

Université de Montréal

*Étude du rôle du récepteur ALK1 dans l'infiltration leucocytaire dans l'endothélium*

*Par*

Forget, Arthur

Programme de biologie moléculaire et cellulaire de l'Université de Montréal

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de maîtrise  
en Biologie Moléculaire et Cellulaire, option Maladies complexes

Août 2021

© Forget Arthur, 2021



Université de Montréal

Programme de biologie moléculaire et cellulaire de l'Université de Montréal

*Ce mémoire intitulé*

**Étude du rôle du récepteur ALK1 dans l'infiltration leucocytaire dans l'endothélium**

*Présenté par*

**Arthur Forget**

*A été évalué(e) par un jury composé des personnes suivantes*

**Éric Milot**

Président-rapporteur

**Bruno Larrivé**

Directeur de recherche

**Venkata Manem**

Membre du jury



## Résumé

Le recrutement des leucocytes dans les tissus est un processus courant dans toutes les maladies inflammatoires de l'adulte. Celui-ci est médié par des interactions de haute affinité entre les molécules d'adhésion endothéliales à la surface des vaisseaux sanguins et leurs ligands sur les cellules immunitaires circulantes. Ce processus implique une multitude de molécules telles que ICAM1, VCAM1 et les sélectines pour soutenir la « capture » des cellules immunitaires et leur extravasation à travers les cellules endothéliales vasculaires. Nos résultats préliminaires suggèrent que le récepteur ALK1, exprimé spécifiquement sur les cellules endothéliales, pourrait réguler l'expression de ces molécules d'adhésion. Pour examiner l'impact de la signalisation ALK1 sur le recrutement des cellules immunitaires, nous avons utilisé des lignées de cellules endothéliales siALK1 (HUVECs) traitées avec du lipopolysaccharide (LPS) pour induire un processus inflammatoire. Tout d'abord, l'expression des gènes, examinée par Ampliseq, a montré une diminution significative de l'expression de ICAM1, VCAM1 et E-sélectine dans les HUVECs siALK1 par rapport au contrôle. De plus, l'analyse par cytométrie en flux a démontré que l'expression des protéines d'adhésion augmentent dans les cellules traitées avec du LPS, mais que cet effet est atténué dans les cellules endothéliales dépourvues d'ALK1. De plus, nous avons observé que le p38 phosphorylé, un facteur qui joue un rôle clé dans le processus inflammatoire, est diminué dans les cellules siALK1. Enfin, pour étudier les conséquences fonctionnelles de la délétion d'ALK1 sur les interactions leucocytes/cellules endothéliales, un test d'adhésion en flux est réalisé, dans lequel les leucocytes circulent sur les cellules endothéliales et l'extravasation des cellules immunitaires est observée au microscope. Les résultats ont montré une diminution de l'infiltration des leucocytes dans les HUVECs siALK1 par rapport aux témoins. En conclusion, nos données démontrent qu'ALK1 a un impact majeur sur le recrutement des leucocytes vers l'endothélium par l'expression de protéines d'adhésion ainsi que par la normalisation vasculaire. Ce projet contribue à une meilleure compréhension de l'interaction entre les leucocytes et l'endothélium vasculaire.

**Mots-clés :** Angiogenèse, Normalisation, ALK1, BMP9, Inflammation, Leucocytes, Recrutement

## Abstract

Leukocyte recruitment into tissues is a common process in all adult inflammatory diseases. This is mediated by high affinity interactions between endothelial adhesion molecules and their counter receptor ligands on circulating immune cells. This process involves a multitude of molecules such as ICAM1, VCAM1 and selectins to support the "capture" of immune cells and their extravasation through vascular endothelial cells. Our preliminary results suggest that ALK1 receptor, expressed specifically on endothelial cells, could regulate the expression of these adhesion molecules. To examine the impact of ALK1 signaling on immune cells recruitment, we used siALK1 endothelial cell lines (HUVECs) treated with LPS (Lipopolysaccharide) to induce an inflammatory process. First, gene expression, examined by Ampliseq, showed a significant decrease in ICAM1, VCAM1 and E-selectin expression in siALK1 HUVECs compared to control. Furthermore, flow cytometry analysis demonstrated that adhesion protein expression increases in control cells treated with LPS, but that this effect is lessened in endothelial cells lacking ALK1. Moreover, we observed that phosphorylated p38, a factor that plays a key role in inflammatory process, is decreased in siAlk1 cells. Finally, to study the functional consequences of ALK1 deletion on leukocyte/endothelial cells interactions, a flow adhesion assay is performed, in which leukocytes circulate on endothelial cells and extravasation of immune cells is observed under a microscope. The results showed decreased leukocyte infiltration in siALK1 HUVECs compared to controls. In conclusion, our data demonstrate that ALK1 has a major impact on leukocyte recruitment to the endothelium through the expression of adhesion proteins and the vascular normalization. This project contributes to a better understanding of the interaction of leukocytes and the vascular endothelium.

**Keywords:** Angiogenesis, Normalization, ALK1, BMP9, Inflammation, Leukocytes, Recruitment

# Table des matières

<b>Résumé.....</b>	<b>5</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>6</b>
<b>Table des matières.....</b>	<b>7</b>
<b>Liste des figures .....</b>	<b>11</b>
<b>Liste des sigles et abréviations .....</b>	<b>13</b>
<b>Remerciements .....</b>	<b>17</b>
<b>Chapitre 1 – Introduction .....</b>	<b>19</b>
<b>1.1 Le système circulatoire .....</b>	<b>19</b>
<b>1.2 Le développement des vaisseaux sanguins.....</b>	<b>19</b>
1.2.1 L’activation.....	20
1.2.2 La migration .....	22
1.2.3 La formation et la maturation .....	23
<b>1.3 L’angiogenèse tumorale .....</b>	<b>23</b>
<b>1.4 Caractéristique des tumeurs.....</b>	<b>26</b>
<b>1.5 Thérapie anti-angiogénique .....</b>	<b>27</b>
<b>1.6 Les facteurs moléculaires de l’angiogenèse .....</b>	<b>28</b>
1.6.1 La famille du VEGF.....	28
1.6.2 La famille BMP.....	29
1.6.3 Les récepteurs aux BMPs .....	31
1.6.4 La voie Smad et les autres voies.....	32
1.6.5 Rôle de la signalisation BMP dans l’organisme .....	32
1.6.6 La signalisation BMP dans les maladies vasculaires .....	33
1.6.7 La signalisation ALK1 .....	34
1.6.8 Effet du BMP9 .....	35
1.6.9 Normalisation vasculaire.....	35
<b>1.7 L’inflammation.....</b>	<b>36</b>

1.7.1	La réponse innée .....	36
1.7.2	Les récepteurs de type Toll et leur signalisation .....	37
1.7.3	La réponse immunitaire adaptative .....	39
1.7.4	Le recrutement des leucocytes et les protéines d'adhésion .....	40
1.7.5	Inflammation dans le cancer .....	41
1.9	Hypothèse de travail.....	42
<b>Matériel et Méthodes .....</b>		<b>43</b>
<b>Culture cellulaire .....</b>		<b>43</b>
<b>Animaux et Modèle de tumeur .....</b>		<b>43</b>
<b>Transfection des siARN et Traitement des cellules HUVECS.....</b>		<b>44</b>
<b>Extraction d'ARN et Séquençage .....</b>		<b>44</b>
<b>Cytomètre de Flux .....</b>		<b>45</b>
<b>Immunobuvardage.....</b>		<b>45</b>
<b>Expérience d'adhésion leucocytaire in vitro .....</b>		<b>46</b>
<b>Marquage immunofluorescent .....</b>		<b>46</b>
<b>Traitements chimiothérapeutiques .....</b>		<b>47</b>
<b>Résultats .....</b>		<b>48</b>
3.1	L'implication de ALK1 dans l'expression des gènes de l'inflammation .....	48
3.2	Évaluation du rôle de ALK1 dans l'expression des protéines d'adhésion leucocytaires .....	50
3.3	ALK1 est impliqué dans la phosphorylation de p38.....	53
3.4	ALK1 influence l'adhésion des leucocytes sur l'endothélium .....	55
3.5	Évaluation du recrutement leucocytaire dans des tumeurs de souris ALK1 $\Delta$ EC .....	58
3.6	La délétion de ALK1 affecte le recrutement de plusieurs types leucocytaires dans les tumeurs .....	60
3.7	La normalisation vasculaire induite par BMP9/ALK1 aide à augmenter l'efficacité des traitements chimio-thérapeutiques. ....	62
<b>Discussion.....</b>		<b>65</b>



**Références bibliographiques .....71**



## Liste des figures

Figure 1. – Schéma représentatif des différentes étapes de l'angiogenèse par bourgeonnement. ....	21
Figure 2. – Schéma des mécanismes moléculaires lors de l'angiogenèse par bourgeonnement.....	22
Figure 3. – Schéma représentant les différents réseaux vasculaires dans des conditions normales, tumorales et tumeur normalisée. ....	24
Figure 4. – Schéma des différents mécanismes de formation de vaisseaux sanguins dans les tumeurs.....	26
Figure 5. – Schéma des différentes liaisons entre les VEGF et leurs récepteurs.....	29
Figure 6. – Schéma de la signalisation des BMPs de la paroi cellulaire jusqu'au noyau .....	30
Figure 7. – Différents membres des TLRs avec les PAMPs associés basé sur un modèle murin .....	38
Figure 8. – Schéma de la signalisation de TLR4.....	39
Figure 9. – Schéma représentatif de la diapédèse des leucocytes sur l'endothélium .....	41
Figure 10. – Résultat de cytométrie démontrant une plus grande population de cellules immunitaires infiltrantes dans les tumeurs sur exprimant BMP9 .....	42
Figure 11. – La délétion du gène ALK1 diminue l'expression des gènes de la réponse inflammatoire dans les cellules endothéliales.....	49
Figure 12. – ALK1 diminue l'expression des gènes des protéines d'adhésion dans des conditions inflammatoires. ....	50
Figure 13. – Analyse de l'expression des protéines d'adhésion dans des HUVECS contrôles ou ALK1 KO suite à des stimulations au LPS avec ou sans BMP9.....	52
Figure 14. – Analyse de l'expression des protéines d'adhésion dans des cellules endothéliales isolées de cerveaux de souris contrôles ou ALK1 $\Delta$ EC .....	53
Figure 15. – La délétion de ALK1 diminue la phosphorylation de p38 dans des conditions inflammatoires. ....	54

Figure 16. – La délétion de ALK1 réduit l’adhésion des leucocytes sur l’endothélium..	56
Figure 17. – La délétion de ALK1 réduit l’adhésion des leucocytes sur l’endothélium dans les conditions inflammatoires..	57
Figure 18. – Le réseau vasculaire désordonné des souris ALK1-KO mène à une infiltration hétérogène des leucocytes dans la tumeur.	59
Figure 19. – La délétion de ALK1 réduit le nombre de leucocytes infiltrants dans les tumeurs LLC.	62
Figure 20. – La surexpression de BMP9 améliore l’efficacité des traitements chimiothérapeutiques.	64

## Liste des sigles et abréviations

ActR: Activin Receptor

ALK: Activin like kinase receptor

Ang: Angiopoïétine

ATF: Activating transcription factor

BMP: Bone morphogenetic factor

CE: Cellules endotheliales

DMEN: Dulbecco's Modified Eagle's Medium

FBS: Fetal Bovin Serum

FGF: Fibroblast growth factor

Flk: Fetal liver kinase

Flt: Fms like tirosine kinase

GDF: Growth differentiation factor

GSEA: Gene Set Enrichment Analyse

HEY: Hairy/ enhancer-of-split related with YRPW motif protein

HHT : Télangiectasie hémorragique héréditaire

HUVEC: Human umbilical vascular endothelial cells

ID: inhibitor of differentiation

IL: Interleukin

IRAK: Interleukin receptor associated kinase

LLC: Lewis Lung carcinoma

LPS: Lipopolysaccharide

MAPK: Mitogen-activated protein kinases

MFI: Mean Fluorescence Intensity

MyD: Myeloid differentiation primary response

NF $\kappa$ B: Nuclear Factor kappa-light chain-enhancer of activated B cells

NRP: Neuropiline

PAF: Platelet activation factor

PAH: Hypertension artérielle pulmonaire

PAMP: Pathogen associated molecular pattern

PDGF: Platelet derived growth factor

PI3-k: Phosphoinositide 3 kinases

PIGF: Placental growth factor

PKC: Protein kinase C

PRR: Pathogen recognition receptors

PSGL: P-selectin glycoprotein ligand

SBE: Smad binding element

SRF: Serum response factor

TCF: Ternary complex factor

TNF- $\alpha$ : Tumor necrosis factor  $\alpha$

TGF- $\beta$ : Transforming growth factor  $\beta$

TLR: Toll like receptor

TRAF: TNF receptor associated factor

VEGF: Vascular endothelial growth factor

VPF: Vascular permeability factor

YAP : Yes associated protein





## Remerciements

J'aimerais remercier tous les membres du centre de recherche de l'hôpital Maison Neuve Rosemont qui m'ont accueilli et ont fait de ma maîtrise une expérience agréable. J'aimerais aussi remercier l'organisme de la bourse MITACS, Ali Belayachi et Bruno Larrivée pour m'avoir subventionné tout au long de ma maîtrise. Ainsi que toutes les personnes avec qui j'ai pu collaborer au cours de ma maîtrise.

J'aimerais remercier les membres de mon laboratoire, Maya, Kevin et Erika, pour m'avoir accueilli dès le premier jour et de m'avoir formé, d'avoir corrigé mes erreurs et d'avoir su répondre à mes très nombreuses questions. Il est certain que sans vous l'aventure aurait été plus corsée et moins drôle. Un grand merci à Claire, qui en plus d'avoir eu la patience de me guider durant ces deux années, d'être devenu une très bonne amie avec qui on aura passé de très bonnes soirées jeux de société, BBQ et camping. Sans vous tous le Canada aurait eu une autre saveur.

Enfin je souhaite tout particulièrement remercier mon directeur de maîtrise, Dr. Bruno Larrivée sans qui rien n'aurait été possible. En me choisissant comme étudiant, j'ai pu m'épanouir dans le domaine de la recherche médicale hors des frontières de mon pays natal. Il a su voir mon potentiel et m'a permis de l'exprimer et d'expérimenter mes idées. Sa disponibilité, son intelligence et son appui ont été indispensables à la réalisation des travaux de ce mémoire ainsi que pour la poursuite de mes projets professionnels.

Merci



# Chapitre 1 – Introduction

## 1.1 Le système circulatoire

Mécanisme à part entière de l'organisme, le système circulatoire est une composante essentielle du corps humain. Il est composé du cœur, du sang ainsi que des vaisseaux sanguins formant le réseau vasculaire. Celui-ci permet au sang de circuler dans tout le corps, et est composé de veines et d'artères qui se ramifient en veinules et artérioles, le tout relié par des capillaires. Il permet de faire le lien entre tous les organes et assure entre autres la bonne diffusion de l'oxygène. Ce réseau est très structuré afin de couvrir le plus efficacement la surface du corps et de ne laisser aucune zone. Mais le travail du système circulatoire ne s'arrête pas à l'acheminement de l'oxygène, il joue également d'autres rôles cruciaux comme l'évacuation des différents déchets de l'organisme, tels que le CO<sub>2</sub> ou l'urée, la transmission des nutriments ainsi que la circulation des cellules immunitaires.

Les vaisseaux sanguins sont composés de plusieurs couches superposées. La plus externe nommée l'adventice est composée de tissus conjonctifs et de fibres élastiques, et a pour rôle d'assurer la stabilité du vaisseau ainsi que d'aider à la fixation de nouveaux vaisseaux aux structures tissulaires. La seconde est la media, constituée de cellules musculaires ou de péricytes respectivement pour les artères-veines ou les capillaires. Enfin la dernière couche est l'intima, et est formée d'une monocouche de cellules endothéliales qui est appelée l'endothélium.

## 1.2 Le développement des vaisseaux sanguins

Il existe deux processus de création de vaisseaux sanguins de novo : la vasculogénèse et l'angiogénèse.

La vasculogénèse consiste en la création de vaisseaux sanguins à partir des précurseurs des cellules endothéliales présents dans le mésoderme. Cette étape de création intervient lors du

développement embryonnaire ainsi que pendant la vascularisation des organes (Azzi and Gavard, 2014). Elle est régie par plusieurs facteurs dont le Vascular endothelial Growth factor (VEGF), le Fibroblast Growth factor (FGF2) et Transforming growth factor  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) (Orkin and Zon, 2008).

L'angiogenèse, second processus de création du réseau vasculaire, intervient à la suite de la vasculogénèse et permet la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux préexistants. Il existe deux mécanismes d'angiogenèse: l'intussusception et le bourgeonnement. Le premier consiste en la division d'un vaisseau en deux nouveaux, et est généralement utilisé lors du remodelage vasculaire pulmonaire, ainsi que lors de la vascularisation tumorale et celle des muscles (Makanya et al., 2009)

L'angiogenèse par bourgeonnement est le mécanisme le mieux caractérisé et repose sur la spécification de cellules endothéliales en cellules de front (tip) ou de soutien (stalk). Les cellules de front vont être capables d'étendre de longs filopodes qui peuvent détecter les facteurs angiogéniques tels que le VEGF, et vont migrer le long des voies chimiotactiques. Les cellules de soutien vont suivre les cellules de pointe afin de créer le corps du vaisseau (Pereira et al., 2021). Ce type d'angiogenèse se déroule en plusieurs phases : l'activation, la migration et la maturation.

### **1.2.1 L'activation**

Les cellules endothéliales sont dans la majorité des cas des cellules quiescentes. Malgré cet état, elles restent très réactives aux stimuli environnementaux et c'est généralement l'équilibre entre les facteurs pro- et anti- angiogéniques qui permet de déterminer l'avenir des cellules endothéliales. La figure 1A montre une cellule, dite de « front », avec un phénotype angiogénique qui possède des propriétés migratoires et prolifératives qui va permettre la création d'un nouveau vaisseau. Les cellules de front vont donc guider le néo-vaisseau vers le signal pro-angiogénique (Figure 1A) et les cellules de soutien vont proliférer en arrière afin de permettre l'allongement du vaisseau (figure 1B).

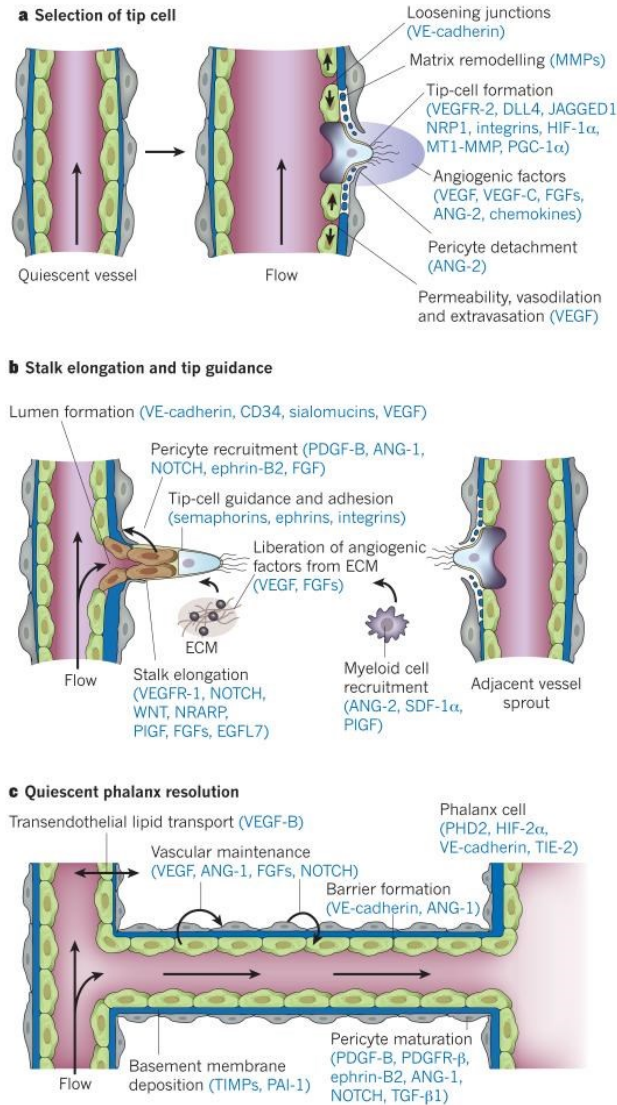


Figure 1. – Schéma représentatif des différentes étapes de l'angiogenèse par bourgeonnement.

A : Sélection de la cellule de front via les facteurs de croissance tels que le VEGF. B : Migration de la cellule de front et prolifération des cellules de soutien. C : Formation et Maturation du nouveau vaisseau. (Figure présenté avec la permission de Carmeliet and Jain, 2011)

Si on s'intéresse au point de vue moléculaire, on observe deux voies majeures impliquées dans ce mécanisme : la protéine VEGF et son récepteur VEGFR2 ainsi que DDL4 et son récepteur Notch 1. La cellule de front va être exposée à des concentrations élevées de VEGF, qui va se fixer sur le récepteur VEGFR2 augmentant ainsi la transcription de la protéine DDL4 (Figure 2). Celle-ci va interagir avec le récepteur Notch1 présent sur les cellules voisines, provoquant une diminution

de l'expression du gène VEGFR2 et une augmentation du VEGFR1 (Harrington et al., 2008). Ce dernier possède une activité de signalisation relativement faible; cependant il permet la séquestration du ligand VEGF ce qui empêche l'activation de VEGFR2 sur les cellules de soutien. L'activation de Notch1 dans les cellules de soutien va augmenter l'expression de Jag1 qui va inhiber les récepteurs Notch situés au niveau des cellules de front (Siemerink et al., 2013).

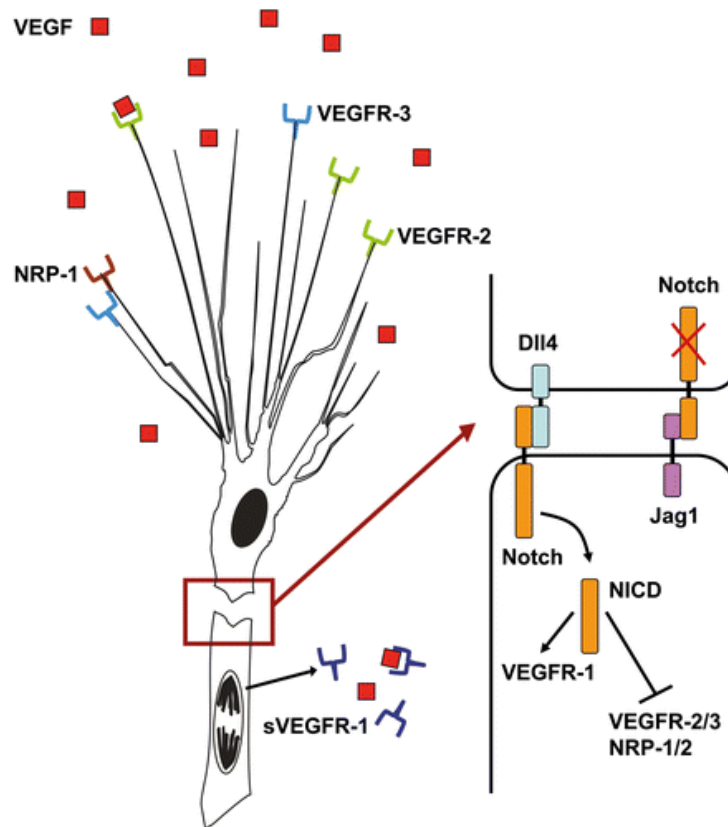


Figure 2. – Schéma des mécanismes moléculaires lors de l'angiogenèse par bourgeonnement.

(Figure présentée avec la permission de Siemerink et al., 2013)

### 1.2.2 La migration

Une fois activée, la cellule de front va développer des filopodes qui vont permettre une migration plus rapide. Étant très dynamiques, ils aident la cellule à migrer plus rapidement vers la source des facteurs pro-angiogéniques; cependant, leur présence n'est pas essentielle pour

l'orientation des cellules de front (Phng et al., 2013). La migration s'accompagne aussi d'un affaiblissement des liaisons entre cellules endothéliales. Cela permet d'augmenter la perméabilité vasculaire ce qui facilite la diffusion des facteurs moléculaires pro-angiogéniques. Du côté des cellules de soutien, une forte prolifération intervient, permettant ainsi l'allongement du néo vaisseau guidé par la cellule de front (Figure 1C).

### **1.2.3 La formation et la maturation**

Lorsque les deux cellules de front se rejoignent, elles vont alors fusionner par anastomose et former un vaisseau connecté. Les connaissances sur la formation exacte du lumen sont encore incertaines; cependant, cela peut être dû à la fusion de grosses vacuoles dans les cellules ainsi que par la pression exercée par le flux sanguins (Iruela-Arispe and Davis, 2009). Une fois la formation complète des vaisseaux, la phase de maturation a lieu. Celle-ci permet le renforcement des jonctions entre les cellules endothéliales par le biais moléculaire de Angiopoïétine 1 et son récepteur Tie 2. L'action de Ang1 renforce les jonctions cellulaires en induisant leur quiescence. La maturation est aussi caractérisée par le recrutement des péricytes qui est réalisé par le TGF- $\beta$ 1 ainsi que le platelet derived growth factor (PDGF-BB) (Treppe and Gavard, 2015). Une autre voie entrant en jeu dans ce mécanisme est celle du récepteur activin like kinase receptor 1 (ALK1) et de ses ligands bone morphogenetic protein 9-10 (Bmp9 et 10). Cette voie permet d'induire la signalisation menant à la quiescence, la différenciation artério-veineuse ainsi que le recrutement des cellules péri vasculaires (Larrivée et al., 2012).

Il est possible qu'à n'importe quelle étape du processus, un changement du microenvironnement stoppe l'angiogenèse voire l'inverse. Si c'est le cas, les bourgeons vasculaires sont rétractés ou éliminés par apoptose. Cela permet une grande flexibilité du processus d'angiogenèse mais nécessite un contrôle très précis à chaque étape.

## **1.3 L'angiogenèse tumorale**

Comme précisé précédemment, les facteurs anti- et pro-angiogénique étant en équilibre, le mécanisme d'angiogenèse est très sensible. Dans des conditions normales, les facteurs et inhibiteurs vont être sollicités pour la création de nouveaux vaisseaux et inversement pour limiter une hyper vascularisation. Cependant certaines maladies comme le cancer vont causer un déséquilibre qui va conduire à une angiogenèse excessive (McDonald and Baluk, 2005)(Figure 3).

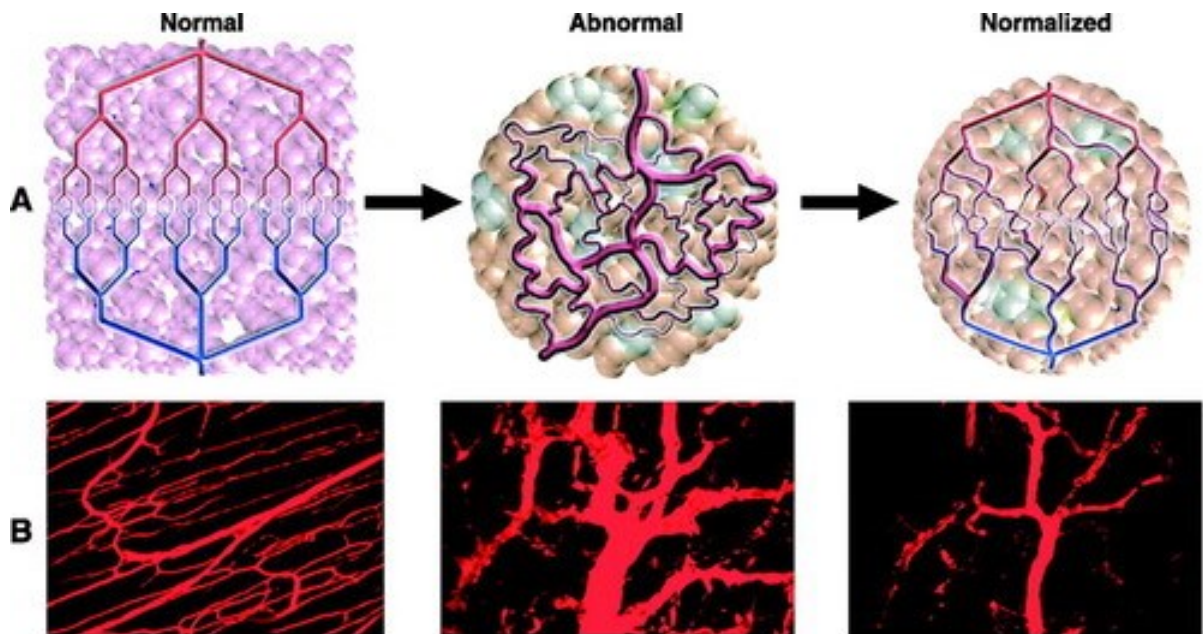


Figure 3. – Schéma représentant les différents réseaux vasculaires dans des conditions normales, tumorales et tumeur normalisée. B : Image au microscope de la différence de vascularisation entre un tissu sain (gauche) et une tumeur (droite) (Figure présentée avec la permission de Goel et al., 2011).

La croissance des tumeurs est intimement liée à la présence de vaisseaux sanguins, ayant besoin de nutriments et d'oxygène pour se développer. Les cellules tumorales possèdent une multitude de mécanismes pour former de nouveaux vaisseaux.

L'angiogenèse tumorale (Figure 4A) suit les mêmes étapes que durant l'angiogenèse physiologique, la différence majeure étant que les cellules endothéliales ne retournent pas à leur état de quiescence, entraînant une croissance constante des réseaux vasculaires, (Detmar, 2000)



ainsi qu'une augmentation du nombre de cellules de front sélectionnées possédant plus de filopodes qu'à la normale. Ce mécanisme dépend particulièrement de la concentration de VEGF dans le microenvironnement tumoral.

La vasculogénèse (Figure 4B), procédé rare mais présent en soutien à l'angiogénèse, permet aux tumeurs de recruter des cellules endothéliales précurseurs résidant dans la moelle osseuse ou les parois vasculaires. Cela permet de créer un réseau vasculaire de novo, ce mécanisme étant mis en évidence dans le cadre de traitements anti-angiogéniques, où l'on constate qu'il y a toujours une création de vaisseaux sanguins. (Brown, 2014)

L'intussusception (Figure 4C) est aussi utilisée pour irriguer la tumeur grâce à la séparation d'un vaisseau en deux. Ce mécanisme est très peu efficace mais contribue à la ramification des vaisseaux et à leur structure chaotique.

Dans certains cas il est possible que la tumeur coopte les vaisseaux sanguins pour sa propre utilisation. (Figure 4D)

Le mimétisme vasculaire (Figure 4E), surtout présent dans les tumeurs agressives telles que le glioblastome, mélanomes, cancer du sein et des ovaires, est un processus qui permet aux tumeurs d'augmenter la masse vasculaire en intégrant directement dans les vaisseaux des cellules tumorales. Ce procédé permet de créer des matrices extracellulaires contenant le plasma ainsi que les globules rouges, aidant la tumeur à grandir plus rapidement en comblant directement ses besoins (Wechman et al., 2020)

Enfin il y a la trans-différentiation (Figure 4F) des cellules tumorales possédant un caractère de cellules souches, qui peuvent adopter un phénotype de cellules endothéliales tumorales qui vont participer à la vascularisation de la tumeur indépendamment de l'angiogénèse. Ce phénomène est décrit dans les glioblastomes ainsi que dans les cancers ovariens (Ricci-Vitiani et al., 2010).

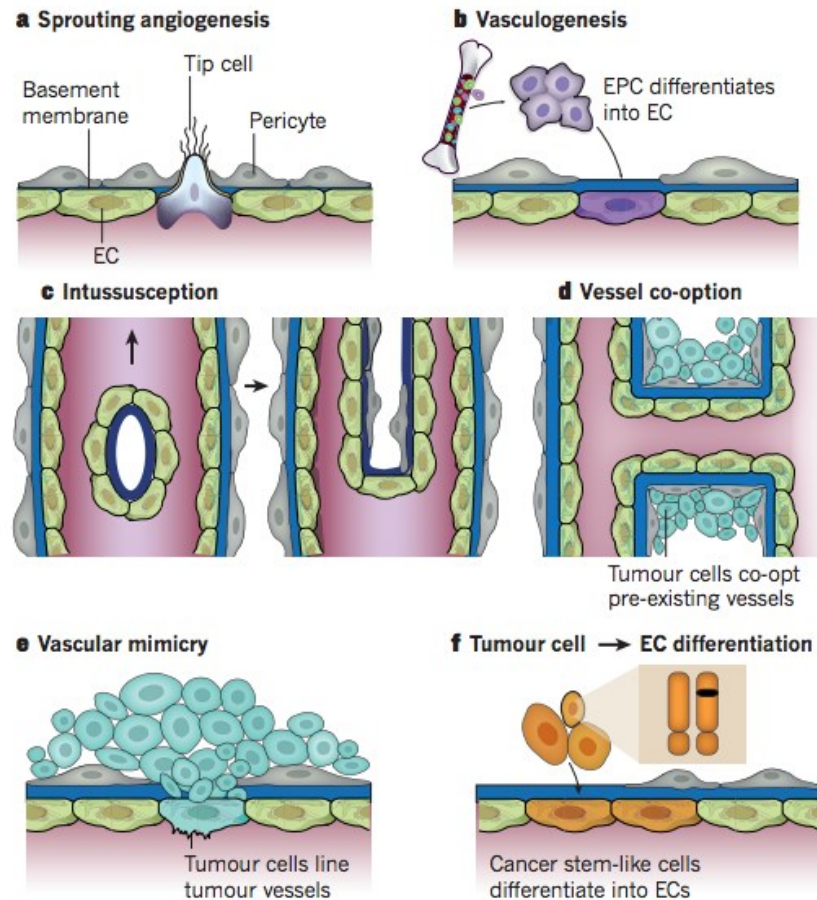


Figure 4. – Schéma des différents mécanismes de formation de vaisseaux sanguins dans les tumeurs. (Figure présenté avec la permission de Carmeliet and Jain, 2011)

## 1.4 Caractéristique des tumeurs

Comme décrit précédemment, il y a une utilisation à outrance et de façon non coordonnée des différents mécanismes d'angiogenèse dans les tumeurs. Cela entraîne la création d'une structure chaotique du réseau vasculaire mais aussi un grand nombre de problèmes tels qu'une grande perméabilité des vaisseaux, un faible recouvrement péricytaire, un flux de sang énorme et de mauvaises jonctions VE- cadhérin (Aragon-Sanabria et al., 2017) qui vont engendrer des

œdèmes vasculaires. Malgré tous ces problèmes, l'angiogenèse tumorale est primordiale pour la survie de la tumeur, chaque néo-vaisseaux tumoraux participe à la création d'un microenvironnement unique d'un point de vue métabolique comme immunitaire. La tumeur très demandeuse d'oxygène et de nutriments ne peut se contenter d'utiliser la diffusion pour s'approvisionner. Ce besoin va donc être comblé par cette création excessive de vaisseaux. En grandissant, les cellules tumorales vont devenir de plus en plus agressives à cause des conditions de l'environnement tumoral de plus en plus rudes. Une sélection va être faite des cellules les plus pro-angiogéniques, ce qui va permettre la dissémination métastatique, l'acquisition de résistance à la radio/ chimio thérapie (Carmeliet and Jain, 2011)

## 1.5 Thérapie anti-angiogénique

Aux vues des caractéristiques acquises par les tumeurs, les recherches anticancéreuses se sont orientées sur les traitements anti-angiogéniques à base de composés anti-VEGF. Le but de ces traitements est de stopper l'angiogenèse tumorale afin de réduire l'apport d'oxygène et de nutriments ainsi que de bloquer les voies de sortie métastatique. L'utilisation de ces inhibiteurs est approuvée dans plusieurs types de cancer tels que les cancers métastatiques colorectaux, les cancers du sein, les carcinomes ainsi que les cancers rénaux. Cependant leur utilisation est débattue, malgré leur efficacité, car plusieurs études rapportent une amplification de l'agressivité ainsi que la dissémination métastatique (Pàez-Ribes et al., 2009). De plus, une résistance aux inhibiteurs du VEGF est constatée, ce qui amène à penser d'une part que d'autres molécules pro-angiogéniques entrent en jeu dans le développement tumoral, et d'autre part que l'efficacité de ces traitements se concentre sur l'interruption de l'angiogenèse par « sprouting » (Figure 4A). Cependant, comme décrit précédemment, les tumeurs utilisent bien plus de méthodes de vascularisation (Carmeliet and Jain, 2011). Les stratégies de recherche à long terme se concentrent sur de nouvelles cibles thérapeutiques pouvant être utilisées pour normaliser le réseau vasculaire des tumeurs. Cela permettrait d'améliorer la perfusion du tissu tumoral en gardant une bonne irrigation, diminuant ainsi les œdèmes et la pression interstitielle; le tout,

facilitant la pénétration des médicaments dans les tumeurs et augmentant l'efficacité des immunothérapies (Bertolini et al., 2011).

## **1.6 Les facteurs moléculaires de l'angiogenèse**

### **1.6.1 La famille du VEGF**

Découvert en 1983, le vascular endothelial growth factor (VEGF) fut identifié comme facteur de perméabilité vasculaire (Senger et al., 1983) et nommé VPF (vascular permeability factor). C'est seulement en 1989 qu'il fut décrit comme facteur de croissance et renommé VEGF (Ferrara and Henzel, 1989). La famille du VEGF est composée de plusieurs membres interagissant dans plusieurs mécanismes comme l'angiogenèse et la prolifération (VEGF-A et B) ainsi que dans le développement des vaisseaux lymphatiques (VEGF-C, VEGF-D et placental growth factor (PlGF)) (Apte et al., 2019). Trois récepteurs ont été identifiés, VEGFR1 aussi appelé Fms like tyrosine kinase (Flt1), VEGFR2 alias Fetal liver kinase (Flk-1) et VEGFR3 (Flt4). Ils possèdent chacun 7 domaines d'immunoglobuline sur leur couche extracellulaire et une région transmembranaire (Hoeben et al., 2004). Enfin, il existe aussi des récepteurs préalablement décrits dans le système nerveux nommés neuropilines (NRP1 et NRP2) qui interagissent avec le VEGF et qui peuvent participer à la transmission du signal dans les cellules endothéliales (Neufeld et al., 2002)

Chaque VEGF possède une spécificité avec un ou plusieurs récepteurs comme on peut l'observer sur la figure 5. Le VEGF-A interagit avec les récepteurs 1 et 2, le VEGF-B et le PlGF sont, eux, spécifiques au récepteur 1 et il y a le VEGF-C et le VEGF-D qui peuvent se lier aux récepteurs 2 et 3. (Ruiz de Almodovar et al., 2009)

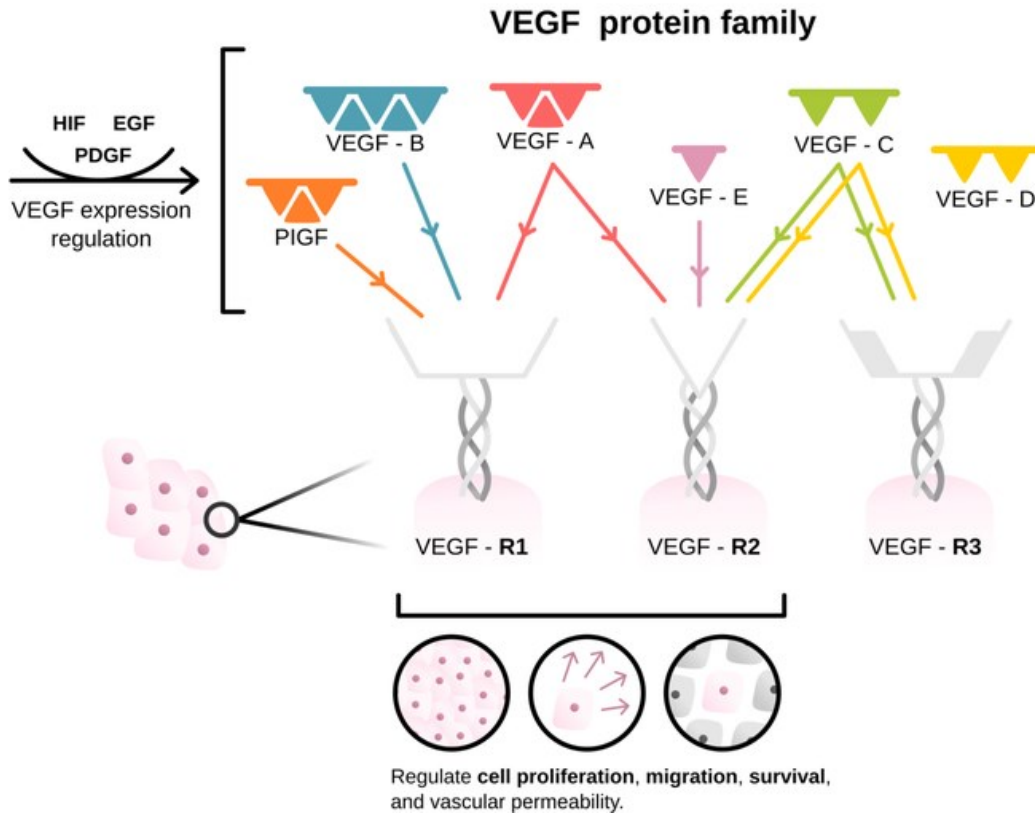


Figure 5. – Schéma des différentes liaisons entre les VEGF et leurs récepteurs. (Figure présentée avec la permission d’Apte et al., 2019)

### 1.6.2 La famille BMP

Les BMP sont un groupe de facteurs de croissance, faisant partie de la famille des TGF- $\beta$ . (Wozney et al., 1988) Découverts à l’origine pour leur capacité à induire la formation d’os et de cartilages, ils sont maintenant considérés comme l’un des groupes de signaux morphogénétiques principaux pour l’architecture tissulaire dans tout le corps. L’importance de la signalisation BMP dans la physiologie est mis en lumière par la multitude de dérégulations dans les processus pathologiques comme le cancer. D’ailleurs son absence de régulation est un des facteurs de progression du cancer du côlon (Kodach et al., 2008).

Dans cette famille, il existe plusieurs sous-groupes comprenant BMP 2/4, BMP 5/6/7/8, GDF 5/6/7 (Growth differentiation factor) et enfin BMP 9/10. C'est sur ce dernier que je vais centrer mes recherches dans ce mémoire. (Kawabata et al., 1998)

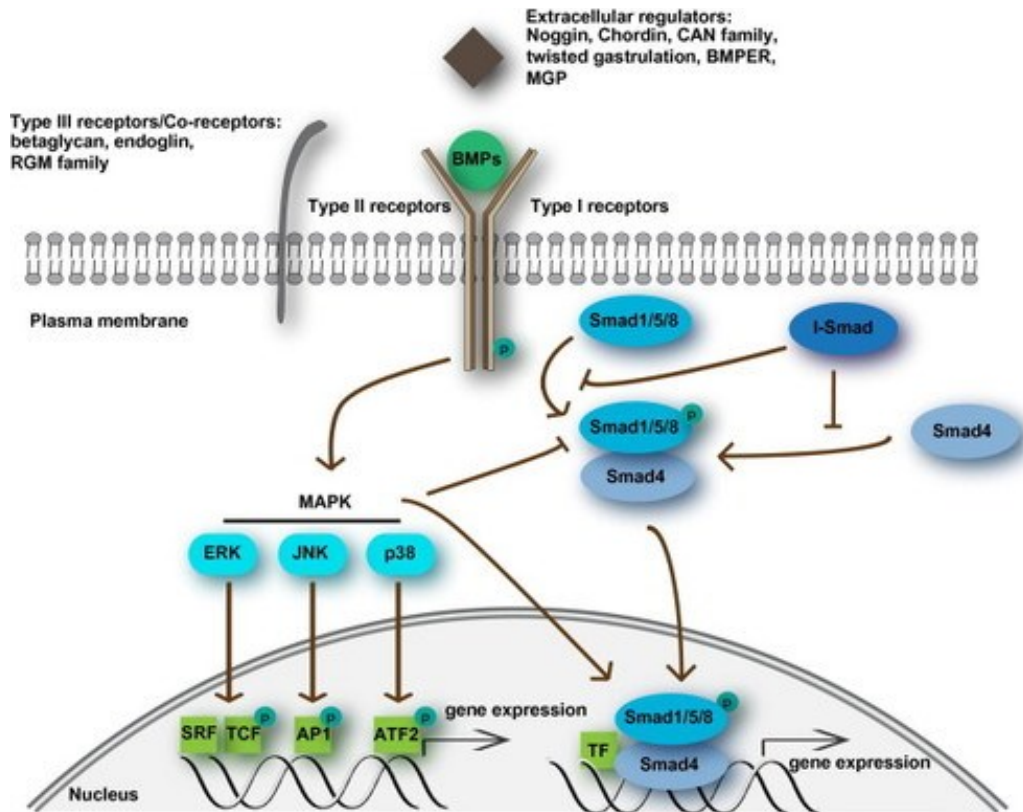


Figure 6. – Schéma de la signalisation des BMPs de la paroi cellulaire jusqu'au noyau. (Figure présentée avec la permission de Cai et al., 2012)

Les BMPs vont venir se lier à des récepteurs Sérine/thréonine kinase de type I et II sur la surface membranaire ((Miyazono et al., 2000); Balemans and Van Hul, 2002). La formation de ce complexe va être régulé par des récepteurs de types III ainsi que des régulateurs extracellulaires. Après avoir été activé par un récepteur de type II, le récepteur de type I va venir phosphoryler Smad 1/5/8 (aussi appelé R-Smad). Ces dernières vont s'associer avec Smad 4 pour former un complexe qui va circuler jusque dans le noyau afin de réguler l'expression de gènes cibles. Dans le cytoplasme, il existe aussi des inhibiteurs de R-Smad connus sous le nom de I-Smad (Smad 6/7).

En plus du chemin métabolique des Smad, le signal fourni par les récepteurs de BMP vont venir activer les mitogen-activated protein kinases (MAPKs). Cela a pour effet de phosphoryler des facteurs de transcription tels que SRF (serum response factor), TCF (ternary complex factor), AP1 (activator protein) et ATF2 (Activating transcription factor). Mais aussi de phosphoryler les R-Smad ou leurs molécules en aval afin de réguler ce chemin métabolique (Figure 6).

### 1.6.3 Les récepteurs aux BMPs

Comme les autres membres de la famille de TGF- $\beta$ , les BMPs se fixent sur deux catégories de récepteurs serine threonine kinase, les types I et les types II. Ces récepteurs possèdent une structure similaire composée d'un seul domaine kinase transmembranaire et un intracellulaire. Les BMPs ont plus d'affinités avec les récepteurs de types I et cette compatibilité peut être augmenté avec la création de complexes hétérotétramériques (Rosenzweig et al., 1995). Il existe 7 récepteurs de type I contre 5 pour le type II ; les 7 récepteurs du premier type sont les ALK 1-7 qui vont venir recruter et phosphoryler les facteurs Smad ((Heldin et al., 1997);(Derynck and Zhang, 2003)). Les récepteurs de type II comprennent : ActRIIA, ActRIIB (Activin Receptor), BMPRII (BMP Receptor), AMHRII et TGF- $\beta$ RII. À la différence des premiers, ils sont activés de manière constitutive et vont, en réponse à un ligand, former un complexe avec les récepteurs de type I (Lowery and Rosen, 2018).

Il existe d'autres protéines qui interagissent également dans ce chemin métabolique. Elles sont catégorisées comme corécepteurs sous le nom d'Endoglin et de Bétaglycan. Ces derniers jouent un rôle important dans le développement vasculaire ainsi que dans les maladies. Le Bétaglycan est capable de lier les trois isoformes de TGF- $\beta$ 1, et régule le développement et la différenciation des cellules cancéreuses. Il module la formation des complexes des récepteurs de types I et II ainsi que la signalisation de BMP 2 (Lewis et al., 2000). L'Endoglin est capable de lier à TGF- $\beta$ 1, TGF3 ainsi que BMP9, et est capable d'inhiber la migration et la prolifération des cellules endothéliales (ten Dijke et al., 2008).

#### **1.6.4 La voie Smad et les autres voies**

Après la formation d'un complexe hétéromérique induit par la liaison d'un ligand BMP, le récepteur de type II va phosphoryler son récepteur de type I associé. Cette réaction va initier la signalisation intracellulaire par l'activation des protéines Smad. Les Smads se divisent en 3 groupes : les récepteurs de Smad (R-Smad ; Smad 1/2/3/5/8), les inhibiteurs de Smad (I-Smad ; Smad 6/7) et les médiateurs communs Smad (co-Smad ; Smad 4) (Heldin et al., 1997). Une fois que le récepteur de type I active R-Smad, celui-ci va former un complexe avec Smad 4 qui va venir directement dans le noyau pour réguler le gène d'expression cible en s'accrochant sur les SBE (Smad binding element). Les I-smads se situent dans le noyau au niveau basal ; cependant lorsqu'il y a une stimulation au TGF- $\beta$  ou Bmp, les Smad 6 et 7 vont se rendre dans le cytoplasme afin de procéder à l'ubiquitinylation des récepteurs actifs ou dans la séquestration des Smad 4 (Murakami et al., 2003). Smad 7 est induit par TGF- $\beta$  tandis que Smad 6 est induit par les Bmps. Les I-Smad jouent un rôle important dans la régulation et l'arrêt de la signalisation Smad.

En plus de la voie Smad, il a été démontré que les BMPs activent d'autres voies de signalisation comme les MAP kinase, PI3 kinase (Phosphoinositide 3 kinases), PKC (Protein kinase C) ainsi que Rho-GTPases (Zhang, 2009). Ces voies jouent aussi un rôle crucial dans les effets cellulaires des BMPs.

#### **1.6.5 Rôle de la signalisation BMP dans l'organisme**

Comme décrit précédemment, la signalisation des BMPs joue un rôle crucial dans l'angiogenèse. Dans le cadre de Bmp 2, 4, 6 et 7, une augmentation de l'angiogenèse, de la prolifération et de la migration des cellules endothéliales est observée (Pardali and ten Dijke, 2012). Cependant, le Bmp9 joue un rôle contraire puisque qu'il inhibe la prolifération, la migration ainsi que l'angiogenèse induite par VEGF (Viallard et al., 2020) ; Ntumba et al., 2016). C'est pour ce rôle que des recherches sur la normalisation vasculaire se portent sur cette protéine. Grâce à son inhibition de l'angiogenèse, dans le cadre de certains cancers, le BMP9 pourrait aider à une



restructuration de la tumeur pour améliorer les traitements immunothérapeutiques (Viallard and Larrivée, 2017). D'autres facteurs comme Notch peuvent impacter directement la signalisation BMP, et une diminution de Smad 1/5 dans l'embryon réduit l'expression de Notch, Hes1 et Hey1 ce qui provoque une augmentation des cellules de pointe (Moya et al., 2012). Il est aussi démontré que les Smads associés au récepteur ALK1 collaborent avec Notch pour induire Hey1 et Hey2 ce qui limite la réponse des cellules endothéliales au VEGF (Larrivée et al., 2012).

### **1.6.6 La signalisation BMP dans les maladies vasculaires**

Des études génétiques ont montré que des dysfonctionnements de la signalisation des BMPs ou de gènes qui modulent leur activité entraînent des maladies vasculaires. Il a aussi été mis en lumière que dans la perturbation de l'homéostasie vasculaire due à une lésion vasculaire, l'athérosclérose ou l'hypertension, l'expression des BMP est perturbée (Lowery and deCaestecker, 2010). Plusieurs maladies sont directement liées à ce dysfonctionnement.

L'hypertension artérielle pulmonaire (PAH) est caractérisée par une pression trop élevée dans les artères pulmonaires, ce qui peut provoquer une crise cardiaque. Il existe deux formes de cette maladie, la sporadique et l'héréditaire. Dans 70 % des cas de cette première forme et dans 20% des cas de l'autre, c'est une mutation du récepteur BMP2 qui est en cause. Cette mutation entraîne une baisse de la signalisation BMP 2/4 et une augmentation de celle des BMP 6/7. Des mutations de Smad 8 ont aussi été observées et cela provoque une augmentation de l'inflammation vasculaire et un remodelage vasculaire anormal (Huang et al., 2009).

La Télangiectasie hémorragique héréditaire (HHT), causée par la mutation du récepteur ALK1 ou Endoglin, est une maladie autosomique dominante qui provoque des télangiectasies dans la peau et les muqueuses, des épitaxies ainsi que des malformations artério-veineuses dans les poumons, le foie et le cerveau (McDonald et al., 2011). Dans les modèles murins, la perte du récepteur ALK1 chez les adultes entraîne la mort des animaux au bout d'une semaine, ainsi que

la mort embryonnaire à E11, due à un défaut dans le remodelage du plexus capillaire primaire (Urness et al., 2000).

L'athérosclérose est une maladie chronique qui se caractérise par une inflammation chronique et une accumulation de lésions athéromateuses dans la couche interne des artères. Les BMP 2/4 joue un rôle dans cette maladie en favorisant les effets pro-inflammatoires dans les cellules endothéliales (Nakagawa et al., 2010).

Dans l'angiogenèse tumorale, les BMP 2/4 favorisent la prolifération ainsi que l'angiogenèse. On retrouve dans des cancers du poumon des quantités anormalement élevées de BMP2, ce qui augmente grandement la taille et le nombre de vaisseaux dans la tumeur (Langenfeld and Langenfeld, 2004).

### **1.6.7 La signalisation ALK1**

Le récepteur ALK1 possède deux ligands qui sont les BMP9/10 qui, lorsqu'ils forment un complexe, vont induire la phosphorylation des Smad 1/5/8 (Roman and Hinck, 2017). Il existe aussi deux autres molécules situées sur les cellules endothéliales, qui participent à la formation récepteurs ligands, qui sont l'Endoglin et la VE-cadhérine (Rudini et al., 2008)

Les gènes activés par ce complexe ont été identifiés par microarray en comparant des conditions de ALK1-ko par rapport à des contrôles. Les premières cibles identifiées sont ID (inhibitor of differentiation) 1/2/3 (Lux et al., 2006). Ces gènes induisent l'expression des Smad 6 et 7 qui vont eux même coder pour les Smads inhibiteurs.

ALK1 peut aussi induire l'expression des gènes CXCR4 et DLL4, qui sont des facteurs pro-migratoires pour les cellules de front. Mais ce ne sont pas les seuls gènes en lien avec les cellules de pointe à être affectés par ALK1 puisque les gènes Apelin et Unc5B sont aussi tous les deux affectés et jouent un rôle dans la guidance des cellules de front (Roman and Hinck, 2017).

Enfin ALK1 peut aussi réguler l'expression de gènes impliqués dans la morphogénèse vasculaire comme Ang2 et EphrinB2 qui codent respectivement pour un facteur pro-angiogénique et un marqueur artériel jouant un rôle dans des anastomoses artério-veineuse (Ruiz et al., 2016); (Kim et al., 2012).

### **1.6.8 Effet du BMP9**

Plusieurs études, sur des expériences *in vivo*, ont rapporté qu'une surexpression de BMP9 inhibe la migration et la croissance des cellules endothéliales mais empêche également la formation de nouveaux vaisseaux (David et al., 2007). On remarque aussi un retard de croissance et une meilleure architecture vasculaire dans les tumeurs sur-exprimant BMP9 (Viallard et al., 2020). Enfin des études rapportent l'effet de BMP9 dans la réparation des lésions osseuses (Wang et al., 2017a) et l'ossification des muscles après une blessure (Leblanc et al., 2011), ainsi qu'un effet anti angiogénique dans la rétine de la souris (Larrivée et al, 2012).

### **1.6.9 Normalisation vasculaire**

Comme dit précédemment la structure vasculaire tumorale est chaotique par sa multitude de vaisseaux sanguins. Le concept de normalisation vasculaire se base sur l'idée de revenir à des conditions « normales » afin d'avoir une meilleure circulation de l'oxygène et des médicaments dans toute la tumeur. L'utilisation de la normalisation est bien plus efficace que l'utilisation renforcée de médicaments et d'oxygène car ces derniers, dans des conditions tumorales, vont rester bloqués dans les zones externes de la tumeur et alimenter des cellules qui ont déjà une dose suffisante d'oxygène et de médicaments (Jain, 2005). Pour réussir cette stratégie de guérison, le but va être de revenir à un équilibre entre les facteurs pros- et anti-angiogéniques. Il faut cela pour ça inhiber la production de facteurs pro-angiogéniques comme le VEGF cependant une régression vasculaire excessive va agir contre le principe de base en réduisant l'alimentation

en oxygène et de médicaments dans toute la tumeur. Il existe quelques thérapies cependant, elles vont affecter tout l'organisme et pas seulement la tumeur c'est pour cela que les thérapies anti-angiogéniques comme le Bevacizumab sont associées à des risques plus élevés de thromboembolies artérielles (Ratner, 2004). Cependant, malgré ces risques, les thérapies anti-angiogéniques ont prouvé leur efficacité dans plusieurs types de cancer et continuent de s'améliorer d'année en année avec la création de multithérapies pour les tumeurs résistantes aux monothérapies. Cela offre aussi une opportunité future dans la mise en place de traitements à partir de BMP9 ou d'autres molécules anti-angiogéniques.

## **1.7 L'inflammation**

L'inflammation est un mécanisme présent chez la majorité des espèces vivantes pluricellulaires et elle est caractérisée par deux types de réponses. La réponse innée est la première ligne de défense de l'hôte face à un pathogène tandis que la réponse adaptative est impliquée dans la réponse tardive à l'infection et permet l'établissement de la mémoire immunitaire. Ces mécanismes de défense jouent un rôle clé dans la survie de l'hôte et le moindre dysfonctionnement peut causer de graves conséquences. Une baisse de la réponse va favoriser les infections alors qu'une inflammation incontrôlable va créer des maladies auto-immunes.

### **1.7.1 La réponse innée**

Présente chez les plantes, invertébrés et vertébrés, la réponse immunitaire innée se base sur la détection de molécules étrangères à l'organisme aussi appelées pathogen associated molecular patterns (PAMPs). L'organisme dispose de récepteurs spécifiques, nommés pathogen recognition receptors (PRR), qui permettent de reconnaître et de déclencher la réponse immunitaire de l'hôte (Akira S et al, 2006). La fixation d'un PAMP sur un PRR va entraîner

l'élimination du pathogène en plusieurs étapes qui sont la destruction de celui-ci par phagocytose grâce au macrophage et cellules dendritiques, la libération de cytokines pro-inflammatoires et le remodelage vasculaire pour aider au recrutement des cellules immunitaires. Il existe plusieurs types de PRR, tels les récepteurs cytoplasmiques et les récepteurs membranaires TLR (Toll like receptor).

### **1.7.2 Les récepteurs de type Toll et leur signalisation**

Il existe 10 types de TLR chez l'humain et 12 chez la souris, certains localisés sur la membrane pour la détection des composants microbiens tandis que d'autres sont situés sur les endosomes pour détecter les acides nucléiques. Les TLRs ne possèdent pas une grande variation génétique d'une espèce à une autre, ce qui offre l'avantage de transposer facilement les recherches sur la drosophile et la souris à l'Homme. Chaque TLR possède une spécificité dans la reconnaissance des PAMPs : le TLR4 va reconnaître le lipopolysaccharide (LPS) (Poltorak et al., 1998), le TLR5 reconnaît la flagellin et les TLR1/2 et 6 reconnaissent les lipoprotéines bactériennes. Sur les endosomes, le TLR3 s'associe avec l'ADN double brin, les TLR7/8 reconnaissent les ARN simple brin, le TLR9 reconnaît l'ADN simple brin non méthylé et le TLR13 reconnaît l'ARN ribosomal bactérien (Figure 7).

Les TLRs sont exprimés par une multitude de cellules immunitaires, comme les lymphocytes B et T, les macrophages, les cellules dendritiques et sur certaines cellules non immunitaires comme les fibroblastes et les cellules épithéliales (Delneste et al., 2007)

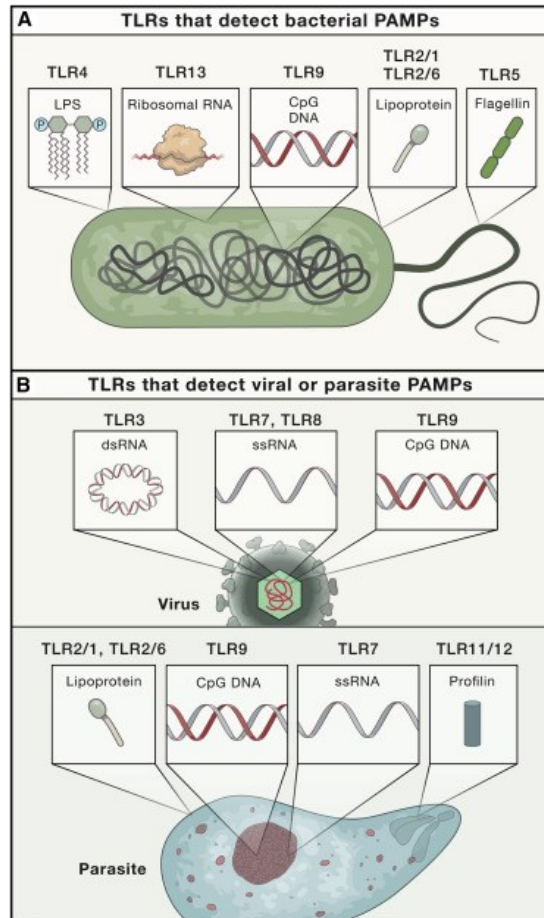


Figure 7. – Différents membres des TLRs avec les PAMPs associés basé sur un modèle murin (Figure présentée avec la permission de Fitzgerald and Kagan, 2020)

La signalisation de tous les TLRs, hormis TLR3, passe par la protéine MyD88. Le recrutement de cette protéine est fait par un agoniste du récepteur TLR, cela permet l'activation des kinases IRAK-1/4 qui vont elles-mêmes activer TRAF6. Cette signalisation aura pour finalité de recruter le facteur de transcription NFκB (Figure 8) qui joue un rôle central dans l'expression des gènes pro-inflammatoires (Akira and Takeda, 2004).

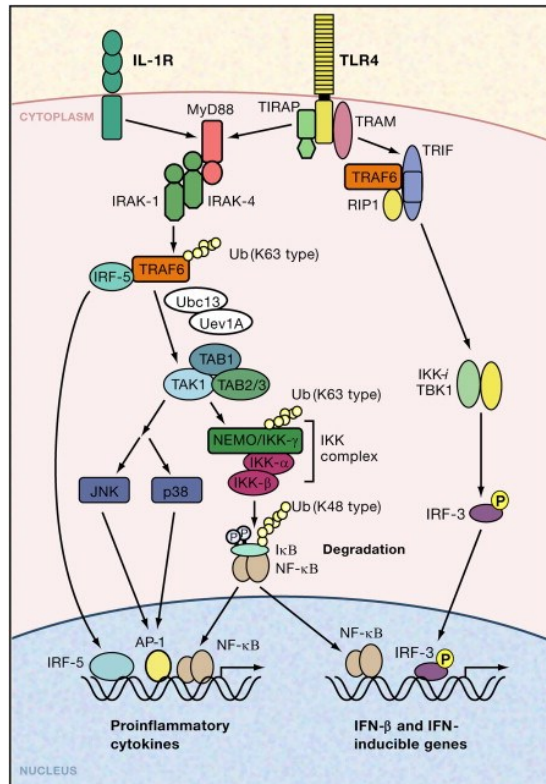


Figure 8. – Schéma de la signalisation de TLR4 (Figure présentée avec la permission de (Akira et al., 2006)

### 1.7.3 La réponse immunitaire adaptative

La réponse immunitaire innée, bien que très efficace, est confrontée à de nombreux pathogènes différents et en très grand nombre. Elle a la capacité de gérer chaque intrusion mais elle ne crée pas de mémoire immunitaire. La réponse immunitaire adaptative a pour rôle de reconnaître chaque pathogène déjà rencontré dans l'organisme. L'établissement de la mémoire immunitaire est très important car elle permet de donner une réponse spécifique et mesurée à chaque intrusion, évitant les surinfections et offre une protection accrue. Ce mécanisme passe par l'activation des lymphocytes B et T par les molécules agonistes des récepteurs TLR 2/5/8 (Komai-Koma et al., 2004) ; (Caron et al., 2005)). Cela permet aux lymphocytes B de donner et de maintenir une réponse d'anticorps spécifique d'antigènes et aux lymphocytes T

d'augmenter leur prolifération et leur production de cytokines pour offrir une meilleure protection immunitaire (Delneste et al., 2007).

#### **1.7.4 Le recrutement des leucocytes et les protéines d'adhésion**

Une fois le mécanisme d'inflammation lancé, l'organisme doit procéder au recrutement des leucocytes afin qu'ils se rendent dans la zone inflammée. Les leucocytes circulent dans les vaisseaux sanguins et doivent entamer un processus nommé diapédèse afin de transmigration au travers de la barrière endothéliale. L'étape principale est la mise en place de liaisons entre les leucocytes et les cellules endothéliales via les protéines d'adhésion qui sont les sélectines (situées sur les CE et les leucocytes) et les intégrines (Seulement sur les leucocytes) (Ley et al., 2007). La première étape est l'activation des cellules endothéliales afin qu'elles expriment à leur surface les protéines d'adhésion. Il existe deux processus : l'un rapide (en quelques minutes) qui passe par les histamines et les PAF, et un autre plus lent (plusieurs heures) qui passe par les cytokines tels qu'IL-1 $\beta$  ou le facteur de nécrose TNF- $\alpha$ . Une fois exprimées, les sélectines endothéliales (E et P selectines) vont capturer les leucocytes via leurs intégrines tels que L-selectine ou PSGL-1 (P-selectin glycoprotein ligand 1) (Zarbock et al., 2011). Cette première attache va faire entrer les leucocytes en phase de roulement, et va permettre d'augmenter les interactions entre les leucocytes et les protéines d'adhésion des cellules endothéliales. Ce sont ces protéines qui vont provoquer l'arrêt complet des leucocytes sur l'endothélium. En plus des sélectines, les protéines I-CAM et V-CAM interviennent dans le processus de ralentissement et d'arrêt des cellules immunitaires (Leick et al., 2014). Une fois arrêtés, les leucocytes changent de forme afin de passer au travers de la barrière endothéliale et utilisent leurs intégrines pour « ramper » au niveau des jonctions paracellulaires (Nourshargh and Alon, 2014) (Figure 9).



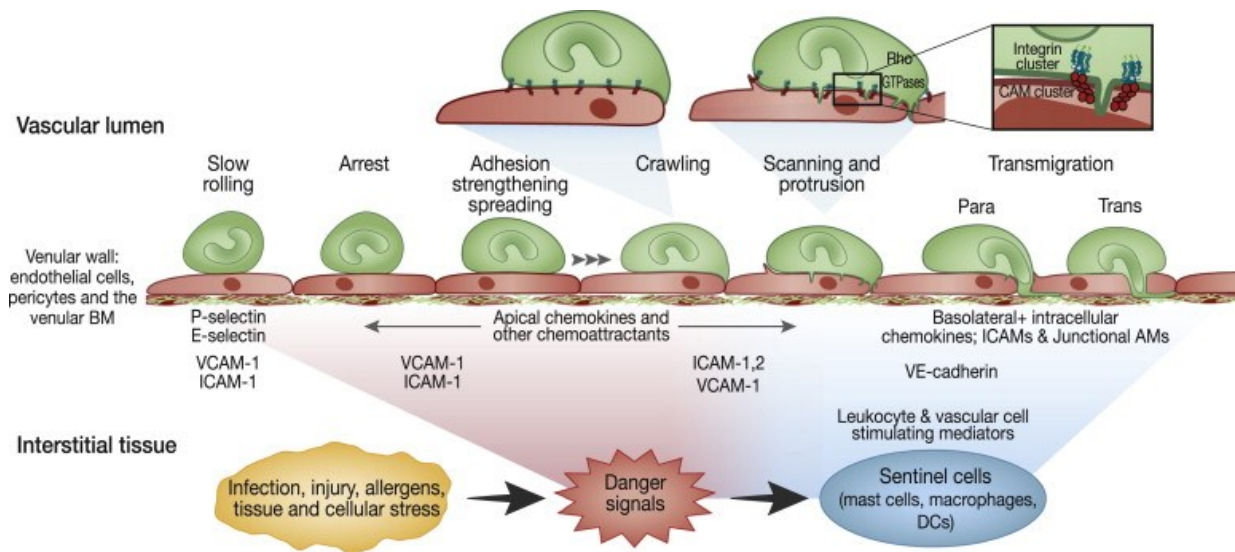


Figure 9. – Schéma représentatif de la diapédèse des leucocytes sur l'endothélium. (Figure présentée avec la permission de (Nourshargh and Alon, 2014))

### 1.7.5 Inflammation dans le cancer

Les tumeurs comme bien d'autres pathologies telles que l'obésité, les maladies auto-immunes ou autres pathogènes provoquent une inflammation accrue. Cet effet peut être bénéfique et avoir des propriétés anti-tumorales si la réponse est contrôlée et bien dosée (Mantovani et al., 2008). Le problème arrive lorsque l'inflammation devient chronique, ce qui va favoriser la progression tumorale (Hanahan and Weinberg, 2011). Cette propriété pro-tumorale se manifeste par une instabilité génétique, une augmentation de l'angiogenèse, une altération épigénétique ou une augmentation de la prolifération. Ces mécanismes passent par plusieurs facteurs comme les oncogènes, le NFκB (Karin and Greten, 2005) ou les cytokines et chimiokines.

Le microenvironnement tumoral joue aussi un rôle important dans l'efficacité de l'inflammation dans les tumeurs. L'hypoperfusion réduit l'acheminement et l'infiltration des cellules immunitaires dans les tumeurs. L'hypoxie et l'acidité réduisent le potentiel de destruction et la fonction des lymphocytes T et des autres cellules immunitaires (Mpekris et al., 2020).

## 1.9 Hypothèse de travail

Des résultats découverts dans notre laboratoire rapportent une plus forte population de cellules immunitaires dans des tumeurs surexprimant le BMP9 (Figure 10), ainsi qu'une meilleure architecture vasculaire dans ces tumeurs. Cela nous amène à penser que la signalisation ALK1/BMP9 joue un rôle important dans l'inflammation ainsi que dans l'infiltration leucocytaire. Notre hypothèse de travail est que l'expression du récepteur ALK1 peut favoriser l'adhésion leucocytaire sur l'endothélium, ce qui facilite l'infiltration des cellules leucocytaires dans les tissus. Cette théorie nous emmène vers des questions secondaires qui sont : Quels mécanismes la signalisation ALK1/BMP9 utilise pour augmenter la réponse immunitaire ? Si c'est directement sur la signalisation de l'inflammation, par quel gène cela passe ? Si c'est indirectement, est-ce par la normalisation vasculaire tumorale qu'intervient cette différence ?

Pour répondre à ces questions, nous allons utiliser des modèles in vitro et in vivo, sur lesquels nous allons bloquer l'expression du récepteur ALK1 dans les cellules endothéliales et observer les conséquences sur le roulement et l'infiltration des cellules immunitaires.

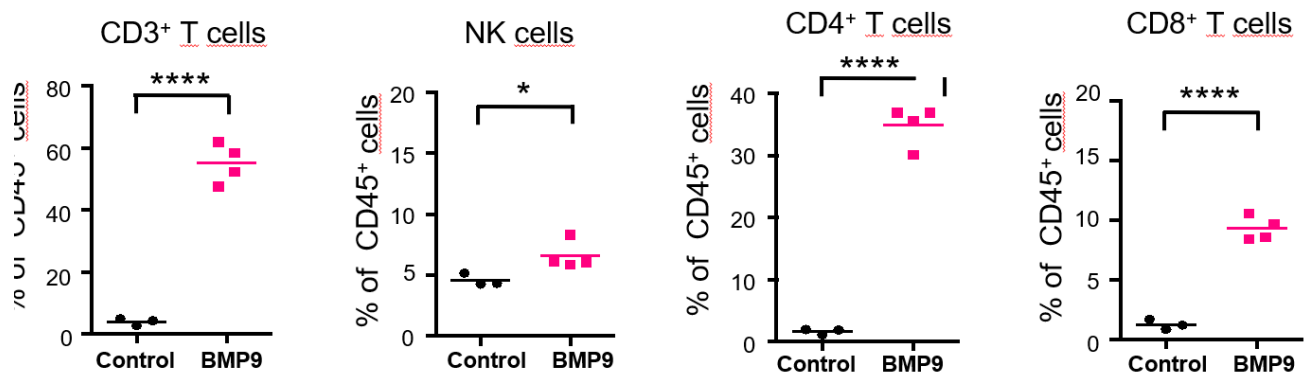


Figure 10. – Résultat de cytométrie démontrant une plus grande population de cellules immunitaires infiltrantes dans les tumeurs sur exprimant BMP9, l'expérience est réalisée 1 fois avec 4 souris. Des T-tests sont réalisés pour voir la significativité (Figure présentée avec la permission de (Viallard et al., 2020))

# Matériel et Méthodes

## Culture cellulaire

Les cellules HUVECS (Human umbilical vascular endothelial cells, Promocell) ont été cultivées (passages 1 à 4) sur des pétris de culture préalablement recouverts de gélatine (0,2%) et maintenues dans du milieu Endothelial Cell Growth Medium-2 (ECGM-2, Lonza) complété avec le supplément de 5% FBS (Fetal Bovine Serum) ainsi que 1% de Penicilin Streptomycin (P/S) (Hyclone) à 37° C avec 5% CO<sub>2</sub>.

Les cellules LLC (Lewis Lung Carcinoma) ont été cultivées sur des boîtes de pétris de culture et maintenues dans du milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (Wisent) complété avec le supplément de 10% FBS ainsi que Penicilin (50 I.U./ml) Streptomycin (50µg/ml) (Hyclone) à 37° C avec 5% CO<sub>2</sub>.

Les cellules endothéliales de cerveau murin ont été cultivées sur des boîtes de pétris de culture et maintenues dans du milieu ECGM-2 complété avec le supplément de 20% FBS ainsi que de la puromycine (Hyclone) à 2 µg/ml à 37° C avec 5% CO<sub>2</sub>.

## Animaux et Modèle de tumeur

Les femelles C57BL/6 de 8 semaines sont achetées chez l'entreprise Charles River Laboratories. Les souris avec un génotype Cdh5-CreERT2 sont fournies par Ralf Adams (Max Planck institutue of Molecular biomedecine). Les souris ALK1 flox sont données par Paul S Oh (University of Florida) et sont accouplées avec les souris Cdh5-CreERT2 afin de générer une lignée induite au Tamoxifen ALK1ΔEC. La délétion de ALK1 est provoquée par l'injection en intra péritonéal de 100 µg/g de Tamoxifen (Sigma Aldrich) pendant 3 jours consécutifs.

L'implantation de tumeur est initiée par l'injection sous cutanée sur chaque flanc de 500000 cellules LLC, préalablement mises en culture et récoltées dans 100 µl de PBS. Les tumeurs

sont suivies et mesurées à l'aide d'un pied à coulisse et le volume est calculé avec la longueur x largeur<sup>2</sup>/2. La croissance tumorale est déterminée par le ratio du volume final (VF) par rapport au volume initial (VI) avec la formule :  $(VF-VI) / VI$ . Le temps requis pour que le volume tumorale double (Temps de doublement (TD)) est calculé avec l'exponentiel de croissance (e) :  $TD = \ln(2) / e$ . Les tumeurs sont laissées en croissance jusqu'à un volume de 500 mm<sup>3</sup>. Les expériences sont réalisées en utilisant entre 3-5 souris par groupe et les souris ayant une ulcération avancée de la tumeur sont euthanasiées et exclues de l'analyse.

## **Transfection des siARN et Traitement des cellules HUVECS**

Les siARN ciblant ALK1 (Cat S102659972) et les siARN contrôle sont obtenus chez QIAGEN. Les cellules HUVECS sont mises en culture dans une plaque 6 puits pendant 24 h afin d'obtenir une confluence de 80% - 90%. Une fois à confluence, le milieu des cellules est changé avec du milieu (sans P/S) contenant les siARN (30 pmol) et 5 µl de réactif RNAiMAX (Invitrogen). Les HUVECS sont incubées 24H avant de remplacer le milieu par celui de culture.

Les traitements sont réalisés 24h après les transfections; le LPS (Sigma Aldrich) est utilisé à une concentration finale de 50 µg/ml et le BMP9 (R&D) est utilisé à 5 ng/ml. Ils sont ajoutés directement dans les puits sans changer le milieu.

## **Extraction d'ARN et Séquençage**

Les ARN totaux sont isolés à l'aide d'un kit d'extraction (RNeasy Mini Kit, QIAGEN). Les bibliothèques pour l'Ampliseq sont préparées et séquencées par Génome Québec. Les données sont ensuite analysées à l'aide du logiciel GSEA v2.2.1 fourni par Broad Institute of Massachusetts and Harvard University (enrichment test).

Des qPCR sont réalisées à partir des extraits ARN préalablement convertis en ADNc à l'aide d'une enzyme Reverse transcriptase. Le mix est fait avec les cDNA, l'eau, les amorces et un mix commercial (Sybrgreen, ABM). L'expérience est lancée sur un thermocycleur QS7 flex (Thermo Fisher). Les amorces utilisées sont :

Actine (Forward: AGAGCTACGAGCTGCCTGAC, Reverse: AGCACTGTGTTGGCGTACAG)

Acvrl1 (qPCR quiagen Primer mix, Cat n° QT00050351)

E-selectin (Forward: AGCCCAGAGCCTTCAGTGTA, Reverse: AACTGGGATTGCTGTGTCC)

Icam1 (Forward: GGCCGGGCCAGCTTATACAC, Reverse: TAGACACTTGAGCTCGGGCA)

## **Cytomètre de Flux**

Les cellules HUVECS sont prélevées 24h après les traitements BMP9 et LPS à l'aide de Trypsin 0,05% (Invitrogen) puis centrifugées et mises en plaque 96 puits avant d'être incubées avec les mix d'anticorps. Les anticorps utilisés sont CD31, ICAM1, VCAM1, E-Selectin et CD45, et la viabilité est évaluée à l'aide du Zombie Aqua. Les tubes sont passés sur un appareil de FACS (LSRFortessa X-20, BD Biosciences) et les données sont analysées sur le logiciel FlowJo.

Vingt et un jours après l'implantation des cellules tumorales, les tumeurs et les organes sont prélevés et digérés avec de la collagenase D (1 mg/mL, Sigma Aldrich) et de la DNase 1 (100 µg/ml, Sigma Aldrich) pendant 30 min puis filtrés à 0,7 µm (FisherBrand). Les globules rouges sont lysés avec une solution de NH<sub>4</sub>Cl, puis centrifugées. Les cellules sont remises en suspension avec un mix d'anticorps composé de CD4, CD8 $\alpha$ , CD3, CD19, CD45, NK1, LY6G, CD11B et F4/80 (Biolegend), et la viabilité est évaluée avec le Zombie Aqua.

## **Immunobuvardage**

Les cellules sont récupérées dans du tampon RIPA/Laemmli. Après sonication et quantification par micro-Bradford, les protéines sont déposées sur 8-10% SDS-PAGE (BioRad) et

transférées sur des membranes de nitrocellulose (BioRad). Les membranes sont ensuite bloquées avec une solution de BSA 5%. Les principaux anticorps utilisés sont : anti- $\beta$ -actine (Santa Cruz), anti-NF $\kappa$ B (systèmes R&D), anti-p-NF $\kappa$ B (systèmes R&D), anti-p-p38 (systèmes R&D), anti-SMAD1/5/9 (Signalisation cellulaire), anti pSMAD1/5/9 (Signalisation cellulaire). L'incubation dure entre 16-24h avant de faire des rinçages avec du TBST (20 mM Tris, 150 mM NaCl et 0,1 % Tween 20) suivi d'une incubation avec l'anticorps secondaire approprié. Les révélations sont faites avec un système de détection de chimioluminescence (LAS 3000 Fuji). Les analyses de densité sont faites en utilisant le logiciel Fiji/ImageJ.

## **Expérience d'adhésion leucocytaire in vitro**

L'expérience d'adhésion leucocytaire est réalisée à l'aide de microplaques 6 puits ( $\mu$ -slide VI<sup>0,4</sup> IBIDI) recouvert de collagène de type 1 de queue de rat (220  $\mu$ g/ml). Les HUVECS sont collectées et ensemencées dans les micropuits à une concentration de 1,6 millions de cellules/ml, afin d'obtenir une monocouche à confluence. Les cellules sont traitées avec du BMP9 (5 ng/ml) et du LPS (1  $\mu$ g/ml) toute la nuit. La plaque est montée sur un microscope (Zeiss live cells imaging) chauffé à 37°C et une pompe à seringue (Havard Apparatus 11 Plus) est fixé sur le côté. Les cellules sont rincées avec du milieu de culture (EBM-2) pendant 5 min à 0,5 ml/min avant de perfuser pendant 7 min les leucocytes à une concentration de 1 million de cellules/ml et à une vitesse de 0,1 ml/min. Un dernier rinçage est réalisé dans les mêmes conditions avant l'enregistrement de 10 photos par conditions à des emplacements aléatoires. La quantification des leucocytes est réalisée avec les logiciels MatLab et ImageJ.

## **Marquage immunofluorescent**

Les tumeurs sont récupérées dans de l'OCT (Fisher Healthcare) et congelées sur glace sèche avant d'être coupées au cryostat à une épaisseur de 10  $\mu$ m à -22°C. Les échantillons sont

rincés avec du PBS avant d'être incubés 10 min dans du formalin 3,7% puis rincés une nouvelle fois dans le PBS. Les lames sont saturées avec de la BSA (3 %) (Biobasic) - Triton (0,1 %) (Sigma Aldrich) avant d'être marquées à 4°C toute la nuit avec les anticorps rat anti-CD31 (BD Pharmigen) et goat anti-CD45 (Biolegend). Le lendemain, les échantillons sont incubés avec un anticorps secondaire Alexa Fluor (Invitrogen) pendant 2H. Les lames sont montées avec du Fluoroshield-DAPI (Sigma-Aldrich) et photographiées au microscope (Zeiss Z2).

## **Traitements chimiothérapeutiques**

Les souris avec des tumeurs sont traitées avec différents médicaments comme la Cysplatine et la Gencitabine. Les deux traitements sont administrés en injection intra-péritonéale sur des souris préalablement implantées avec des tumeurs LLC, à une concentration de 4 mg/kg pour la Cisplatine (Sigma Aldrich) et à 60 mg/kg pour la Gencitabine (Sigma Aldrich). Les injections sont faites tous les 3 jours et la prise de mesure est quant à elle réalisée quotidiennement. Les souris sont euthanasiées au bout de 20 jours après l'injection ou lorsque les tumeurs sont ulcérées.

## Résultats

### 3.1 L'implication de ALK1 dans l'expression des gènes de l'inflammation

Une étude de notre laboratoire a préalablement démontré une accumulation importante de lymphocytes dans des tumeurs surexprimant le BMP9 (Figure 10; Viillard et al., 2020). Bien que le mécanisme sous-jacent à cette infiltration lymphocytaire ne soit pas défini, une étude de séquençage d'ARN de cellules endothéliales isolées de ces tumeurs montre une expression accrue de molécules d'adhésion leucocytaires, suggérant que l'effet du BMP9 pourrait passer par la stimulation ALK1-dépendante des cellules endothéliales tumorales, menant à une activation des cellules endothéliales tumorales. Dès lors, la première expérience menée pour ce projet a été de déterminer l'effet de la délétion du récepteur ALK1 dans les cellules endothéliales sur l'expression de cytokines et molécules d'adhésion impliquées dans l'adhésion leucocytaire.

Nous avons donc fait des études d'Ampliseq sur des cellules HUVECs ALK1 KO, qui permet de comparer une grande quantité de gènes différents. Ce test nous permet de récolter un grand nombre de données que l'on peut exploiter pendant tout le projet. La première information que nous révèle le GSEA (Gene Set Enrichment Analysis) est une diminution significative ( $p$ -value $<0,05$ ) dans les cellules ALK1 KO de l'expression des gènes impliqués dans l'adhésion, la migration leucocytaire ainsi que dans la réponse inflammatoire (Figure 11A). Si on regarde en détail on constate une différence significative chez les protéines d'adhésion telles que : VCAM1, E-selectine (SELE), L-selectine (SELL), P-selectine (SELP), ICAM1 (Figure 11B). Ces protéines jouent un rôle majeur dans la diapédèse et constituent la piste prioritaire que nous allons explorer dans ce mémoire. Une deuxième différence apparaît chez plusieurs chimiokynes qui diminuent également chez nos HUVECs ALK1 KO (Figure 11C). Aux vues des premiers résultats, le projet s'est orienté sur une étude plus poussée du lien entre le récepteur ALK1 et les protéines d'adhésion.



Dans la littérature, il n'existe pas de travaux relatant un potentiel lien entre la signalisation ALK1 et le processus d'activation des cellules endothéliales, d'où notre implication dans la découverte de celui-ci.

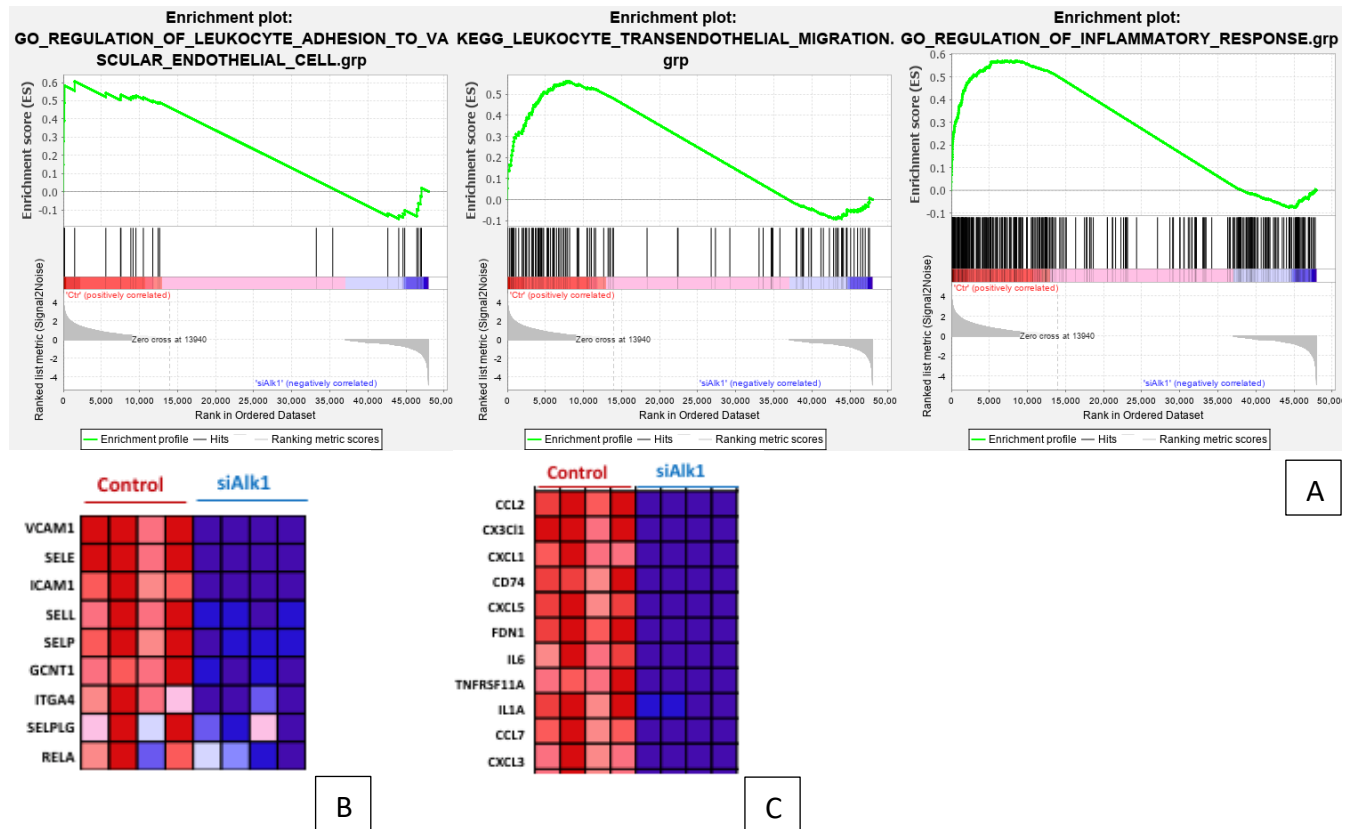


Figure 11. – La délétion du gène ALK1 diminue l'expression des gènes de la réponse inflammatoire dans les cellules endothéliales.

Les cellules HUVECS ont été transfectées avec des siARN (30 pMol) ciblant ALK1 et l'ARN a été collecté et séquencé après 48h.

Afin de confirmer les résultats de Ampliseq, plusieurs qPCR ont été réalisées sur les gènes d'intérêt. La première qPCR a permis de vérifier l'efficacité du traitement siRNA ALK1, et nous permet de nous confirmer que les cellules du groupe KO possèdent bien la délétion du récepteur ALK1 (Figure 12 A). Le projet étant orienté sur le lien entre le récepteur ALK1 et les protéines d'adhésion, nous avons confirmé les effets de la délétion de ALK1 sur l'expression de E-selectine et ICAM1. De plus, nous avons évalué les effets de la perte d'ALK1 sur la réponse au LPS,

permettant de simuler un stimulus inflammatoire. Pas de différences d'expression dans les conditions non stimulées n'ont été détectées sur l'expression de E-selectine et ICAM1. Cependant il y avait une diminution notable de leur expression lorsque l'on stimule avec du LPS dans les cellules ALK1 KO. Il y a une plus faible augmentation de ces protéines chez les cellules KO, ce qui suggère que l'expression de ALK1 potentialise la réponse des cellules endothéliales à un stimulus inflammatoire.

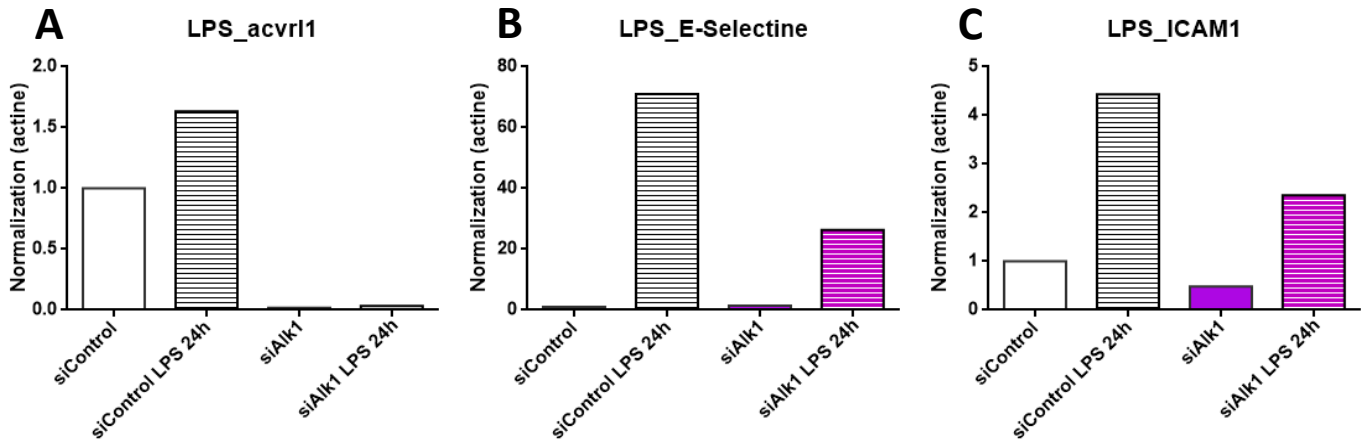
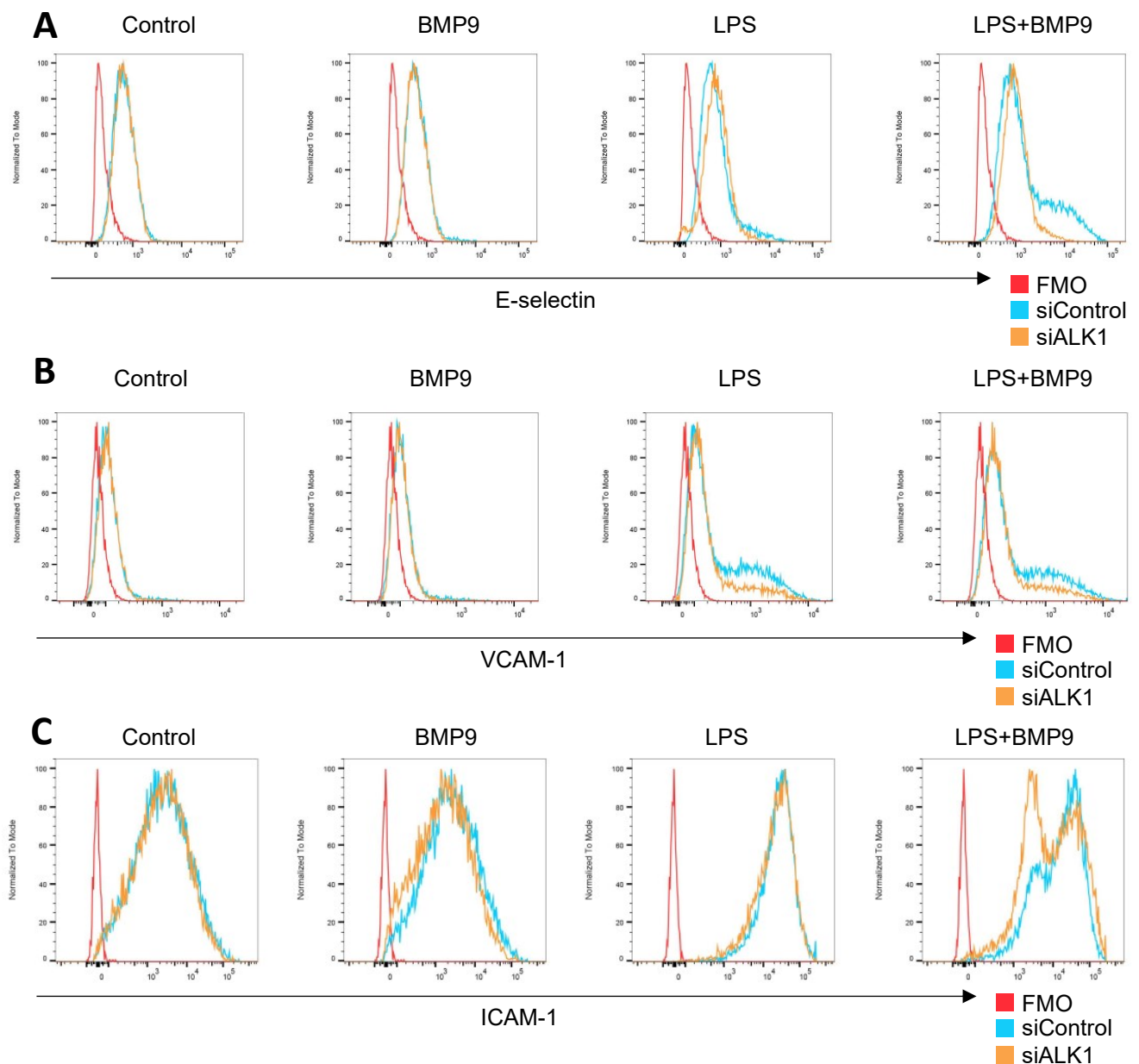


Figure 12. – ALK1 diminue l'expression des gènes des protéines d'adhésion dans des conditions inflammatoires. Vérification par qPCR des gènes d'intérêt (A : Acvr11, B : E-selectine, C : ICAM1) dans des conditions d'inflammation grâce au LPS (16H à 50 µg/ml). L'expérience n'est réalisée qu'une seule fois

### 3.2 Évaluation du rôle de ALK1 dans l'expression des protéines d'adhésion leucocytaires

L'étude du rôle de ALK1 dans l'expression des protéines d'adhésion fait suite aux résultats précédents. Au vu de la baisse de l'expression des gènes dans le Ampliseq et dans les qPCRs chez nos cellules ALK1-KO, nous avons voulu évaluer le rôle de ALK1 dans l'expression des protéines d'adhésion par cytométrie en flux. Nous avons donc étudié l'expression des protéines E-sélectine, ICAM-1 et VCAM-1 dans des cellules HUVECs préalablement transfectées avec des siRNA contrôles ou ALK1 et stimulées avec ou sans BMP9 et/ou LPS. La première différence observée se

situé au niveau de E-selectine (Figure 13 A et D1). Pour les conditions contrôle et BMP9 seul, il n’y a pas de différence significative; cependant une différence des MFI (Mean Fluorescence Intensity) entre les conditions contrôles et ALK1 KO apparaît lorsque l’on stimule avec le LPS et encore plus avec LPS et BMP9. Ce résultat suggère une implication du récepteur ALK1 dans la modulation de l’expression de E-selectine dans des conditions inflammatoires. Pour VCAM1 et ICAM1, on n’observe pas de différences significatives des MFI entre les contrôles et les KO, peu importe la condition hormis chez VCAM 1 où il y n’a pas d’augmentation des MFI chez les cellules KO dans la condition LPS + BMP9.



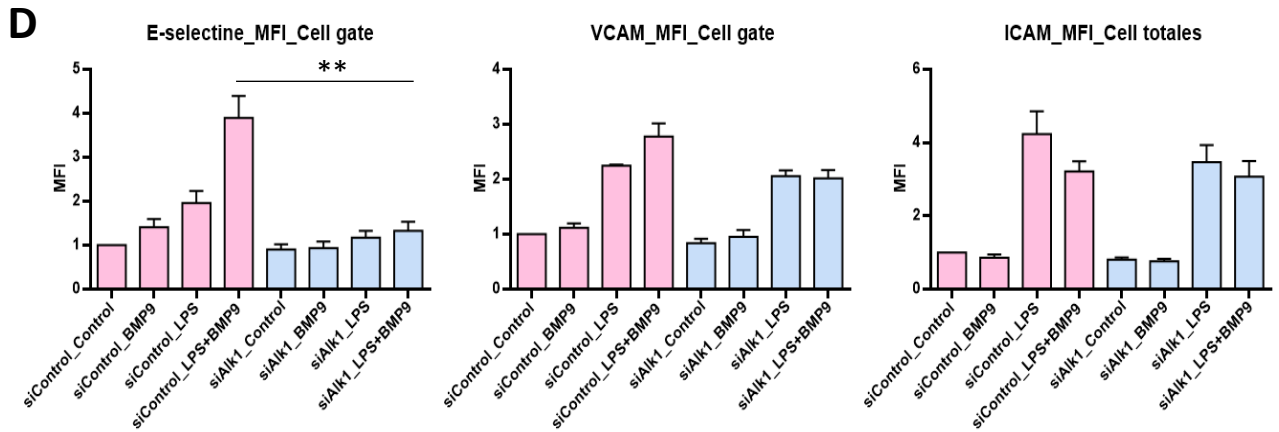


Figure 13. – Analyse de l’expression des protéines d’adhésion dans des HUVECS contrôles ou ALK1 KO suite à des stimulations au LPS avec ou sans BMP9. Les cellules siControl et siALK ont été traitées avec du BMP9 (16H à 5 ng/ml) et/ou avec du LPS (16H à 50 µg/ml). Une cytométrie en flux a été réalisée pour évaluer l’expression en surface de l’E-selectine (A) (PE-conjugué antihumain), de VCAM-1 (B) (APC-conjuguée anti-VCAM-1 humaine) et d’ICAM-1 (C) (PE-conjugué anti-humain VCAM-1) sur HUVECs. Les histogrammes sont compilation de quatre expériences. Les graphiques montrent l’intensité de fluorescence médiane (MFI) exprimée en tant que facteur de changement par rapport aux HUVEC non traités. Des T-tests sont fait afin de connaître la significativité et les résultats sont représentés par des étoiles. \*\* = 0,001

Cette tendance est confirmée dans les FACS réalisés sur des cellules endothéliales isolées de cerveaux de souris, où l’on observe une diminution de l’expression de VCAM1 et de ICAM1 dans les souris ALK1-KO (Figure 14), suggérant un lien important entre le récepteur ALK1 et l’expression des protéines d’adhésion.

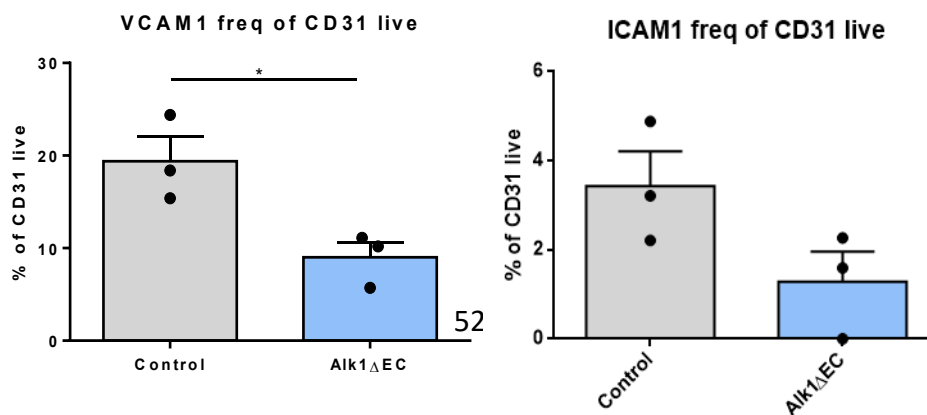


Figure 14. – Analyse de l'expression des protéines d'adhésion dans des cellules endothéliales isolées de cerveaux de souris contrôles ou ALK1 $\Delta$ EC. Les souris ont reçu 3 doses de tamoxifène (2mg par jour et par souris) et sont sacrifiées une semaine après. Les échantillons sont marqués avec les anticorps VCAM-1 et ICAM1 (utilisés dans la Figure 13) puis passés au FACS. Les graphiques représentent la fréquence de cellules positives en fonction du nombre de CD31 (n= 3 souris par groupe). Des T-tests sont fait afin de connaitre la significativité et les résultats sont représentés par des étoiles. \* = 0,05

### 3.3 ALK1 est impliqué dans la phosphorylation de p38

L'impact de ALK1 dans l'expression des protéines et des gènes dans des conditions inflammatoires suggèrent que l'absence de ce récepteur dans les cellules endothéliales mène à une certaine anergie. Ceci suggère que l'absence de ALK1 pourrait influencer des voies des signalisations intracellulaires qui sont en amont des molécules d'adhésion suite à un stimulus inflammatoire. En effet, des études ont démontré que les voies de signalisation NF $\kappa$ B (p65) et p38 étaient requises pour induire l'expression de ces molécules d'adhésion dans les cellules endothéliales suite à des stimulations par le LPS ou TNF $\alpha$  ((Read et al., 1997);(Westra et al., 2005)). Dès lors, nous avons évalué par Western blot l'effet de la délétion de ALK1 sur la phosphorylation des protéines NF $\kappa$ B (p65) et P-p38 dans des cellules HUVECS, transfectées siALK1 et siCtrl. Des traitements au LPS et au BMP9 ont été réalisés pendant 16H afin d'avoir une exposition optimale pour nos traitements. Afin de s'assurer de la perte de signalisation de ALK1, nous avons évalué la phosphorylation des protéines SMAD1/5/9 (Figure 15 A). Il est possible de voir que la délétion de ALK1 abroge la phosphorylation de ces protéines avec les traitements BMP9 (Figure 15 B).

Nous avons ensuite évalué les effets de la délétion de ALK1 sur la phosphorylation de NF $\kappa$ B et p38. Pour NF $\kappa$ B, on ne constate pas de différence significative que ce soit en condition basal ou traitée (Figure 15 C). Cependant, une tendance apparait pour p38, où les traitements LPS et

LPS+BMP9 n'augmentent pas la phosphorylation de ce dernier dans les cellules ALK1-KO comparativement aux cellules contrôles (Figure 15 D). Cette tendance, bien que non significative due à une variabilité inter expérimentale, indique quand même un rôle potentiel de ALK1 dans le chemin métabolique de p38. Cela semble cohérent étant donné l'implication de celui-ci dans l'expression de l'E-selectine (Read et al, 1997).

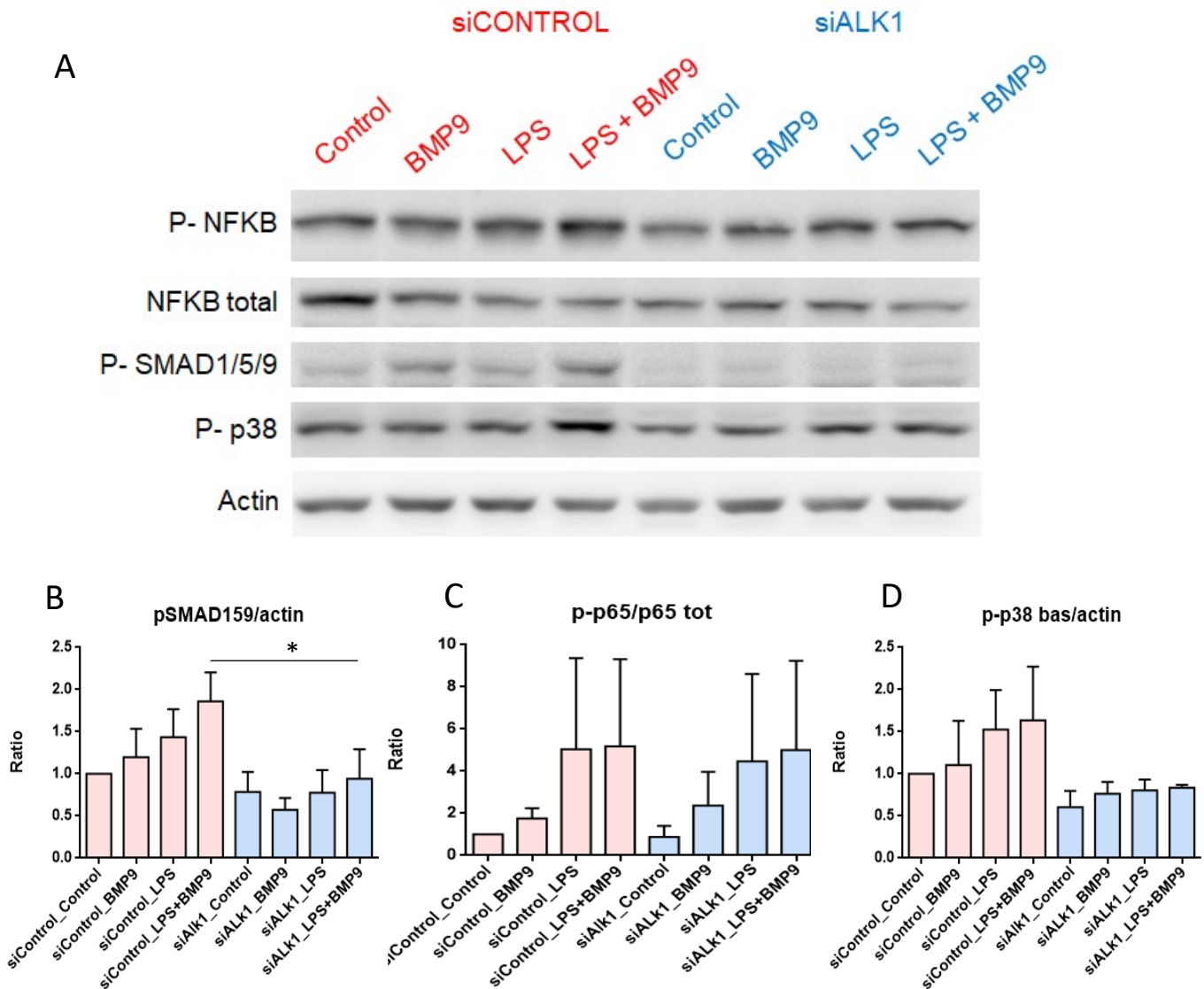


Figure 15. – La délétion de ALK1 diminue la phosphorylation de p38 dans des conditions inflammatoires. Les cellules siControl et siALK1 ont été traitées avec du BMP9 (16H à 5 ng/ml) et avec du LPS (16H à 50 µg/ml). Les graphiques montrent le ratio de chaque

protéine normalisée sur la condition contrôle non traitée (n=4). A : photo des gels avec les différentes protéines, B : graphique des quantifications normalisées pour pSMAD1/5/9, C : graphique des résultats normalisés pour p-p65, D : graphique des résultats normalisés pour p-p38. Des T-tests sont fait afin de connaitre la significativité et les résultats sont représentés par des étoiles. \* = 0,05

### **3.4 ALK1 influence l'adhésion des leucocytes sur l'endothélium**

Nos résultats précédents démontrent que la perte de ALK1 abroge l'expression de molécules d'adhésion leucocytaires dans les cellules endothéliales. Étant donné le rôle de ces molécules dans le « rolling » et l'adhésion des leucocytes sur l'endothélium, nous avons voulu évaluer les effets de la perte de ALK1 sur l'adhésion leucocytaire sur des monocouches de cellules endothéliales.

Nous avons tout d'abord utilisé des cellules endothéliales de cerveau isolées de souris contrôles ou ALK1 $\Delta$ EC pour regarder l'effet d'ALK1 sur l'adhésion des leucocytes sur l'endothélium. L'utilisation d'une méthode dite de « Flow » permet de voir au microscope en temps réel la diapédèse des leucocytes sur les cellules endothéliales et permet ainsi d'enregistrer des vidéos pour les quantifier. Des cellules endothéliales de cerveaux sont prélevées sur des souris WT et ALK-KO puis mises en plaque IBIDI afin de les traiter avec différentes conditions. Les leucocytes sont prélevés dans la rate d'une souris contrôle le jour du flow et ils sont purifiés 2h avant l'expérience. Les leucocytes sont en circulation pendant 7 min à 0,1 ml/min puis sont rincés pour ne garder que les adhérant. Sur les photos de la figure 16A, on peut observer une différence du nombre de leucocytes qui restent accrochés sur l'endothélium après le rinçage au PBS. Sur les conditions contrôle, le nombres de cellules immunitaires (points blancs) est bien supérieur par rapport au cellules ALK-KO. Le graphique (Figure 16B) compile la quantification de toutes les photos de chaque condition. La différence majeure qui apparait est un nombre supérieur de leucocytes accrochés sur l'endothélium des cellules WT en comparaison aux cellules ALK1-KO. Une deuxième différence au niveau des conditions démontre l'effet synergétique du BMP9 avec le LPS dans l'adhésion des leucocytes.

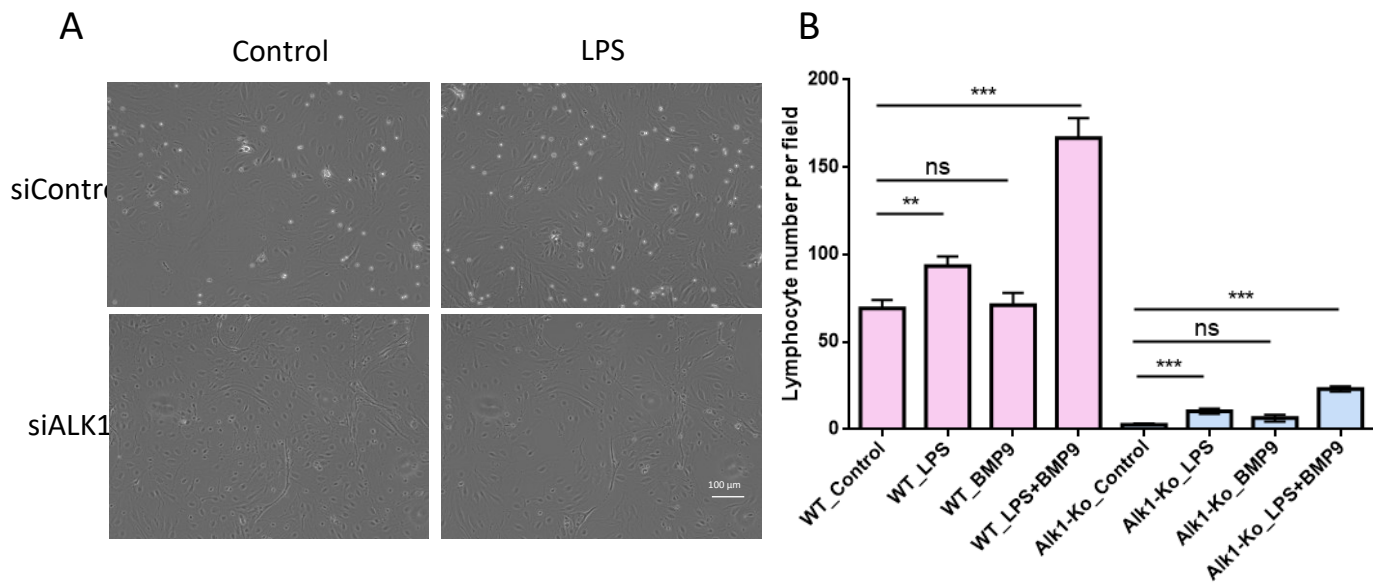


Figure 16. – La délétion de ALK1 réduit l’adhésion des leucocytes sur l’endothélium. Les cellules endothéliales de cerveaux sont prélevées sur des souris contrôle et ALK1-KO puis sont mises en culture 48h avant de faire les traitement BMP9 (16h à 5 ng/ml) et LPS (16H à 50 µg/ml). Les leucocytes sont prélevés le jour même dans la rate d’une souris contrôle. A : photos du tapis cellulaire après le rinçage des leucocytes, B : Graphique regroupant les quantifications de leucocytes adhérents sur l’endothélium de 10 photos par conditions d’une seule expérience. Des T-tests sont fait afin de connaitre la significativité et les résultats sont représentés par des étoiles. \*\* = 0,001; \*\*\* = 0,0001.

Nous avons aussi reproduit ces résultats en utilisant des cellules HUVECS transfectées avec un siARN ciblant ALK1 et un siARN contrôle. Les cellules sont placées en plaque IBIDI comme pour la manipulation précédente et traitées aux mêmes concentrations de LPS et BMP9. Les leucocytes sont prélevés grâce à une prise de sang et sont purifiés 2h avant de commencer le flow. L’intérêt de reproduire cette expérience avec des cellules HUVECS est de démontrer l’impact de ALK1 dans un modèle humain.



Les résultats obtenus sont similaires aux précédents puisque l'on observe la même anergie des cellules ALK1 KO au niveau des conditions inflammatoires. Le manque de ALK1 résulte en une diminution de l'adhésion et de la migration des leucocytes sur l'endothélium suite au traitement avec LPS (Figure 17 A et B).

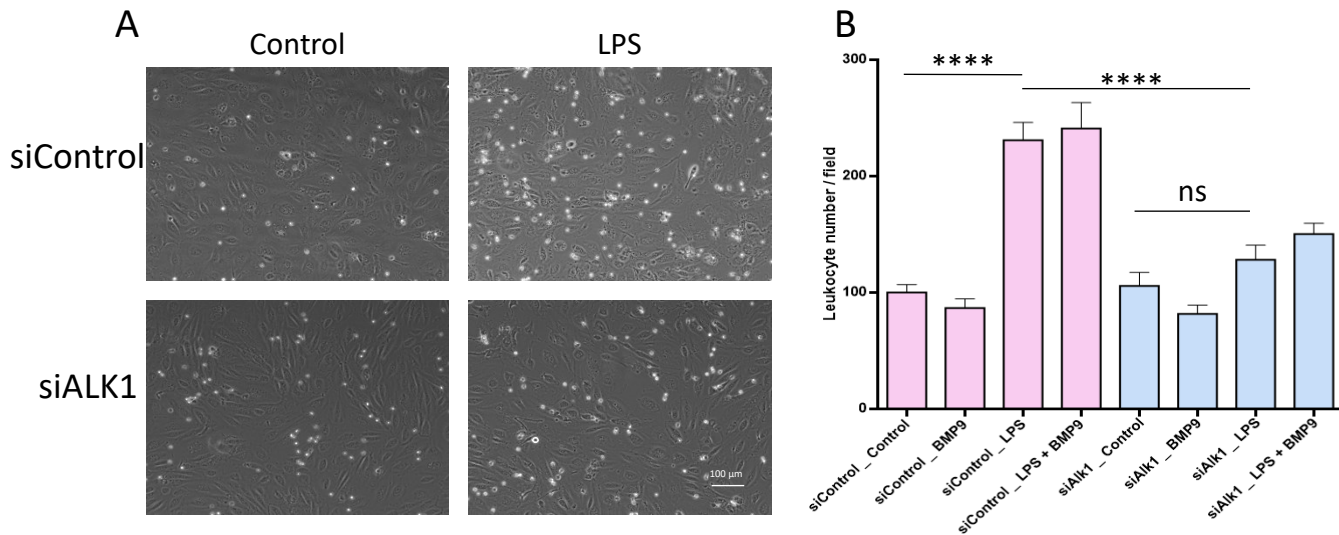


Figure 17. – La délétion de ALK1 réduit l'adhésion des leucocytes sur l'endothélium dans les conditions inflammatoires. Les cellules HUVECS sont transfectées avec des siARN contrôle et ALK1 puis traitées au BMP9 (16H à 5 ng/ml) et au LPS (16H à 50 µg/ml). Les leucocytes sont prélevés le jour même via une prise de sang. A : photos du tapis cellulaire après le rinçage des leucocytes; B : Graphique regroupant les quantifications de leucocytes de 10 photos par conditions de 3 expériences différentes. Des T-tests sont fait afin de connaitre la significativité et les résultats sont représentés par des étoiles. \*\*\*\* = 0,00001.

### 3.5 Évaluation du recrutement leucocytaire dans des tumeurs de souris ALK1 $\Delta$ EC

Afin de regarder l'impact de ALK1 dans des conditions in vivo, des cellules tumorales ont été injectées dans des souris possédant un génotype ALK1 $\Delta$ EC $^{-/-}$ , caractérisées par une délétion homozygote de ALK1 spécifiquement dans les cellules endothéliales suite à un traitement au tamoxifène. Comme les souris ALK1 $\Delta$ EC $^{-/-}$  adultes meurent entre 7-10 jours suivant les injections de tamoxifène, nous avons procédé aux injections de tamoxifène une semaine avant le sacrifice, lorsque les tumeurs atteignent une taille de 100 mm<sup>3</sup>. Un marquage de CD31 qui marque les vaisseaux sanguins, et un second de CD45 pour les cellules immunitaires, sont réalisés sur des coupes de tumeurs faites au cryostat. Cette microscopie permet de voir la co-localisation des cellules immunitaires par rapport aux vaisseaux sanguins. Sur les premières photos, une différence majeure apparaît sur l'architecture des vaisseaux sanguins. En haut à gauche (Figure 18), l'architecture vasculaire est assez structurée en comparaison à la photo de droite, où les vaisseaux sont désordonnés et en surabondance. Concernant les cellules immunitaires, la répartition dans les tumeurs contrôles est relativement homogène, alors que dans les tumeurs ALK1 $\Delta$ EC, des zones dépourvues de leucocytes apparaissent (zones noires). Cette différence est très importante car l'on constate que, malgré la présence de vaisseaux sanguins, il existe des zones non approvisionnées en leucocytes. Cette hétérogénéité au niveau de la fonction vasculaire dans les tumeurs pourrait donc avoir des conséquences tant pour l'immunothérapie que pour les différents traitements chimio-thérapeutiques.

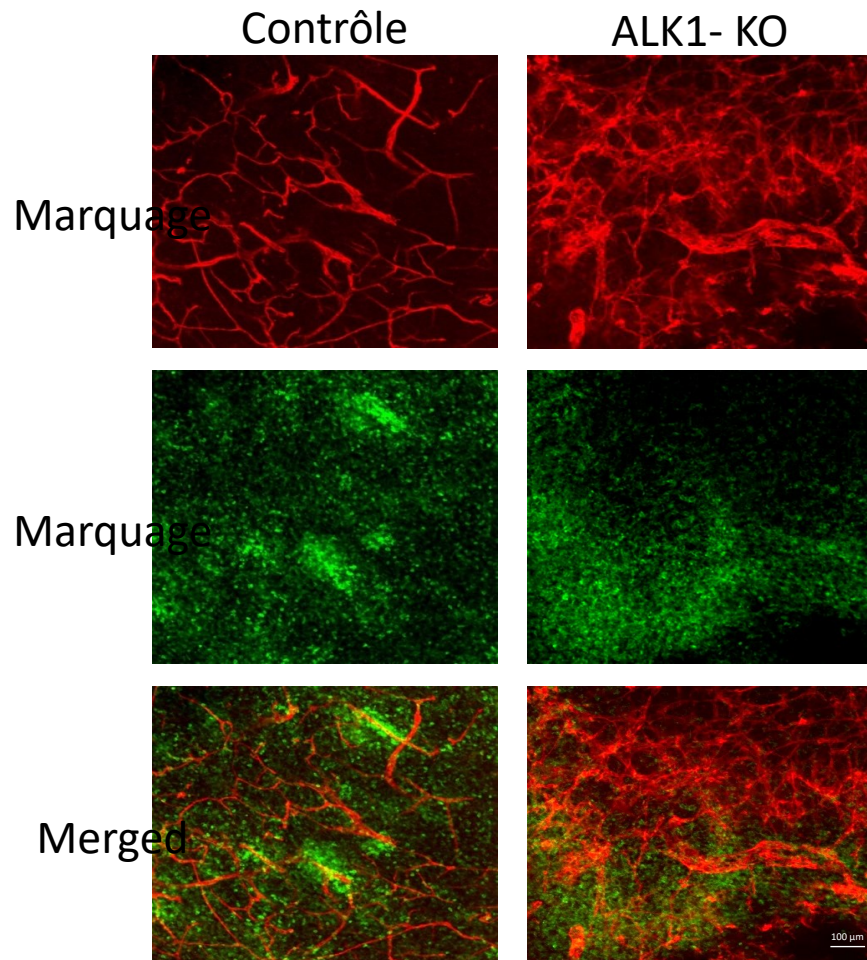


Figure 18. – Le réseau vasculaire désordonné des souris ALK1-KO mène à une infiltration hétérogène des leucocytes dans la tumeur. 500000 cellules cancéreuses sont injectées sur chaque flanc de la souris puis la croissance est suivie pendant 3 semaines. Les souris sont injectées avec du Tamoxifène pendant trois jours, une semaine avant le sacrifice puis les tumeurs sont récoltées et coupées avant d’être marquées avec les anticorps CD31 (rouge) et CD45 (vert) pour la microscopie.

### **3.6 La délétion de ALK1 affecte le recrutement de plusieurs types leucocytaires dans les tumeurs**

Suite aux résultats précédents sur le recrutement leucocytaire sur l'endothélium et des marquages de tumeurs, nous avons voulu quantifier les différentes populations de cellules immunitaires infiltrantes dans les tumeurs des souris ALK1 $\Delta$ EC par cytométrie en flux.

Pour ces expériences, des souris hétérozygotes (au lieu des homozygotes) ALK1 $\Delta$ EC ont été utilisées, puisque les souris homozygotes meurent une semaine après l'injection de tamoxifène, ce qui limitait la durée de l'expérimentation. Des expériences préalables ont démontré que les souris ALK1 $\Delta$ EC hétérozygotes ne développent pas de malformations vasculaires notables dans la première année de vie, mais sont plus propices à développer des malformations vasculaires à un âge avancé (18 mois) ou dans des modèles pathologiques. Pour ces expériences, du tamoxifène est injecté, une semaine avant l'injection des cellules tumorales LLC, pendant trois jours. La croissance tumorale dure ensuite 3 semaines, puis les tumeurs sont récoltées puis passées au FACS afin de quantifier les différentes populations de cellules immunitaires infiltrantes. Une baisse de la présence des neutrophiles, des NK ainsi que des macrophages est observé dans les tumeurs hétérozygotes (Figure 19 B-D). Malgré le fait que ce ne soit pas significatif une tendance à la baisse apparait chez les populations de lymphocytes CD4 et CD8, ainsi que pour les cellules B (Figure 19 A, E et F). Dès lors, ces résultats suggèrent que même dans des conditions hétérozygotes, la réduction des niveaux de ALK1 au niveau de l'endothélium est suffisante pour réduire le nombre des cellules NK et neutrophiles infiltrants dans les tumeurs et démontrent aussi une forte tendance chez les macrophages.

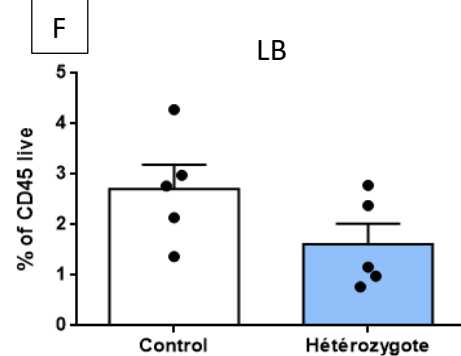
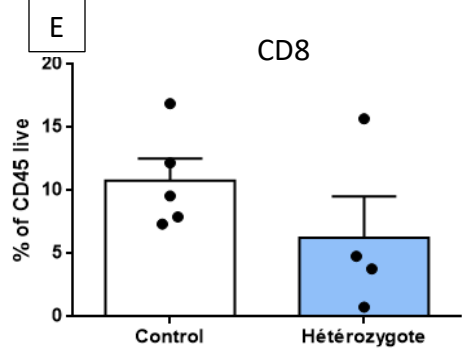
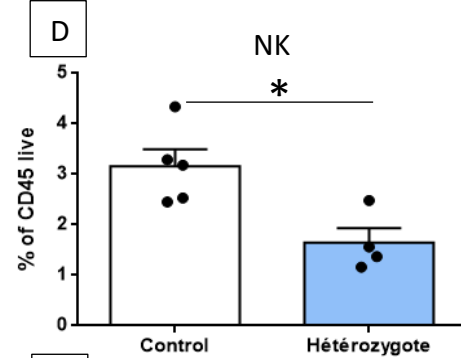
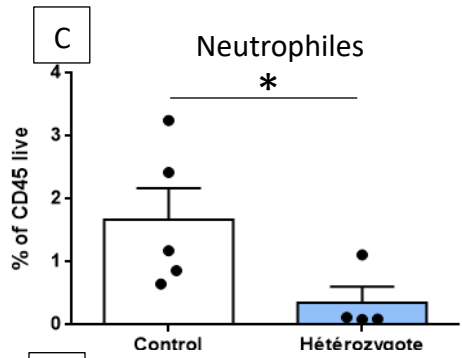
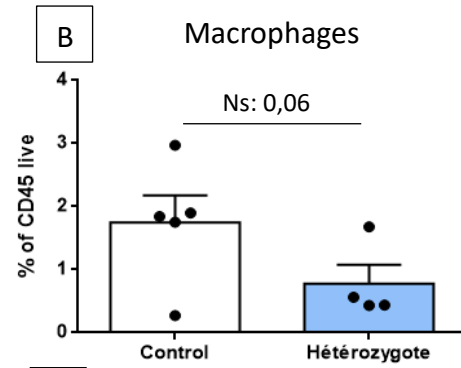
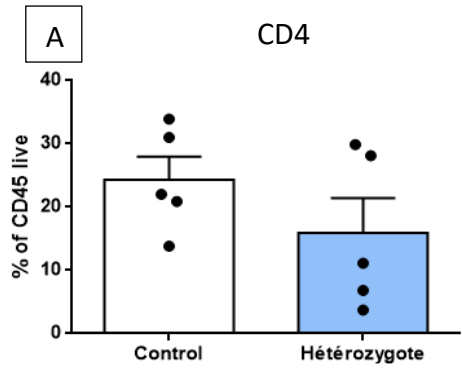
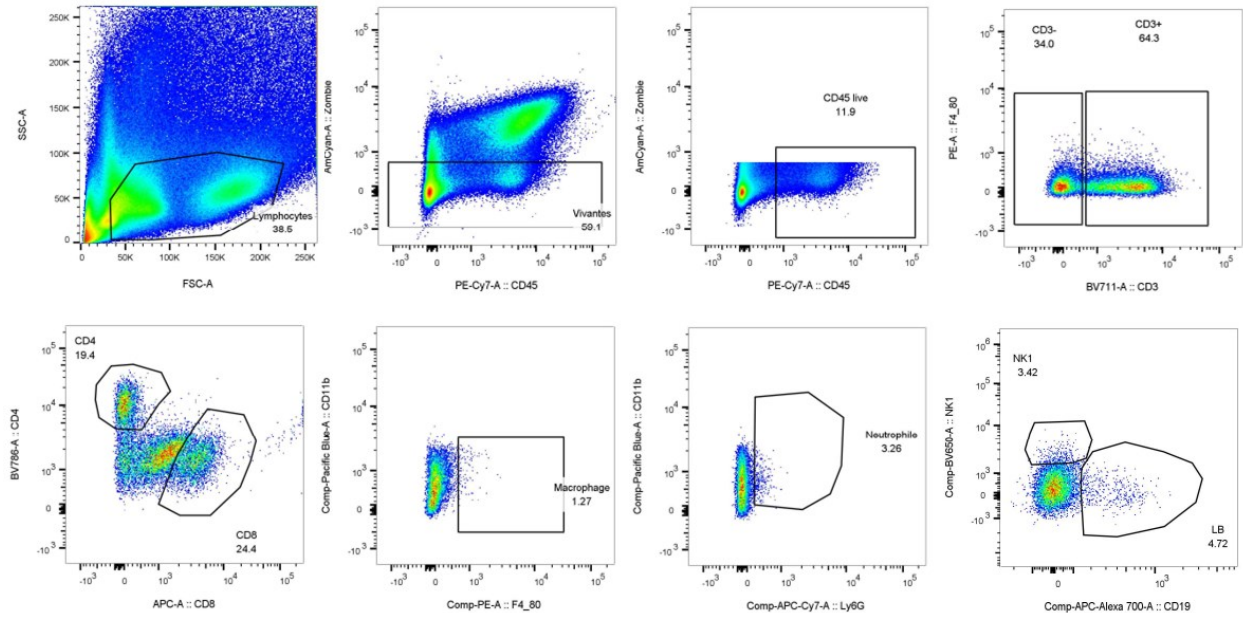


Figure 19. – La délétion de ALK1 réduit le nombre de leucocytes infiltrants dans les tumeurs LLC. Les souris sont injectées avec du Tamoxifène pendant trois jours, puis après une semaine 500000 cellules cancéreuses sont injectées sur chaque flanc de la souris (n=3 souris par groupe). La croissance est suivie pendant 3 semaines puis les tumeurs sont dissociées et analysées par cytométrie en flux. Des T-tests sont fait afin de connaitre la significativité et les résultats sont représentés par des étoiles. \* = 0,05

### **3.7 La normalisation vasculaire induite par BMP9/ALK1 aide à augmenter l'efficacité des traitements chimio-thérapeutiques.**

Au vu des propriétés anti-angiogéniques de BMP9 et des résultats sur le lien entre la réponse immunitaire et la signalisation ALK1, nous nous sommes aussi intéressés à l'effet de la normalisation induite par la signalisation ALK1/BMP9 sur l'efficacité des traitements de chimiothérapie. Dès lors, nous avons évalué l'effet thérapeutique de 2 agents chimio thérapeutiques, la cisplatine et la gencitabine, dans tumeurs sur-exprimant BMP9. Ces agents ont été choisis car plusieurs études rapportent leur efficacité avec les traitements de normalisation vasculaire. (Zhou S et al; 2013; Ghosh S and Maity P, 2006)

Pour cette expérience, des cellules LLC sur-exprimant BMP9 sont injectées dans des souris, puis les tumeurs ont été suivies pendant 3 semaines avec une mesure tous les deux jours. Un traitement est injecté en intra péritonéale, une semaine après, tous les 3 jours pendant 2 semaines.

Des courbes de croissance tumorales montrent des différences entre les groupes non traités et les groupes traités par des agents chimio thérapeutiques, ainsi qu'entre les tumeurs contrôles et surexprimant BMP9 (Figure 20 A, B). Pour la courbe de la Cisplatine, une différence significative intervient à partir du jour 9 entre le groupe BMP9 et le groupe BMP9 traité. Cette différence suggère une synergie entre le BMP9 et la cisplatine au point où la croissance devient nulle à partir du jour 16 dans les groupes BMP9/cisplatine (Figure 20 A). Du côté de la

gemcitabine, la différence entre le groupe BMP9 et le groupe traité n'est pas significative mais il y a quand même une tendance puisque les tumeurs BMP9 traitées avec la gemcitabine ne croissent que très peu en comparaison avec les groupes BMP9 non traités (Figure 20 B).

Les graphiques en B et D montrent le temps de doublement, nous donnant des informations sur le temps nécessaire pour que le volume de la tumeur double. Sur la figure 20 C, la différence entre les groupes traités, à la Cisplatine, est significative cependant la différence dans les groupes BMP9 ne l'est pas (0.08). Concernant la gemcitabine (Figure 20 D), la différence entre les groupes BMP9 est très significative.

Tous ces résultats suggèrent une synergie entre la normalisation vasculaire induite par la signalisation BMP9/ALK1 et les traitements chimio-thérapeutiques. Ceci suggérerait que l'utilisation de BMP9 pourrait permettre d'améliorer les soins aux patients atteints de tumeurs.

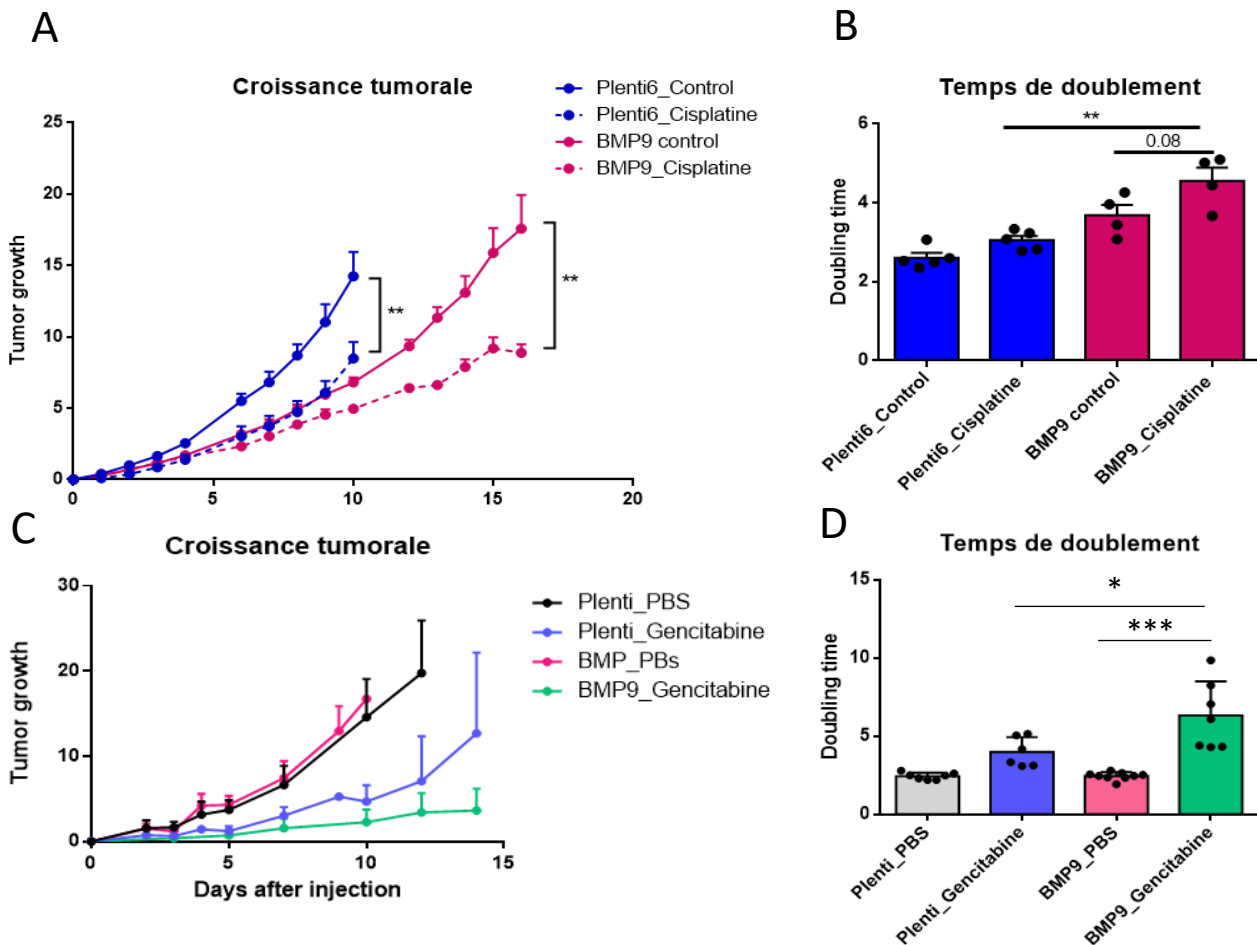


Figure 20. – La surexpression de BMP9 améliore l'efficacité des traitements chimio-thérapeutiques. Les souris sont injectées avec du Tamoxifène pendant trois jours, puis après une semaine 500000 cellules cancéreuses sont injectées sur chaque flanc de la souris (n=5 souris par groupe). La croissance est suivie pendant 3 semaines et les tumeurs sont mesurées tous les deux jours. A : Courbe de croissance des tumeurs contrôle et BMP9 avec traitement Cisplatine, B : Graphique des temps de doublement des tumeurs contrôle et BMP9 avec traitement Cisplatine, C : Courbe de croissance des tumeurs contrôle et BMP9 avec traitement gemcitabine, D : Graphique des temps de doublement des tumeurs contrôle et BMP9 avec traitement gemcitabine. Des T-tests sont fait afin de connaitre la significativité et les résultats sont représentés par des étoiles. \* = 0,05; \*\* = 0,001; \*\*\* = 0,0001.



## Discussion

Dans les tumeurs, certaines populations de leucocytes ont le potentiel de reconnaître et de tuer les cellules cancéreuses ((Galon et al., 2006);Gajewski et al., 2013), et les patients ayant une infiltration de lymphocytes T plus élevée ont moins de chance de récurrence (Mlecnik et al., 2011). Cependant l'infiltration des leucocytes est compliquée dans les tumeurs dû à différents problèmes, tels que la forte perméabilité vasculaire, la compression des vaisseaux ainsi que la présence de zones hypoxiques (Viallard et al., 2017),(Sitkovsky et al., 2008). Certaines molécules, comme le VEGF, présentes en grand nombre dans les tumeurs, jouent un rôle adverse dans le recrutement et la fonction leucocytaire, entre autre par le recrutement de cellules myéloïdes suppressives (Ohm et al, 2003).C'est dans l'optique de normaliser le réseau vasculaire tumorale pour potentialiser le recrutement leucocytaire que notre projet s'intéresse au récepteur ALK1 (Scharpfenecker et al., 2007)

Le récepteur ALK1 est décrit dans la littérature comme un régulateur de la formation de vaisseaux sanguins, mais est aussi impliqué dans plusieurs pathologies vasculaires telles que la télangiectasie hémorragique héréditaire et l'hypertension artérielle pulmonaire (Ricard et al, 2010 ; Li et al, 2016). Dans ces travaux, nous démontrons, en plus des rôles précédemment décrits, la fonction de ALK1 dans le recrutement leucocytaire sur l'endothélium. Les premières études rapportées dans la littérature, mettaient en lumière l'implication des traitements BMP9 dans l'expression des protéines d'adhésions (Mitrofan et al., 2017). De plus, dans des modèles souris et humains, plusieurs publications signalent qu'une augmentation de l'expression ALK1 dans des tumeurs permet d'avoir une réponse immunitaire plus importante (Bocci et al., 2019),(Viallard et al., 2020). Les premiers résultats obtenus suggèrent que la délétion ALK1 influence l'expression des gènes des protéines d'adhésion ainsi que des chimiokines. Cela est démontré par l'expérience Ampliseq réalisée sur les cellules contrôle par rapport aux cellules ALK1-KO (Figure 11). Ces premières données concordent avec notre hypothèse de départ concernant le rôle de ALK1 dans le recrutement leucocytaire sur l'endothélium. L'influence sur les protéines d'adhésion est très intéressante car elles sont, elles-mêmes, exprimées sur les

cellules endothéliales tout comme ALK1 (Ley, 1992). Les quantifications par qPCR ont permis de mettre en évidence le lien entre l'expression d'ALK1 et E-selectine et ICAM1 dans des conditions inflammatoires (Figure 12). Une diminution de la réponse au LPS est observé dans les cellules ALK1-KO, corroborant les travaux de (Gaitantzi et al., 2020) démontrant l'impact de BMP9 dans la réponse au LPS. Ces résultats présentent une faiblesse puisque qu'au niveau basal, la diminution de l'expression est moins forte dans les cellules ALK1-KO. Cela peut être expliqué par le fait que cette qPCR avec les conditions LPS n'a été réalisée qu'une seule fois, bien qu'un Ampliseq avec des conditions identiques au précédent mais avec l'ajout de conditions LPS a été lancé et il est en attente de séquençage. Cette expérience va permettre de vérifier si cette tendance dans les conditions inflammatoire est juste.

Afin de confirmer que ALK1 influence le recrutement leucocytaire par les protéines d'adhésion, les expérimentations se sont orientées vers de la cytométrie de flux pour observer l'expression de ces protéines. La littérature a précédemment rapporté que les traitements BMP9 augmentent l'expression de E-selectine, VCAM1 ainsi que TLR4 (Appleby et al., 2016). Nos travaux démontrent l'implication de ALK1 dans les effets du BMP9 sur les molécules d'adhésion, puisque nous avons observé une diminution de l'expression des protéines d'adhésion E-selectine et VCAM1 dans nos cellules ALK1-KO ainsi que dans nos souris ALK1 $\Delta$ EC. Les plus grandes différences sont observées dans les conditions LPS+BMP9 orientant vers un lien entre ALK1 et la réponse inflammatoire. Toutefois ces résultats ne rapportent pas de différence pour ICAM1 dans les cellules HUVECS, peu importe les conditions et simplement une faible tendance pour les souris ALK1 $\Delta$ EC. Ces expériences sont prometteuses et pourraient être poursuivies en considérant les effets de ALK1 sur la signalisation de TLR4 ou des protéines de l'inflammation.

Plusieurs études rapportent l'action de certains médiateurs de signalisation intracellulaire dans le recrutement leucocytaire, tels que NF $\kappa$ B ou p38 (Lawrence, 2009). Ces deux protéines auraient comme effet d'augmenter l'expression de E-selectine (Jacobsen et al., 2016). Les effets de la phosphorylation de P38 seraient médiés par l'intermédiaire du facteur de transcription ATF2 (Schindler and Baichwal, 1994) qui est lui-même connu comme régulateur de gènes de l'inflammation, de la prolifération et de l'apoptose (Huebner et al., 2019). D'autres publications mettent en lumière ce lien entre NF $\kappa$ B et P38 et l'expression des protéines d'adhésion sur

l'endothélium (Lalor et al., 2007); (Read et al., 1997). En corrélation avec ces données, la phosphorylation de p38 en réponse au LPS et au BMP9 est abrogée dans les cellules ALK1-KO, suggérant que l'inhibition de cette voie de signalisation pourrait contribuer à la relative anergie des cellules ALK1-KO (Figure 15). Cette diminution va dans le même sens que nos précédents résultats sur un rôle de ALK1 dans la réponse immunitaire à des conditions inflammatoires. Cependant il est à noter que NF $\kappa$ B n'est pas influencé peu importe les conditions ou la population de cellules. Cette spécificité pour p38 dans les cellules HUVECS est intéressante car comme nous rapporte (Westra et al., 2005), la signalisation de p38 augmente l'expression de E-selectine, ce qui correspond aux tendances de nos résultats de FACS sur cellules (Figure 13).

D'autres voies de signalisation ont aussi montré un rôle dans l'expression des molécules d'adhésion. Par exemple, des études montrent que la voie de signalisation YAP peut réprimer l'expression de molécules d'adhésion leucocytaires dans des cellules endothéliales (Dirkx et al., 2003); (Park et al., 2021). De plus, la signalisation du VEGF contribue aussi à la répression de l'expression des molécules d'adhésion. Comme des études précédentes ont montré que les signalisations YAP/TAZ et VEGF sont exacerbées dans les cellules endothéliales ALK1-KO (Neto et al., 2018)(Shao et al., 2009), il serait d'intérêt d'étudier la contribution de ces voies de signalisation dans les effets de la signalisation ALK1 et la réponse inflammatoire. Par exemple, il serait intéressant d'utiliser des inhibiteurs de VEGF afin d'observer si dans nos cellules AK1-KO, les phosphorylations de p38 reviennent à la normale. Le principe est le même pour la protéine YAP qui, elle, possède des fonctions dans l'activation endothéliale et dans l'inflammation vasculaire (Lv et al., 2018).

La littérature nous renseigne sur le rôle majeur des protéines d'adhésion sur l'infiltration leucocytaire sur l'endothélium (Weishaupt et al., 2019). La diminution des protéines d'adhésion dans les conditions ALK1-KO suggèrent que ALK1 aurait une incidence sur le recrutement leucocytaire. Nos résultats, réalisés sur les cellules endothéliales de cerveaux de souris et sur des cellules HUVECS, rapportent une diminution de l'accroche des leucocytes sur l'endothélium pour les conditions ALK-KO (Figure 16). Nous observons aussi une synergie entre le LPS et le BMP9. Tous ces résultats concordent avec ce qui a été précédemment rapporté (Appleby et al., 2016), car ils observent la même synergie entre ces deux traitements. Cela pourrait s'expliquer par le

fait que les traitements BMP9 augmentent l'expression du récepteur TLR4 qui interagit avec le LPS (Płóciennikowska et al., 2015). Cependant, il est à noter que cette baisse de recrutement n'est présente que sur les conditions inflammatoires dans les cellules HUVECS (Figure 17), cette différence de comportement entre notre modèle humain et souris pouvant être surprenante. Les expériences sont encore en cours de réalisation mais si la tendance est confirmée cela semble intéressant de comprendre pourquoi la délétion d'ALK1 dans les cellules murines est plus impactant que dans les cellules humaines. Cet effet pourrait être en partie expliqué par le fait qu'un siRNA a été utilisé dans les HUVECS, ce qui pourrait mener à une délétion partielle de ALK1, contrairement aux cellules murines, où ALK1 est inhibé par le système Cre/LOXP, ce qui mènerait à une délétion plus robuste d'ALK1 dans ce système. Enfin il faut aussi prendre en compte que l'expérience murine compile les données d'une seule expérience à la différence de celle sur les HUVECS qui est un regroupement de 3 expériences différentes.

En plus de ce défaut de recrutement leucocytaire, nos tumeurs implantées dans les souris ALK1 $\Delta$ EC possèdent un réseaux vasculaire inefficace et désorganisé. Nos images prises au microscope rapportent une surabondance de vaisseaux sanguins mais une répartition leucocytaire très hétérogène (Figure 18). Nous comprenons avec ces marquages que le réseau vasculaire des tumeurs ALK1-KO joue aussi un rôle important dans l'infiltration des cellules immunitaires dans les tumeurs. Ces résultats concordent en tout point avec les travaux menés par (Viallard et al., 2020) et les travaux de (Bocci et al., 2019) rapportant que les tumeurs sur-exprimant BMP9 ou ayant naturellement plus de ALK1 avaient une meilleure infiltration de cellules immunitaires et une plus grande réponse inflammatoire.

Les défauts d'infiltration leucocytaire se retrouvent aussi dans des souris présentant une délétion hétérozygote de ALK1 dans l'endothélium (ALK1 $\Delta$ EC<sup>+/-</sup>). Nos résultats rapportent une diminution d'infiltration des différentes populations de leucocytes dans les tumeurs implantées chez les souris ALK1 $\Delta$ EC<sup>+/-</sup> (Figure 19). La baisse est significative pour les NK et les neutrophiles avec une très forte tendance pour les macrophages, l'impact de ALK1 ne semble pas se limiter à une seule population de cellules immunitaires. Cependant malgré une tendance à la baisse chez les autres types de cellules immunitaires les résultats sont encore préliminaires et doivent être réalisés une ou plusieurs fois afin de confirmer la tendance. Une fois de plus ces résultats mettent

en valeur l'importance de ALK1 dans le processus de guérison, que ce soit au niveau du recrutement leucocytaire mais aussi au niveau de l'organisation vasculaire. Néanmoins ces résultats ne nous renseignent pas sur le fait que cette baisse de leucocytes est due au nombre de vaisseaux plus important dans les tumeurs ALK<sup>+/-</sup> ou à la baisse d'expression des protéines d'adhésion. Afin de perfectionner ces essais, nous pourrions faire de l'immunohistochimie de ces tumeurs afin de regarder les vaisseaux ainsi que faire des marquages au FACS des protéines d'adhésion pour observer s'il y a des différences. La voie ALK1 offre des opportunités énormes pour de futurs traitements au vu de ces nouvelles fonctions. L'immunothérapie se base sur différentes méthodes, la première étant de bloquer les signaux tumoraux spécifiques afin que les fonctions des cellules immunitaires ne soient plus inhibées au contact des cellules tumorales (Li et al., 2019). La seconde se base sur une stimulation de la réponse immunitaire globale via des traitements utilisant l'interleukine 2 (Wrangle et al., 2018) ou interféron alpha 2b (Kadison and Morton, 2003). Enfin, il existe des thérapies nommées CAR-T qui consistent à modifier génétiquement les cellules immunitaires afin qu'elles puissent directement attaquer les cellules tumorales (Wang et al., 2017b). L'impact de ALK1 sur le recrutement leucocytaire sur l'endothélium offre des pistes prometteuses. Le problème de ces thérapies est de réussir à infiltrer la tumeur en entier; en augmentant, via la voie ALK1, l'expression des protéines d'adhésion, nous pouvons espérer une meilleure infiltration des cellules immunitaires. Le deuxième avantage de BMP9/ALK1 est sa capacité à normaliser les vaisseaux sanguins dans les tumeurs. La normalisation permet de retrouver une structure vasculaire fonctionnelle et organisée, ce qui permet une meilleure diffusion de l'oxygène, nutriments, leucocytes et médicaments dans les tumeurs. Grâce à une surexpression de BMP9 en association à l'immunothérapie ou chimio thérapie, les leucocytes ou les traitements pourraient atteindre toutes l'aire de la tumeur et éliminer les cellules cancéreuses de façon plus efficace.

Nos derniers résultats vont dans le sens de cette dernière théorie puisque l'addition d'une stimulation BMP9 avec un traitement chimio thérapeutique renforce l'efficacité de ce dernier pour réduire la croissance tumorale. L'expérience s'est montrée concluante pour la gencitabine ainsi que la cisplatine. Cependant il serait nécessaire d'essayer avec des traitements ayant des mécanismes d'action différents. L'utilisation de traitements basés sur la surexpression de BMP9

n'est pas encore commercialisée, cependant plusieurs articles font référence à l'utilisation d'inhibiteurs de la voie ALK1 en addition avec des inhibiteurs de VEGF pour réduire la croissance tumorale (Zhou et al., 2013)(Wang et al., 2016). La voie de signalisation BMP9/ALK1 fait l'objet de beaucoup d'interrogation quant à un rôle potentiel dans les traitements anti-tumoraux.

Cette étude met en lumière plusieurs mécanismes encore méconnus du récepteur ALK1. Les fonctions découvertes vont de la normalisation vasculaire à l'augmentation de la réponse immunitaire en passant par la hausse de l'expression des protéines d'adhésion. L'accumulation de connaissances sur les mécanismes d'action par lesquels passe ALK1 permettrait l'élaboration de thérapies basées sur la surexpression de BMP9. Nos résultats vont dans le sens de cette perspective, de nouvelles thérapies agonistes de la voie BMP9/ALK1 pourraient être utilisées en association avec les immunothérapies ou chimio thérapies actuelles afin d'accroître leur efficacité.

## Références bibliographiques

Akira, S., and Takeda, K. (2004). Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* *4*, 499–511.

Akira, S., Uematsu, S., and Takeuchi, O. (2006). Pathogen Recognition and Innate Immunity. *Cell* *124*, 783–801.

Appleby, S.L., Mitrofan, C.-G., Crosby, A., Hoenderdos, K., Lodge, K., Upton, P.D., Yates, C.M., Nash, G.B., Chilvers, E.R., and Morrell, N.W. (2016). Bone Morphogenetic Protein 9 Enhances Lipopolysaccharide-Induced Leukocyte Recruitment to the Vascular Endothelium. *J. Immunol.* *197*, 3302–3314.

Apte, R.S., Chen, D.S., and Ferrara, N. (2019). VEGF in Signaling and Disease: Beyond Discovery and Development. *Cell* *176*, 1248–1264.

Aragon-Sanabria, V., Pohler, S.E., Eswar, V.J., Bierowski, M., Gomez, E.W., and Dong, C. (2017). VE-Cadherin Disassembly and Cell Contractility in the Endothelium are Necessary for Barrier Disruption Induced by Tumor Cells. *Sci. Rep.* *7*, 45835.

Azzi, S., and Gavard, J. (2014). Vaisseaux sanguins et tumeurs ou l'art du dialogue. *médecine/sciences* *30*, 408–414.

Balemans, W., and Van Hul, W. (2002). Extracellular Regulation of BMP Signaling in Vertebrates: A Cocktail of Modulators. *Dev. Biol.* *250*, 231–250.

Bertolini, F., Marighetti, P., Martin-Padura, I., Mancuso, P., Hu-Lowe, D.D., Shaked, Y., and D'Onofrio, A. (2011). Anti-VEGF and beyond: shaping a new generation of anti-angiogenic therapies for cancer. *Drug Discov. Today* *16*, 1052–1060.

Bocci, M., Sjölund, J., Kurzejamska, E., Lindgren, D., Marzouka, N.-A.-D., Bartoschek, M., Höglund, M., and Pietras, K. (2019). Activin receptor-like kinase 1 is associated with immune cell infiltration and regulates CLEC14A transcription in cancer. *Angiogenesis* *22*, 117–131.

Brown, J.M. (2014). Vasculogenesis: a crucial player in the resistance of solid tumours to

radiotherapy. *Br. J. Radiol.* 87.

Cai, J., Pardali, E., Sánchez-Duffhues, G., and Dijke, P. ten (2012). BMP signaling in vascular diseases. *FEBS Lett.* 586, 1993–2002.

Carmeliet, P., and Jain, R.K. (2011). Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature* 473, 298–307.

Caron, G., Duluc, D., Frémaux, I., Jeannin, P., David, C., Gascan, H., and Delneste, Y. (2005). Direct Stimulation of Human T Cells via TLR5 and TLR7/8: Flagellin and R-848 Up-Regulate Proliferation and IFN- $\gamma$  Production by Memory CD4+ T Cells. *J. Immunol.* 175, 1551–1557.

David, L., Mallet, C., Mazerbourg, S., Feige, J.-J., and Bailly, S. (2007). Identification of BMP9 and BMP10 as functional activators of the orphan activin receptor-like kinase 1 (ALK1) in endothelial cells. *Blood* 109, 1953–1961.

Delneste, Y., Beauvillain, C., and Jeannin, P. (2007). Immunité naturelle - Structure et fonction des Toll-like receptors. *médecine/sciences* 23, 67–74.

Derynck, R., and Zhang, Y.E. (2003). Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF- $\beta$  family signalling. *Nature* 425, 577–584.

Detmar, M. (2000). Tumor angiogenesis. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.* 5, 20–23.

ten Dijke, P., Goumans, M.-J., and Pardali, E. (2008). Endoglin in angiogenesis and vascular diseases. *Angiogenesis* 11, 79–89.

Dirkx, A.E.M., Oude Egbrink, M.G.A., Kuijpers, M.J.E., van der Niet, S.T., Heijnen, V.V.T., Bouma-ter Steege, J.C.A., Wagstaff, J., and Griffioen, A.W. (2003). Tumor angiogenesis modulates leukocyte-vessel wall interactions in vivo by reducing endothelial adhesion molecule expression. *Cancer Res.* 63, 2322–2329.

Ferrara, N., and Henzel, W.J. (1989). Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 161, 851–858.



Fitzgerald, K.A., and Kagan, J.C. (2020). Toll-like Receptors and the Control of Immunity. *Cell* 180, 1044–1066.

Gaitantzi, H., Karch, J., Germann, L., Cai, C., Rausch, V., Birgin, E., Rahbari, N., Seitz, T., Hellerbrand, C., König, C., et al. (2020). BMP-9 Modulates the Hepatic Responses to LPS. *Cells* 9, 617.

Gajewski, T.F., Schreiber, H., and Fu, Y.-X. (2013). Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment. *Nat. Immunol.* 14, 1014–1022.

Galon, J., Costes, A., Sanchez-Cabo, F., Kirilovsky, A., Mlecnik, B., Lagorce-Pagès, C., Tosolini, M., Camus, M., Berger, A., Wind, P., et al. (2006). Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* 313, 1960–1964.

Goel, S., Duda, D.G., Xu, L., Munn, L.L., Boucher, Y., Fukumura, D., and Jain, R.K. (2011). Normalization of the Vasculature for Treatment of Cancer and Other Diseases. *Physiol. Rev.* 91, 1071–1121.

Ghosh, S., and Maity, P., (2006). Vascular endothelial growth factor immunoneutralization in combination with cisplatin reduces EAC tumor growth. *Int Immunopharmacol* 6, 1550-1559

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 144, 646–674.

Harrington, L.S., Sainson, R.C.A., Williams, C.K., Taylor, J.M., Shi, W., Li, J.-L., and Harris, A.L. (2008). Regulation of multiple angiogenic pathways by Dll4 and Notch in human umbilical vein endothelial cells. *Microvasc. Res.* 75, 144–154.

Heldin, C.H., Miyazono, K., and ten Dijke, P. (1997). TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* 390, 465–471.

Hoeben, A., Landuyt, B., Highley, M.S., Wildiers, H., Van Oosterom, A.T., and De Bruijn, E.A. (2004). Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. *Pharmacol. Rev.* 56, 549–580.

Huang, Z., Wang, D., Ihida-Stansbury, K., Jones, P.L., and Martin, J.F. (2009). Defective pulmonary vascular remodeling in Smad8 mutant mice. *Hum. Mol. Genet.* 18, 2791–2801.

Huebner, K., Procházka, J., Monteiro, A.C., Mahadevan, V., and Schneider-Stock, R. (2019). The activating transcription factor 2: an influencer of cancer progression. *Mutagenesis* *34*, 375–389.

Iruela-Arispe, M.L., and Davis, G.E. (2009). Cellular and Molecular Mechanisms of Vascular Lumen Formation. *Dev. Cell* *16*, 222–231.

Jacobsen, M.C., Dusart, P.J., Kotowicz, K., Bajaj-Elliott, M., Hart, S.L., Klein, N.J., and Dixon, G.L. (2016). A critical role for ATF2 transcription factor in the regulation of E-selectin expression in response to non-endotoxin components of *Neisseria meningitidis*. *Cell. Microbiol.* *18*, 66–79.

Jain, R.K. (2005). Normalization of Tumor Vasculature: An Emerging Concept in Antiangiogenic Therapy. *Science* *307*, 58–62.

Kadison, A.S., and Morton, D.L. (2003). Immunotherapy of malignant melanoma. *Surg. Clin. North Am.* *83*, 343–370.

Karin, M., and Greten, F.R. (2005). NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nat. Rev. Immunol.* *5*, 749–759.

Kawabata, M., Imamura, T., and Miyazono, K. (1998). Signal transduction by bone morphogenetic proteins. *Cytokine Growth Factor Rev.* *9*, 49–61.

Kim, J.-H., Peacock, M.R., George, S.C., and Hughes, C.C.W. (2012). BMP9 induces EphrinB2 expression in endothelial cells through an Alk1-BMPRII/ActRII-ID1/ID3-dependent pathway: Implications for Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia Type II. *Angiogenesis* *15*, 497–509.

Kodach, L.L., Wiercinska, E., de Miranda, N.F.C.C., Bleuming, S.A., Musler, A.R., Peppelenbosch, M.P., Dekker, E., van den Brink, G.R., van Noesel, C.J.M., Morreau, H., et al. (2008). The bone morphogenetic protein pathway is inactivated in the majority of sporadic colorectal cancers. *Gastroenterology* *134*, 1332–1341.

Komai-Koma, M., Jones, L., Ogg, G.S., Xu, D., and Liew, F.Y. (2004). TLR2 is expressed on activated T cells as a costimulatory receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 3029–3034.

Lalor, P.F., Sun, P.J., Weston, C.J., Martin-Santos, A., Wakelam, M.J.O., and Adams, D.H. (2007). Activation of vascular adhesion protein-1 on liver endothelium results in an NF-κB-dependent

increase in lymphocyte adhesion. *Hepatology* 45, 465–474.

Langenfeld, E.M., and Langenfeld, J. (2004). Bone Morphogenetic Protein-2 Stimulates Angiogenesis in Developing Tumors. NIH K22 grant CA91919-01A1 and UMDNJ Foundation to J. Langenfeld. *Mol. Cancer Res.* 2, 141–149.

Larrivé, B., Prahst, C., Gordon, E., del Toro, R., Mathivet, T., Duarte, A., Simons, M., and Eichmann, A. (2012). ALK1 Signaling Inhibits Angiogenesis by Cooperating with the Notch Pathway. *Dev. Cell* 22, 489–500.

Lawrence, T. (2009). The Nuclear Factor NF- $\kappa$ B Pathway in Inflammation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 1, a001651.

Leblanc, E., Trens, F., Haroun, S., Drouin, G., Bergeron, E., Penton, C.M., Montanaro, F., Roux, S., Fauchoux, N., and Grenier, G. (2011). BMP-9-induced muscle heterotopic ossification requires changes to the skeletal muscle microenvironment. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* 26, 1166–1177.

Leick, M., Azcutia, V., Newton, G., and Luscinskas, F.W. (2014). Leukocyte recruitment in inflammation: basic concepts and new mechanistic insights based on new models and microscopic imaging technologies. *Cell Tissue Res.* 355, 647–656.

Lewis, K.A., Gray, P.C., Blount, A.L., MacConell, L.A., Wiater, E., Bilezikjian, L.M., and Vale, W. (2000). Betaglycan binds inhibin and can mediate functional antagonism of activin signalling. *Nature* 404, 411–414.

Ley, K. (1992). Leukocyte adhesion to vascular endothelium. *J. Reconstr. Microsurg.* 8, 495–503.

Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, M.I., and Nourshargh, S. (2007). Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat. Rev. Immunol.* 7, 678–689.

Li, B., Chan, H.L., and Chen, P. (2019). Immune Checkpoint Inhibitors: Basics and Challenges. *Curr. Med. Chem.* 26, 3009–3025.

Li, W., Salmon, R.M., Jiang, H., and Morrell, N.W. (2016). Regulation of the ALK1 ligands, BMP9 and BMP10. *Biochem. Soc. Trans.* 44, 1135–1141.

Lowery, J.W., and deCaestecker, M.P. (2010). BMP SIGNALING IN VASCULAR DEVELOPMENT AND DISEASE. *Cytokine Growth Factor Rev.* 21, 287–298.

Lowery, J.W., and Rosen, V. (2018). The BMP Pathway and Its Inhibitors in the Skeleton. *Physiol. Rev.* 98, 2431–2452.

Lux, A., Salway, F., Dressman, H.K., Kröner-Lux, G., Hafner, M., Day, P.J.R., Marchuk, D.A., and Garland, J. (2006). ALK1 signalling analysis identifies angiogenesis related genes and reveals disparity between TGF-beta and constitutively active receptor induced gene expression. *BMC Cardiovasc. Disord.* 6, 13.

Lv, Y., Kim, K., Sheng, Y., Cho, J., Qian, Z., Zhao, Y.-Y., Hu, G., Pan, D., Malik, A.B., and Hu, G. (2018). YAP Controls Endothelial Activation and Vascular Inflammation Through TRAF6. *Circ. Res.* 123, 43–56.

Makanya, A.N., Hlushchuk, R., and Djonov, V.G. (2009). Intussusceptive angiogenesis and its role in vascular morphogenesis, patterning, and remodeling. *Angiogenesis* 12, 113–123.

Mantovani, A., Romero, P., Palucka, A.K., and Marincola, F.M. (2008). Tumour immunity: effector response to tumour and role of the microenvironment. *Lancet Lond. Engl.* 371, 771–783.

McDonald, D.M., and Baluk, P. (2005). Imaging of angiogenesis in inflamed airways and tumors: newly formed blood vessels are not alike and may be wildly abnormal: Parker B. Francis lecture. *Chest* 128, 602S-608S.

McDonald, J., Bayrak-Toydemir, P., and Pyeritz, R.E. (2011). Hereditary hemorrhagic telangiectasia: an overview of diagnosis, management, and pathogenesis. *Genet. Med. Off. J. Am. Coll. Med. Genet.* 13, 607–616.

Mitrofan, C.-G., Appleby, S.L., Nash, G.B., Mallat, Z., Chilvers, E.R., Upton, P.D., and Morrell, N.W. (2017). Bone morphogenetic protein 9 (BMP9) and BMP10 enhance tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced monocyte recruitment to the vascular endothelium mainly via activin receptor-like kinase 2. *J. Biol. Chem.* 292, 13714–13726.

Miyazono, K., ten Dijke, P., and Heldin, C.H. (2000). TGF-beta signaling by Smad proteins. *Adv.*

Immunol. 75, 115–157.

Mlecnik, B., Tosolini, M., Kirilovsky, A., Berger, A., Bindea, G., Meatchi, T., Bruneval, P., Trajanoski, Z., Fridman, W.-H., Pagès, F., et al. (2011). Histopathologic-based prognostic factors of colorectal cancers are associated with the state of the local immune reaction. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 29, 610–618.

Moya, I.M., Umans, L., Maas, E., Pereira, P.N.G., Beets, K., Francis, A., Sents, W., Robertson, E.J., Mummery, C.L., Huylebroeck, D., et al. (2012). Stalk cell phenotype depends on integration of Notch and Smad1/5 signaling cascades. *Dev. Cell* 22, 501–514.

Mpekris, F., Voutouri, C., Baish, J.W., Duda, D.G., Munn, L.L., Stylianopoulos, T., and Jain, R.K. (2020). Combining microenvironment normalization strategies to improve cancer immunotherapy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 117, 3728–3737.

Murakami, G., Watabe, T., Takaoka, K., Miyazono, K., and Imamura, T. (2003). Cooperative Inhibition of Bone Morphogenetic Protein Signaling by Smurf1 and Inhibitory Smads. *Mol. Biol. Cell* 14, 2809–2817.

Nakagawa, Y., Ikeda, K., Akakabe, Y., Koide, M., Uraoka, M., Yutaka, K.-T., Kurimoto-Nakano, R., Takahashi, T., Matoba, S., Yamada, H., et al. (2010). Paracrine osteogenic signals via bone morphogenetic protein-2 accelerate the atherosclerotic intimal calcification in vivo. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 30, 1908–1915.

Neto, F., Klaus-Bergmann, A., Ong, Y.T., Alt, S., Vion, A.-C., Szymborska, A., Carvalho, J.R., Hollfinger, I., Bartels-Klein, E., Franco, C.A., et al. (2018). YAP and TAZ regulate adherens junction dynamics and endothelial cell distribution during vascular development. *ELife* 7, e31037.

Neufeld, G., Cohen, T., Shraga, N., Lange, T., Kessler, O., and Herzog, Y. (2002). The Neuropilins: Multifunctional Semaphorin and VEGF Receptors that Modulate Axon Guidance and Angiogenesis. *Trends Cardiovasc. Med.* 12, 13–19.

Nourshargh, S., and Alon, R. (2014). Leukocyte Migration into Inflamed Tissues. *Immunity* 41, 694–707.

Ntumba, K., Akla, N., Oh, S.P., Eichmann, A., and Larrivéé, B. (2016). BMP9/ALK1 inhibits neovascularization in mouse models of age-related macular degeneration. *Oncotarget* 7, 55957–55969.

Ohm, J.E., Gabrilovich, D.I., Sempowski, G.D., Kisseleva, E., Parman, K.S., Nadaf, S., and Carbone, D.P. (2003). VEGF inhibits T-cell development and may contribute to tumor-induced immune suppression. *Blood* 101, 4878–4886.

Orkin, S.H., and Zon, L.I. (2008). Hematopoiesis: An Evolving Paradigm for Stem Cell Biology. *Cell* 132, 631–644.

Pàez-Ribes, M., Allen, E., Hudock, J., Takeda, T., Okuyama, H., Viñals, F., Inoue, M., Bergers, G., Hanahan, D., and Casanovas, O. (2009). Antiangiogenic Therapy Elicits Malignant Progression of Tumors to Increased Local Invasion and Distant Metastasis. *Cancer Cell* 15, 220–231.

Pardali, E., and ten Dijke, P. (2012). TGF $\beta$  Signaling and Cardiovascular Diseases. *Int. J. Biol. Sci.* 8, 195–213.

Park, H., Furtado, J., Poulet, M., Chung, M., Yun, S., Lee, S., Sessa, W.C., Franco, C.A., Schwartz, M.A., and Eichmann, A. (2021). Defective Flow-Migration Coupling Causes Arteriovenous Malformations in Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia. *Circulation* 0.

Pereira, S.S., Oliveira, S., Monteiro, M.P., and Pignatelli, D. (2021). Angiogenesis in the Normal Adrenal Fetal Cortex and Adrenocortical Tumors. *Cancers* 13.

Phng, L.-K., Stanchi, F., and Gerhardt, H. (2013). Filopodia are dispensable for endothelial tip cell guidance. *Dev. Camb. Engl.* 140, 4031–4040.

Płóciennikowska, A., Hromada-Judycka, A., Borzęcka, K., and Kwiatkowska, K. (2015). Co-operation of TLR4 and raft proteins in LPS-induced pro-inflammatory signaling. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 72, 557–581.

Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M.Y., Van Huffel, C., Du, X., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Galanos, C., et al. (1998). Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 282, 2085–2088.

Ratner, M. (2004). Genentech discloses safety concerns over Avastin. *Nat. Biotechnol.* 22, 1198.

Read, M.A., Whitley, M.Z., Gupta, S., Pierce, J.W., Best, J., Davis, R.J., and Collins, T. (1997). Tumor necrosis factor alpha-induced E-selectin expression is activated by the nuclear factor-kappaB and c-JUN N-terminal kinase/p38 mitogen-activated protein kinase pathways. *J. Biol. Chem.* 272, 2753–2761.

Ricard, N., Bidart, M., Mallet, C., Lesca, G., Giraud, S., Prudent, R., Feige, J.-J., and Bailly, S. (2010). Functional analysis of the BMP9 response of ALK1 mutants from HHT2 patients: a diagnostic tool for novel ACVRL1 mutations. *Blood* 116, 1604–1612.

Ricci-Vitiani, L., Pallini, R., Biffoni, M., Todaro, M., Invernici, G., Cenci, T., Maira, G., Parati, E.A., Stassi, G., Larocca, L.M., et al. (2010). Tumour vascularization via endothelial differentiation of glioblastoma stem-like cells. *Nature* 468, 824–828.

Roman, B.L., and Hinck, A.P. (2017). ALK1 signaling in development and disease: new paradigms. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 74, 4539–4560.

Rosenzweig, B.L., Imamura, T., Okadome, T., Cox, G.N., Yamashita, H., ten Dijke, P., Heldin, C.H., and Miyazono, K. (1995). Cloning and characterization of a human type II receptor for bone morphogenetic proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 7632–7636.

Rudini, N., Felici, A., Giampietro, C., Lampugnani, M., Corada, M., Swirsding, K., Garrè, M., Liebner, S., Letarte, M., ten Dijke, P., et al. (2008). VE-cadherin is a critical endothelial regulator of TGF- $\beta$  signalling. *EMBO J.* 27, 993–1004.

Ruiz, S., Zhao, H., Chandakkar, P., Chatterjee, P.K., Papoin, J., Blanc, L., Metz, C.N., Campagne, F., and Marambaud, P. (2016). A mouse model of hereditary hemorrhagic telangiectasia generated by transmammary-delivered immunoblocking of BMP9 and BMP10. *Sci. Rep.* 5, 37366.

Ruiz de Almodovar, C., Lambrechts, D., Mazzone, M., and Carmeliet, P. (2009). Role and Therapeutic Potential of VEGF in the Nervous System. *Physiol. Rev.* 89, 607–648.

Scharpfenecker, M., van Dinther, M., Liu, Z., van Bezooijen, R.L., Zhao, Q., Pukac, L., Löwik, C.W.G.M., and ten Dijke, P. (2007). BMP-9 signals via ALK1 and inhibits bFGF-induced endothelial

cell proliferation and VEGF-stimulated angiogenesis. *J. Cell Sci.* *120*, 964–972.

Schindler, U., and Baichwal, V.R. (1994). Three NF-kappa B binding sites in the human E-selectin gene required for maximal tumor necrosis factor alpha-induced expression. *Mol. Cell. Biol.* *14*, 5820–5831.

Senger, D.R., Galli, S.J., Dvorak, A.M., Perruzzi, C.A., Harvey, V.S., and Dvorak, H.F. (1983). Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* *219*, 983–985.

Shao, E.S., Lin, L., Yao, Y., and Boström, K.I. (2009). Expression of vascular endothelial growth factor is coordinately regulated by the activin-like kinase receptors 1 and 5 in endothelial cells. *Blood* *114*, 2197–2206.

Siemerink, M.J., Klaassen, I., Van Noorden, C.J.F., and Schlingemann, R.O. (2013). Endothelial Tip Cells in Ocular Angiogenesis: Potential Target for Anti-Angiogenesis Therapy. *J. Histochem. Cytochem.* *61*, 101–115.

Sitkovsky, M.V., Kjaergaard, J., Lukashev, D., and Ohta, A. (2008). Hypoxia-adenosinergic immunosuppression: tumor protection by T regulatory cells and cancerous tissue hypoxia. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *14*, 5947–5952.

Treps, L., and Gavard, J. (2015). L'angiogenèse tumorale: Quand l'arbre de vie tourne mal. *Médecine/Sciences* *31*, 989–995.

Urness, L.D., Sorensen, L.K., and Li, D.Y. (2000). Arteriovenous malformations in mice lacking activin receptor-like kinase-1. *Nat. Genet.* *26*, 328–331.

Viallard, C., and Larrivé, B. (2017). Tumor angiogenesis and vascular normalization: alternative therapeutic targets. *Angiogenesis* *20*, 409–426.

Viallard, C., Audiger, C., Popovic, N., Akla, N., Lanthier, K., Legault-Navarrete, I., Melichar, H., Costantino, S., Lesage, S., and Larrivé, B. (2020). BMP9 signaling promotes the normalization of tumor blood vessels. *Oncogene* *39*, 2996–3014.

Wang, X., Solban, N., Khanna, P., Callea, M., Song, J., Alsop, D.C., Pearsall, R.S., Atkins, M.B., Mier,



J.W., Signoretti, S., et al. (2016). Inhibition of ALK1 signaling with dalantercept combined with VEGFR TKI leads to tumor stasis in renal cell carcinoma. *Oncotarget* 7, 41857–41869.

Wang, X., Huang, J., Huang, F., Zong, J.-C., Tang, X., Liu, Y., Zhang, Q.-F., Wang, Y., Chen, L., Yin, L.-J., et al. (2017a). Bone morphogenetic protein 9 stimulates callus formation in osteoporotic rats during fracture healing. *Mol. Med. Rep.* 15, 2537–2545.

Wang, Z., Wu, Z., Liu, Y., and Han, W. (2017b). New development in CAR-T cell therapy. *J. Hematol. Oncol.* *J Hematol Oncol* 10, 53.

Wechman, S.L., Emdad, L., Sarkar, D., Das, S.K., and Fisher, P.B. (2020). Vascular mimicry: Triggers, molecular interactions and in vivo models. *Adv. Cancer Res.* 148, 27–67.

Weishaupt, C., Steinert, M., Brunner, G., Schulze, H.-J., Fuhlbrigge, R.C., Goerge, T., and Loser, K. (2019). Activation of human vascular endothelium in melanoma metastases induces ICAM-1 and E-selectin expression and results in increased infiltration with effector lymphocytes. *Exp. Dermatol.* 28, 1258–1269.

Westra, J., Kułdo, J.M., van Rijswijk, M.H., Molema, G., and Limburg, P.C. (2005). Chemokine production and E-selectin expression in activated endothelial cells are inhibited by p38 MAPK (mitogen activated protein kinase) inhibitor RWJ 67657. *Int. Immunopharmacol.* 5, 1259–1269.

Wozney, J.M., Rosen, V., Celeste, A.J., Mitsock, L.M., Whitters, M.J., Kriz, R.W., Hewick, R.M., and Wang, E.A. (1988). Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science* 242, 1528–1534.

Wrangle, J.M., Patterson, A., Johnson, C.B., Neitzke, D.J., Mehrotra, S., Denlinger, C.E., Paulos, C.M., Li, Z., Cole, D.J., and Rubinstein, M.P. (2018). IL-2 and Beyond in Cancer Immunotherapy. *J. Interferon Cytokine Res. Off. J. Int. Soc. Interferon Cytokine Res.* 38, 45–68.

Zarbock, A., Ley, K., McEver, R.P., and Hidalgo, A. (2011). Leukocyte ligands for endothelial selectins: specialized glycoconjugates that mediate rolling and signaling under flow. *Blood* 118, 6743–6751.

Zhang, Y.E. (2009). Non-Smad pathways in TGF- $\beta$  signaling. *Cell Res.* 19, 128–139.

Zhou, S., Yang, Y., Yang, Y., Tao, H., Li, D., Zhang, J., Jiang, G., and Fang, J. (2013). Combination Therapy of VEGF-Trap and Gemcitabine Results in Improved Anti-Tumor Efficacy in a Mouse Lung Cancer Model. *PLoS ONE* 8, e68589.