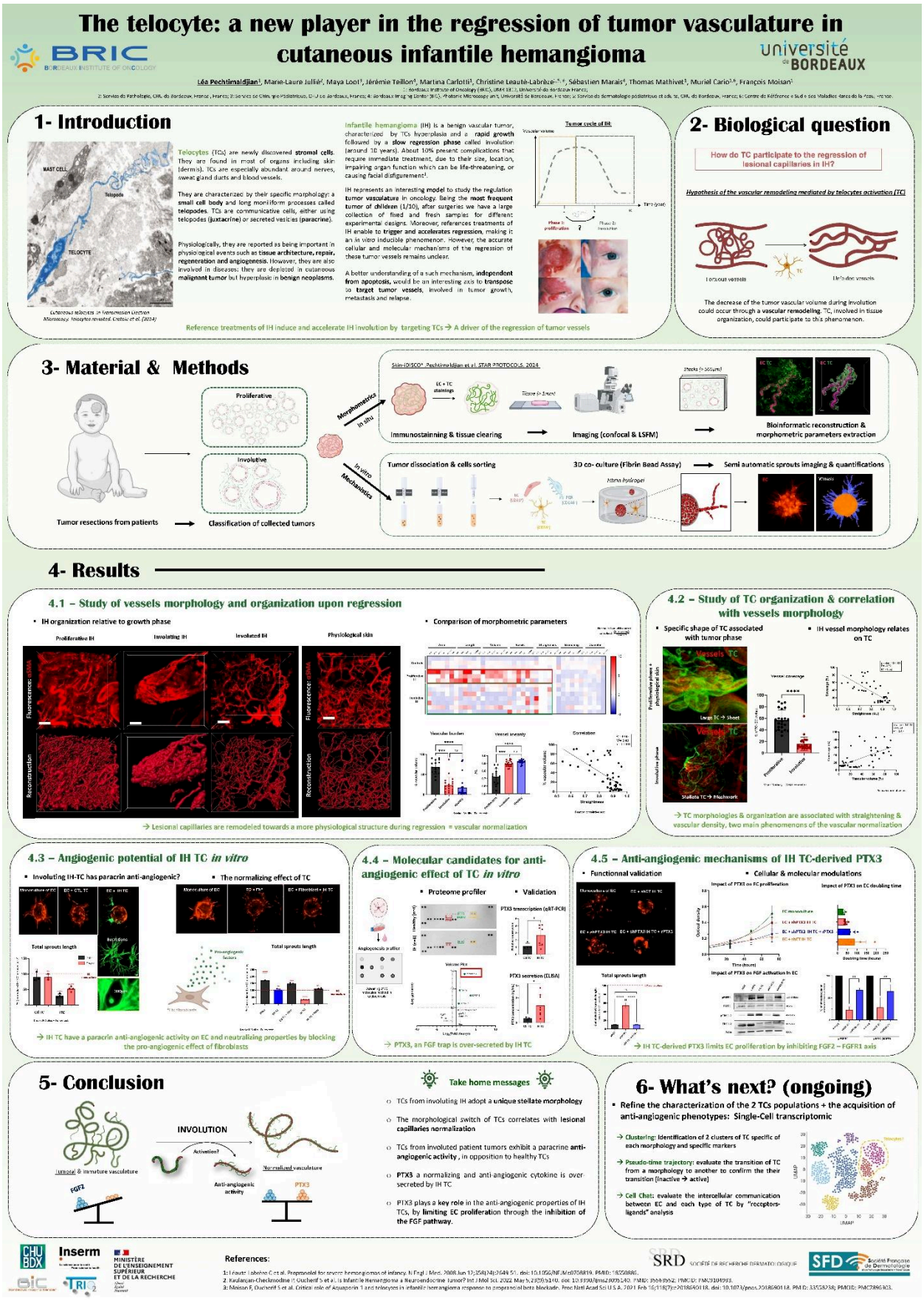


Figure 106: Annexe 15 - Poster présenté au CARD en juin 2025

Études des télocytes cutanés dans l'hémangiome infantile : caractérisation, propriétés angiogéniques et approches thérapeutiques

L'hémangiome infantile (HI) est une tumeur vasculaire bénigne, essentiellement cutanée. C'est la tumeur la plus fréquente du nouveau-né. Elle peut atteindre rapidement une taille importante et entraîner des complications fonctionnelles ou esthétiques. Elle se caractérise par une phase proliférative suivie d'une involution spontanée, ce qui en fait un modèle unique pour l'étude des mécanismes de régression vasculaire. Le traitement de référence, le propranolol, accélère cette régression, notamment en ciblant une population stromale récemment identifiée : les télocytes (TC). Ces cellules interstitielles jusque-là peu étudiées, se caractérisent par de longues extensions cytoplasmiques appelées télopodes et forment un réseau périvasculaire. Les TC sont présents dans de nombreux organes et sont impliqués dans l'homéostasie tissulaire et l'angiogenèse.

L'objectif de cette thèse a été de caractériser l'évolution du réseau vasculaire au cours de la régression de l'HI et d'évaluer la contribution des TC à ce processus. Nous avons d'abord développé un protocole innovant de transparisation des biopsies cutanées humaines, permettant pour la première fois l'imagerie 3D en « large-volume » de leur architecture vasculaire et de leur environnement cellulaire. L'analyse morphométrique a permis de décrire de manière qualitative et quantitative les vaisseaux d'HI prolifératifs, particulièrement longs, tortueux et volumineux. Durant la régression, nous avons observé un processus de normalisation vasculaire impliquant la probable maturation des vaisseaux persistants et le pruning progressif des structures immatures, sans vague apoptotique massive.

Parallèlement, les TC des HI prolifératifs évoluent d'une morphologie en feuillet (spindle-shape), similaire à celle observée dans la peau saine, vers une morphologie dendritique unique et spécifique à la phase de régression. Cette transition suggère un changement fonctionnel profond.

Afin d'évaluer leur rôle angiogénique, nous avons adapté le *fibrin bead assay* pour y incorporer des TC dérivés de patients. Nos résultats montrent que les TC en feuillet n'ont pas d'effet significatifs sur la biologie des cellules endothéliales. En revanche, les TC dendritiques, dérivés d'HI en régression, exercent un effet paracrine anti-angiogénique, en bloquant spécifiquement la prolifération et le bourgeonnement endothélial. Les analyses de screening ont montré la sécrétion de pièges à facteurs de croissance, dont la pentraxine-3 (PTX3), qui s'est imposée comme médiateur principal. PTX3 agit comme un piège pour le FGF-2, inhibant la prolifération, déstabilisant la VE-cadhérine et augmentant la motilité endothéliale, facilitant ainsi le remodelage vasculaire. Les TC favorisent également la migration endothéliale, par des mécanismes indépendants de PTX3, en faveur du recyclage cellulaire dans les vaisseaux persistants.

Ces résultats positionnent les TC comme des régulateurs centraux de la régression vasculaire de l'HI via un programme paracrine anti-angiogénique. Des approches de transcriptomique Single-cell en cours visent à caractériser l'hétérogénéité et la plasticité des TC au cours de cette transition. Comprendre comment induire cet état « normalisant » des TC pourrait ouvrir de nouvelles perspectives thérapeutiques en cancérologie. Contrairement aux agents anti-angiogéniques actuels souvent limités par des résistances adaptatives, nous suggérons que l'action cellulaire des TC offre un potentiel inédit pour rééquilibrer la balance angiogénique dans les tumeurs solides.

Mots clefs : Angiogenèse, microenvironnement, dermatologie, nouvelles cibles, imagerie