



HAL
open science

Caractérisation du rôle du récepteur Frizzled7 dans l'intégrité vasculaire et l'angiogenèse

Claire Peghaire

► **To cite this version:**

Claire Peghaire. Caractérisation du rôle du récepteur Frizzled7 dans l'intégrité vasculaire et l'angiogenèse. Biologie cellulaire. Université de Bordeaux, 2014. Français. NNT : 2014BORD0288 . tel-01144347

HAL Id: tel-01144347

<https://theses.hal.science/tel-01144347>

Submitted on 21 Apr 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE PRÉSENTÉE
POUR OBTENIR LE GRADE DE
DOCTEUR DE
L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

ECOLE DOCTORALE Sciences de la vie et de la santé
SPECIALITE Biologie Cellulaire et Physiopathologie

Par Claire PEGHAIRE

**Caractérisation du rôle du récepteur Frizzled7 dans
l'intégrité vasculaire et l'angiogenèse**

Sous la direction de: Pr. Pascale DUFOURCQ

Soutenue le 17 décembre 2014

Membres du Jury

Pr. Marie-Noëlle DELYFER ; PU-PH ; CHU Bordeaux, Hôpital Pellegrin

Dr. Virginie MATTOT ; CR ; Institut de Biologie de Lille, CNRS

Dr. Isabelle VILGRAIN ; DR ; iRTSV/BCI CEA Grenoble, CNRS

Président

Rapporteur

Rapporteur

Remerciements

J'aimerais tout d'abord remercier ma directrice de thèse, le Pr. Pascale Dufourcq, pour son encadrement, sa patience, sa pédagogie, ses précieux conseils et la confiance qu'elle a su m'accorder tout au long de ces années.

Je remercie notre directeur, le Pr. Thierry Couffinhal, ainsi que notre chef d'équipe, le Dr. Cécile Duplâa, pour leur soutien et leur encadrement.

Je remercie les membres de mon jury, le Pr. Marie-Noëlle Delyfer, le Dr. Virginie Mattot et le Dr. Isabelle Vilgrain, d'avoir accepté de juger mon travail, pour leurs précieux conseils et leurs remarques pertinentes.

Je remercie l'ensemble de l'unité INSERM 1034 pour leur accueil chaleureux et le cadre de travail très agréable qu'ils m'ont apporté au cours de ma thèse. Je remercie plus particulièrement mes acolytes doctorants, Raj et Nathalie, « mon binôme » Marie Lise, mes anciens collègues post-docs Frédéric et Aude, ainsi que Jérôme, Marie-Ange, Christelle, Catherine, Sylvie, Béatrice, Anabelle et Myriam pour leur bonne humeur, leur motivation, leur aide précieuse, nos grandes discussions scientifiques, nos fous rires, leur soutien dans les moments de doutes et pour tous les bons moments que nous avons partagé.

Je remercie ma famille pour leur soutien depuis tant d'années même s'ils n'ont jamais vraiment bien compris mon sujet de recherche! Enfin, je remercie Nicolas, mon soutien inconditionnel et sans faille, sans qui je n'aurais pas réussi à aller jusqu'au bout de ce travail.

Sommaire

Abréviations	11
Préface	15
Introduction	19
Partie 1: Angiogenèse	21
I. Présentation générale	21
II. Mécanismes cellulaires et moléculaires de la morphogenèse vasculaire	22
A. La vasculogenèse	22
B. L'angiogenèse	23
1) Généralités	23
2) Vasodilatation, perméabilité vasculaire et dégradation de la matrice extracellulaire	24
3) Prolifération et migration des cellules endothéliales	25
4) «Sprouting», «tip cell», «stalk cells»	26
5) Formation des tubes endothéliaux	29
6) Maturation des vaisseaux.....	30
III. Développement vasculaire de la rétine	31
A. Présentation générale	31
B. Vascularisation de la rétine chez l'homme et la souris	32
1) Cinétique de développement vasculaire chez l'homme	33
2) Cinétique de développement vasculaire chez la souris	34
C. Régulation du développement vasculaire rétinien chez la souris.....	35
1) Régulation au niveau cellulaire	35
a) Rôle des astrocytes.....	35
b) Rôle des macrophages.....	35
c) Rôle des cellules murales	36
2) Régulation au niveau moléculaire	36
a) Le VEGF (Vascular endothelial growth factor)	36
b) Voie Dll4/Notch	37
c) Voies Wnt/Frizzled	38
d) Autres mécanismes de régulation.....	38
IV. Pathologies vasculaires de la rétine chez l'homme: rétinopathies	40
A. Rétinopathie chez le prématuré.....	40
1) Physiopathologie	40

2) Traitements	43
B. Rétinopathie diabétique.....	44
1) Physiopathologie	44
2) Traitements	46
Partie 2: Le système Wnt/Frizzled	48
I. Structure et fonctions des ligands Wnt, des récepteurs Fzd et des partenaires Dishevelled	48
A. Structure.....	48
B. Fonctions	52
II. Voies Wnt/Frizzled.....	53
A. Voie Wnt canonique	53
B. Voies Wnt non canoniques.....	55
1) La voie de la polarité cellulaire planaire.....	57
2) La voie dépendante du calcium.....	57
III. Autres co-récepteurs et ligands des voies Wnt/Fzd	58
A. Co-récepteurs Lrp5/6	58
B. Autres ligands modulateurs des voies Wnt/Fzd.....	58
IV. Rôle de la signalisation Wnt/Fzd dans le développement vasculaire	59
A. Expression et signalisation Wnt/Fzd dans les cellules endothéliales.....	59
B. Développement placentaire.....	61
C. Vascularisation du cerveau.....	61
D. Angiogenèse post-natale de la rétine	62
E. Convergence des voies Wnt canonique et Notch au cours de l'angiogenèse.....	65
F. Pathologies vasculaires oculaires	67
1) Rétinopathie induite par l'oxygène (OIR).....	67
2) Néovascularisation de la choroïde	68
V. Lien entre la β-caténine et les cadhérines: les jonctions adhérentes	69
A. Généralités	69
B. La VE-cadhérine.....	70
1) Structure de la VE-cadhérine.....	70
2) Fonctions de la VE-cadhérine	71
3) Régulation des jonctions cellulaires	72
4) Lien entre la voie canonique et la VE-cadhérine.....	73
VI. Frizzled-7	74
A. Expression de Fzd7	74

1) Chez la souris.....	74
2) Chez l'homme.....	75
B. Rôles de Fzd7.....	75
1) Développement.....	75
a) Xénope.....	76
b) Poisson zèbre.....	76
c) Poulet	77
d) Souris.....	77
2) Cellules souches	78
3) Cancers	78
Matériel et méthodes.....	81
I. Analyses <i>in vivo</i>.....	83
A. Génération et caractérisation des souris délétées pour <i>fzd7</i> spécifiquement dans les cellules endothéliales.....	83
B. Souris délétées pour Dishevelled 1 (DVL1 ^{-/-})	86
C. Procédures chez l'animal.....	87
D. Injections intra-vitréenne et traitements chez la souris	87
E. Test de perméabilité <i>in vivo</i> : test de Miles	87
F. Modèle d'irritation chronique de la peau	88
G. Modèle de rétinopathie induite par l'oxygène (OIR)	88
H. Immunohistologie	88
I. Analyse des rétines de souris	89
1) Analyse de l'angiogenèse physiologique.....	89
2) Analyse de l'angiogenèse pathologique après OIR	90
II. Analyse <i>in vitro</i>.....	90
A. Isolement des cellules endothéliales primaires à partir des poumons de souris	90
B. Culture cellulaire, transfection et traitements.....	90
C. Essais de migration et de sprouting en 3D sur des cellules endothéliales.....	91
D. Test de perméabilité des cellules endothéliales	92
E. Test d'activation de la voie canonique.....	92
F. Immunomarquages sur cellules	93
G. Préparation des protéines et Western blot.....	93
H. Immunoprécipitation des protéines.....	94
I. Constructions: plasmides et lentivirus	94

J. Préparation des ARN et qPCR.....	95
K. Analyse statistique	96
Résultats	97
Partie 1: Frizzled7 contrôle la perméabilité vasculaire <i>via</i> la voie de signalisation Wnt/canonique et une interaction avec les complexes des jonctions cellulaires endothéliales	99
I. Contexte scientifique.....	99
II. Objectif de l'étude	100
III. Stratégie	100
IV. Résultats.....	101
V. Discussion.....	101
Partie 2: Frizzled7 contrôle l'angiogenèse post-natale <i>via</i> la voie Wnt/β caténine canonique de manière dépendante et indépendante de la voie Dll4/Notch	105
I. Contexte scientifique.....	105
II. Objectif de l'étude	106
III. Stratégie	106
IV. Résultats.....	106
A. Expression et localisation du récepteur Frizzled7 dans la rétine chez la souris.....	106
B. Fzd7 contrôle l'angiogenèse post-natale de la rétine chez la souris.....	109
1) Analyse du phénotype vasculaire rétinien pour la lignée Tie2-Cre.....	109
2) Analyse du phénotype vasculaire rétinien pour la lignée PDGFb-iCre.....	111
a) Retard de formation du plexus vasculaire primaire et profond dans les rétines de souris <i>fzd7^{IECKO}</i>	111
b) Altération du phénotype des tip cells dans les rétines de souris <i>fzd7^{IECKO}</i> à P7	113
c) Analyse du phénotype des rétines de souris <i>fzd7^{IECKO}</i> au niveau de plexus vasculaire... ..	115
i. Altération de la prolifération dans les rétines de souris <i>fzd7^{IECKO}</i> à P7	115
ii. Absence de modification de la régression dans les rétines de souris <i>fzd7^{IECKO}</i>	115
iii. Altération de la densité vasculaire dans les rétines de souris <i>fzd7^{IECKO}</i> à P7	116
iv. Absence de modification de la maturation dans les rétines de souris <i>fzd7^{IECKO}</i>	117
C. La délétion de DVL1 et la diminution d'expression de DVL1 et 3 miment le phénotype vasculaire observé dans les rétines de souris <i>fzd7^{IECKO}</i>	119
D. La délétion de <i>fzd7</i> dans les CE et de DVL1/3 induit une diminution des voies de signalisation Wnt canonique et Notch	122
1) La délétion de <i>fzd7</i> dans les CE et de DVL1/3 entraîne une diminution de la voie Wnt canonique.....	122

2) La délétion de <i>fzd7</i> dans les CE et de DVL1/3 entraîne une diminution de la voie Notch ..	124
3) Autres de voies de signalisation investiguées non altérées	126
a) Voie du VEGF	126
b) Voie Norrin/Fzd4/Lrp5.....	127
E. L'activation de la voie Wnt canonique reverse totalement le phénotype vasculaire des souris <i>fzd7^{ECKO}</i> tandis que l'activation de la voie Notch ne le restore que partiellement.....	128
F. Fzd7 contrôle la voie Notch <i>via</i> l'activité transcriptionnelle de la β -caténine.....	131
G. La délétion de Fzd7 affecte la sélection des tip cells	133
H. Fzd7 contrôle la migration des CE <i>via</i> la voie Wnt-canonique mais indépendamment de la voie Notch	134
V. Discussion	137
Partie 3: Etude du rôle de Frizzled7 au cours de l'angiogenèse pathologique dans un modèle murin de rétinopathie induite par l'oxygène (OIR)	143
I. Contexte scientifique	143
II. Objectif de l'étude	144
III. Stratégie	144
VI. Résultats	147
A. Effets de la délétion de <i>fzd7</i> dans les CE sur l'angiogenèse pathologique dans le modèle d'OIR pour la lignée Tie2-Cre	147
1) Impact de la délétion de <i>fzd7</i> sur la vaso-oblitération à P12.....	147
2) Impact de la délétion de <i>fzd7</i> sur la réponse vasculaire à P14 et P17	148
3) Altération des voies de signalisation Wnt canonique et Notch dans les rétines de souris <i>fzd7^{ECKO}</i> au cours de la néovascularisation	153
B. Effets de la délétion de <i>fzd7</i> dans les CE sur l'angiogenèse pathologique dans le modèle d'OIR pour la lignée PDGFb-iCre	155
1) Impact de la délétion de <i>fzd7</i> sur la vaso-oblitération à P12.....	155
2) Impact de la délétion de <i>fzd7</i> sur la réponse vasculaire à P14 et P17	156
3) Impact de la délétion de <i>fzd7</i> spécifiquement sur la néovascularisation	157
VII. Discussion	158
Conclusion générale et perspectives	163
Conclusion générale	165
Perspectives	167
Annexes	171
Références bibliographiques	177
Publications	203

Abréviations

aa: acides aminés

ADN: Acide DésoxyriboNucléique

AKT/PKB: Proteine Kinase B

ALK: Activin receptor-Like Kinase

α SMA: alpha Smooth Muscle Actin

AGE: Advanced glycation end-products, produits de glycation avancée

Ang: Angiopoïétine

APC: Adenomatous Poliposis Coli

ARN: Acide RiboNucléique

BMP: Bone Morphogenic Proteins

BrdU; BromoDésoxyUridine

CaMKII: Calcium Calmoduline Kinase II

CD18: Integrin beta-2

CD31: Cluster of Differentiation 31

CE: Cellule Endothéliale

CBD: Catenin binding domain

CHO: Chinese Hamster Ovary cells

CK1: Casein kinase 1

CML: Cellule Musculaire Lisse

CRD: Cystein Rich Domain

BSA: Bovine Serum Albumine

DAAM: Dishevelled-associated activator of morphogenesis

DAB: Diaminobenzidine

DAG: Diacylglycérol

DEP: Dishevelled, EGL-10, Pleckstrin

DIX: Dishevelled/Axin

Dkk: Dickkopf

Dll: Delta-like ligand

Dvl/DVL: Dishevelled

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DMLA: Dégénéresence maculaire liée à l'âge

dpc: days post-coitum

JNK: Jun NH2-terminal Kinase

EA.hy926: Human Umbilical Vein Endothelial Cell
E-cadherin: Epithelial cadherin
Egfl7: Epidermal Growth Factor like domain 7 ou Vascular Endothelial-statin (VE-statin)
eNOS: endothelial Nitric Oxide Synthase
EPO: Erythropoïétine
ERK: Extracellular signal-Regulated Kinase
FasL: Fas ligand ou CD95L
FEVR: Vitréorétinopathie exsudative familiale
FGF2 ou bFGF: basic Fibrosblast Growth Factor
FGFR: Fibrosblast Growth Factor Receptor
FITC: Fluorescein IsoThioCyanate
Fzd: Frizzled
GFP: Green Fluorescent Protein
GSK-3 β : Glycogene Synthase Kinase 3 beta
HIF: Hypoxia Inducible Factor
HMVEC: Human Microvascular Endothelial Cell
HRE: Hypoxia Response Elements
HSC: Hematopoïetic Stem Cell
HUVEC: Human Umbilical Vein Endothelial Cell
ICAM intracellular adhesion molecule
IGF-1: Insuline-like Growth Factor-1
IL: Inter Leukin
iNOS: inducible Nitric Oxide Synthase
JMD: Juxta membrane domain
JNK: Jun NH2-terminal Kinase
KDa: KiloDalton
KI: Knock-In
KO: Knock-Out
LEF: Lymphoid Enhancer-binding Factor
LiCl: Chlorure de Lithium
Lrp5/6: Lipoprotein Receptor-related Protein 5/6
MAPK: Mitogen Activated Protein Kinases
MB: membrane basale
MCP-1: Monocyte Chemotactic Protein-1
MEC: Matrice Extracellulaire
MEF: Murin embryonic fibroblast

MHC: Myosin Heavy Chain
MMP: Matrix Metalloproteinase
MMTV: Mouse Mammary Tumor Virus
MS1: Mile Sven 1, cellules endothéliales murines
N-cadherin: Neuronal cadherin
NFAT: Nuclear Factor of T Cells)
NF-κB: Nuclear Factor-κB
NG2: Neural-Glial antigen 2
NICD: Notch IntraCellular Domain
NO: Monoxyde d'azote
Norrin: Norrie disease protein ou X-linked exudative vitreoretinopathy 2 protein (EVR2)
Nrarp: Notch-regulated ankyrin repeat protein
NRP1: Neuropiline 1
NTR: Netrin like domaine
NV : Néovascularisation
OIR : Oxygen induced retinopathy, rétinopathie induite par l'oxygène
P/PN: post-natal
PCP: Planar Cell Polarity
PBS: Phosphate Buffer Saline
PCR: Polymerase Chain Reaction
PDE: Phosphodiesterase
PDGF: Platelet-Derived Growth Factor
PDGFR: Platelet-Derived Growth Factor Receptor
PDZ: PSD-95, DLG, ZO1
PECAM-1: Platelet endothelial cell adhesion molecule-1
PI3K: Phosphoinositol-3 Kinase
PKC: Protein Kinase C
PLC: Phospholipase C
Plvap: plasmalemma vesicle associated protein
PIGF: Placental Growth Factor
RBP-J: Recombining binding protein suppressor of hairless
RDP: Rétinopathie diabétique proliférante
RDNP: Rétinopathie diabétique non proliférante
RP: Rétinopathie du prématuré
ROCK: Rho-associated kinase
ROS: Reactive oxygen species

Rspo: R-spondin

RT-PCR: Retro Transcription Polymerase Chain Reaction

SDS: Sodium Dodécyl Sulfate

Sema3E: Semaphorin 3E

sFRP: secreted Frizzled Related Protein

Shh: Sonic hedgehog

siRNA: short interfering RNA

SVF: Sérum de Veau Fœtal

TCF: T-Cell Factor

TGF- β : Transforming Growth Factor beta

TNF- α : Tumor Necrosis Factor- α

VCAM: Vascular Endothelial Cell Adhesion Molecule

VE-cadhérine: Vascular Endothelial-cadhérine

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

VEGFR1: Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1 (Flt-1)

VEGFR2: Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2 (KDR ou Flk-1)

VEGFR3: Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-3 (Flt-4)

VO: Vaso-oblitération

WIF: Wnt Inhibitory Factor

293 TG: Cellules épithéliales embryonnaires murines

Préface

Le fonctionnement normal d'un tissu dépend de ses capacités à être pourvu en oxygène à partir des vaisseaux sanguins. L'ischémie tissulaire (diminution de l'apport en oxygène aux tissus) est une circonstance fréquente en pathologie humaine, qu'il s'agisse du muscle cardiaque (angine de poitrine, infarctus), du cerveau ou du muscle squelettique. L'apparition d'une hypo-perfusion dans un territoire musculaire induit le développement de nouveaux vaisseaux et d'une circulation collatérale qui a pour finalité de réduire l'ischémie musculaire. Ce développement est souvent insuffisant et la persistance de cette ischémie entraîne une limitation de la capacité fonctionnelle ainsi qu'une altération du pronostic vital. Les projets de recherche de l'unité INSERM 1034 s'inscrivent dans un effort de meilleure compréhension des voies mises en jeu pour protéger le muscle de l'ischémie soit en favorisant la formation et la stabilisation du vaisseau, soit en protégeant la cellule.

Définir les mécanismes cellulaires et moléculaires régulant la formation des vaisseaux et développer de nouvelles cibles thérapeutiques angiogéniques sont les axes prioritaires pour prévenir l'ischémie tissulaire. Pendant le développement ou la régénération tissulaire, la croissance vasculaire est un phénomène complexe qui peut être schématiquement divisé en deux processus dynamiques. Tout d'abord, un plexus vasculaire instable se développe avec l'expansion des vaisseaux: bourgeonnement, prolifération et migration des cellules endothéliales. Puis le système vasculaire néoformé est rapidement remodelé pour permettre sa transition vers un état stable et parfaitement fonctionnel. L'évolution vers un système vasculaire structuré se caractérise par la formation d'un réseau tubulaire branché et organisé.

Au cours de ces dernières années, plusieurs études ont montré que les voies Wnt/Fzd sont directement impliquées dans le développement des vaisseaux sanguins en contrôlant la prolifération, la polarité, l'apoptose des cellules endothéliales (CE) et le branchement vasculaire. Les morphogènes Wnt sécrétés (19 membres) activent des voies de signalisation canoniques et non canoniques en se liant aux récepteurs Fzd (10 homologues).

Les mutations de plusieurs acteurs moléculaires des voies Wnt/Fzd tels que Norrin (Ndp), Frizzled4 (Fzd4) ou Lrp5 ont été liées à des pathologies oculaires comme la vitréorétinopathie exsudative familiale (FEVR) ou la maladie de Norrie. Les souris délétées pour Ndp, Fzd4 et Lrp5 présentent une atteinte du développement du plexus vasculaire rétinien superficiel. Ces données ont permis de démontrer le rôle de ces partenaires des voies Wnt dans la formation du réseau vasculaire rétinien.

Cependant, nous n'avons encore qu'une connaissance partielle de l'implication de ce système dans la physiologie et la pathologie vasculaire. Notre équipe a entrepris un criblage des récepteurs

Fzd jouant un rôle dans la morphogenèse des cellules vasculaires et a identifié le récepteur Fzd7 comme un nouvel acteur majeur.

Les données de la littérature montrent que Fzd7 joue un rôle critique au cours du développement embryonnaire, mais aussi en pathologie dans le développement de certains cancers. Cependant il n'existe pas de donnée sur le rôle de Fzd7 dans la physiologie vasculaire et l'angiogenèse.

Au début de ma thèse, j'ai participé à un premier projet qui a permis de montrer le rôle important de Fzd7 dans le contrôle de la perméabilité vasculaire, in vitro et in vivo, via la voie Wnt canonique et les complexes jonctionnels dépendants de la VE-cadhérine des cellules endothéliales.

L'objectif de ma thèse a été de poursuivre l'exploration des mécanismes cellulaires et moléculaires induits par les récepteurs Frizzled dans les cellules vasculaires et j'ai focalisé mon projet de thèse sur l'étude du récepteur Fzd7 et son rôle dans l'angiogenèse.

Pour cela, j'ai tout d'abord développé dans le laboratoire le modèle d'étude de la vascularisation post-natale de la rétine chez la souris. Afin d'étudier le rôle de fzd7 dans ces processus complexes, nous avons généré une deuxième lignée de souris transgénique qui permet une délétion inductible et spécifique de fzd7 dans l'endothélium. Nos données indiquent que la délétion spécifique de fzd7 dans les cellules endothéliales (CE) in vivo ($fzd7^{iECKO}$) ou la délétion de Dishevelled1 (souris DVL1-/-), un partenaire de fzd7, entraînent un retard de formation du plexus vasculaire primaire de la rétine associé à une augmentation du nombre de «tip cells» et de filopodes ainsi qu'une diminution de la prolifération des «stalk cells». Ce phénotype est associé à une forte diminution de l'expression des gènes cibles de la voie β -caténine dite voie canonique. L'activation pharmacologique de la voie β -caténine, chez ces souris mutantes entraîne la réversion totale de ces effets, suggérant que fzd7 et DVL1 activent la voie de signalisation Wnt/ β -caténine pour réguler l'angiogenèse.

Au cours de ma thèse, différentes études ont montré qu'il existe un lien entre la β -caténine et la voie Notch. J'ai donc par la suite, cherché à définir le rôle de Fzd7 dans la régulation de la voie Notch au cours de l'angiogenèse. La délétion ou la déplétion de fzd7 dans les CE entraînent une forte diminution de l'expression des gènes de la voie Notch in vivo et in vitro, qui est complètement restaurée après activation pharmacologique ou génique de la voie β -caténine. De façon très intéressante, l'activation de la voie Notch par injection intraoculaire de Dll4 dans les souris $fzd7^{iECKO}$ induit une réversion partielle du phénotype observé. Le nombre de «tip cells» et de filopodes est restauré, mais le retard de formation du plexus primaire persiste suggérant que fzd7, en activant la voie canonique, contrôle un autre mécanisme cellulaire indépendamment de la voie Notch. En effet, nous démontrons que Fzd7 régule la migration des CE via une voie de signalisation Wnt/ β -caténine, mais ceci indépendamment de la voie Notch. Ainsi, Fzd7/DVL, via l'activation de la voie canonique,

régule l'angiogenèse post-natale en contrôlant la sélection Tip/stalk cells de manière dépendante de la voie de signalisation Dll4/Notch et la migration des CE indépendamment de cette voie.

Enfin, j'ai consacré ma dernière année de thèse à l'étude du rôle potentiel de Fzd7 dans l'angiogenèse pathologique. Pour cela, j'ai développé un modèle murin de rétinopathie induite par l'oxygène qui reproduit la rétinopathie que l'on peut observer chez le prématuré. Schématiquement, ce modèle fait intervenir deux grandes phases: une phase de vaso-oblitération des vaisseaux dans la rétine de souris soumises à un taux d'oxygène de 75% pendant 5 jours et une phase de néovascularisation rétinienne lorsque les souris sont replacées à atmosphère ambiante (21% d'oxygène). Nos résultats indiquent que la délétion spécifique de fzd7 dans les cellules endothéliales (CE) in vivo ($fzd7^{iECKO}$) entraîne une réponse différente de celle observée pour les souris contrôle soumises aux mêmes changements de taux d'oxygène. Les souris $fzd7^{iECKO}$ présentent une zone avasculaire plus importante (augmentation de la vaso-oblitération à P12, P14, P17) et une zone de néovascularisation plus faible (à P14 et P17) comparées aux souris contrôles. D'autre part, la délétion de fzd7 diminue les gènes cibles de la voie Wnt canonique ainsi que les gènes associés à la voie Notch. Ces données montrent un rôle nouveau et important de Fzd7 au cours des processus pathologiques. Les expériences en cours permettront de définir si Fzd7 peut être une nouvelle cible thérapeutique potentielle dans le traitement des rétinopathies et à quelle phase de la pathologie Fzd7 doit être ciblé pour une efficacité maximale.

Introduction

Partie 1: Angiogenèse

I. Présentation générale

Le système vasculaire des vertébrés forme un réseau tubulaire branché d'artères, de capillaires et de veines qui permet d'apporter aux tissus l'oxygène et les nutriments nécessaires à leur bon fonctionnement, mais également d'éliminer les déchets de l'organisme (dioxyde de carbone, produits issus du métabolisme) en les transportant au niveau des organes «d'épuration» tels que les reins ou les poumons.

Dans le système vasculaire, on peut distinguer le réseau artériel qui part du cœur vers les organes, et le réseau veineux qui ramène le sang des organes au cœur. La répartition du sang dans l'organisme impose une structure allant des plus gros vaisseaux aux vaisseaux les plus fins.

Au contraire, pour ramener le sang au cœur, le système veineux rassemble une multitude de petits vaisseaux afin de former les grosses veines. Dans l'arbre vasculaire, on distingue les vaisseaux de gros calibre (artère, veine), et ceux de calibre moyen ou petit (artériole, veinule, veinule post-capillaire et capillaire).

La formation de l'arbre vasculaire fait intervenir schématiquement deux processus majeurs:

- la vasculogenèse qui consiste en la formation d'un plexus vasculaire primitif, peu organisé, à partir de précurseurs endothéliaux appelés hémangioblastes.
- l'angiogenèse qui permet la croissance, l'organisation et le remodelage du réseau vasculaire primitif préexistant, par bourgeonnement des capillaires, afin de rendre ce réseau fonctionnel.

L'angiogenèse physiologique joue un rôle fondamental au cours du développement embryonnaire, mais également chez l'adulte au cours de la vascularisation cyclique de l'endomètre et des ovaires chez la femme ou des processus de cicatrisation. Une anomalie de ce processus angiogénique est à l'origine de nombreuses pathologies. En effet, un excès d'angiogenèse peut être observé dans les maladies inflammatoires (psoriasis, arthrites), les cancers ou les pathologies oculaires (rétinopathies, dégénérescence maculaire liée à l'âge), tandis qu'un défaut d'angiogenèse peut induire l'apparition d'une ischémie tissulaire et une réparation tissulaire insuffisante.

Ainsi, une meilleure compréhension des mécanismes de la formation du système vasculaire pourrait permettre de mettre au point de nouvelles stratégies thérapeutiques ayant pour objectif d'inhiber l'angiogenèse dans le cas des cancers ou des pathologies oculaires, ou au contraire d'activer et de stimuler cette angiogenèse dans le cadre de maladies ischémiques (ischémie du

membre inférieur, du muscle cardiaque ou du cerveau) afin de mieux traiter l'ensemble de ces pathologies

II. Mécanismes cellulaires et moléculaires de la morphogenèse vasculaire

A. La vasculogenèse

La vasculogenèse est le processus d'assemblage du premier réseau de vaisseaux sanguins embryonnaires, avant le début de la circulation. Elle consiste en la formation d'un réseau vasculaire primitif *via* la différenciation de progéniteurs endothéliaux lors du développement embryonnaire et plus précisément dès le stade de la gastrulation. Ce sont les cellules précurseurs, appelées hémangioblastes qui sont à l'origine des cellules endothéliales mais également des cellules hématopoïétiques. Elles dérivent principalement du mésoderme postérieur et latéral et expriment notamment les marqueurs suivants : CD31, CD34 et le récepteur de type 2 du VEGF (VEGFR-2 ou *flk-1*) (Figure 1).

Les mécanismes moléculaires participant à cette différenciation ont été partiellement élucidés. Ainsi, un certain nombre de gènes a été identifié comme impliqué dans ce processus: *Ets*, *Hex*, *VE*-statine, *Hox*, *Scl*, *Runx-1*. D'autre part, le rôle fondamental du facteur de croissance VEGF et de son récepteur *flk-1* dans la différenciation des angioblastes et la formation du réseau vasculaire primitif a été mis en évidence. En effet, l'inactivation du gène *flk-1* chez la souris engendre une mortalité embryonnaire due à un blocage précoce de l'hématopoïèse ainsi qu'un arrêt de la différenciation endothéliale (Shalaby et al 1995). Les angioblastes se différencient également à partir de cellules totipotentes sous l'action du basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) (Krah et al 1994), montrant que ce facteur est important dans ce processus. Enfin, les intégrines assurant les interactions entre les cellules endothéliales et la matrice extracellulaire sont aussi impliquées dans la différenciation de ces précurseurs (Bader et al 1998).

C'est à partir de ces précurseurs endothéliaux que se formeront l'aorte dorsale, les veines cardinales et le système artério-veineux de l'embryon. D'autres voies de signalisation sont impliquées dans ce phénomène, incluant les systèmes *Wnt/Fzd*, *Delta/Notch*, *Ephrine/Eph*, *BMP* ainsi que les voies du *TGF-β* et du *PDGF*.

Outre son importance dans le développement normal, certains processus vasculogéniques sont également impliqués dans diverses pathologies. Les progéniteurs des cellules endothéliales vasculaires existent chez l'adulte et peuvent circuler dans le sang, migrer dans les tissus extravasculaires et promouvoir la formation *de novo* de vaisseaux en réponse notamment à une blessure ou dans des conditions ischémiques (Jin & Patterson 2009).

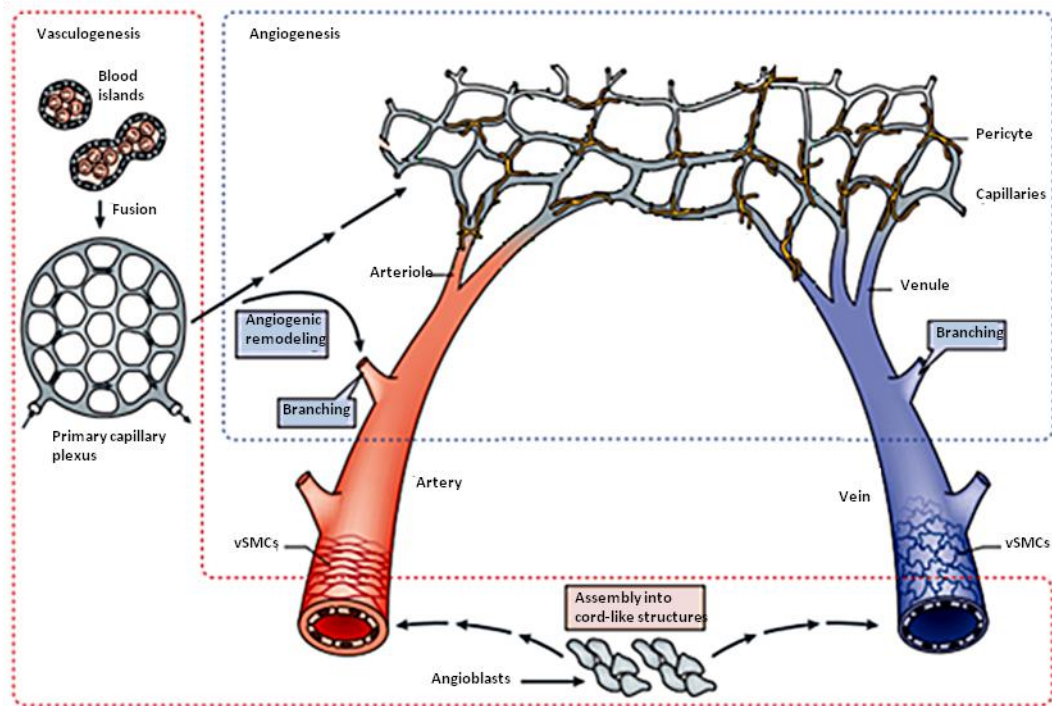


Figure 1: Origine des cellules endothéliales et assemblage des vaisseaux. Les cellules du mésoderme chez l'embryon se différencient en précurseurs de cellules endothéliales (angioblastes) et forment des agrégats appelés îlots sanguins (à gauche). La fusion de ces îlots conduit à la formation vasculogénique de plexus primaires de capillaires de forme alvéolaire dans le sac vitellin et l'embryon lui-même. La circulation sanguine est établie et les plexus primaires sont transformés en un réseau organisé en artérioles et artères (rouge), en capillaires (gris) et en veinules et veines (bleu). L'aorte dorsale et la veine cardinale sont directement formées par assemblage des angioblastes. Les cellules musculaires lisses vasculaires (vSMA) sont associées aux artères et veines, tandis que les capillaires sont recouverts par les péricytes (jaune). D'après (Adams & Alitalo 2007).

B. L'angiogénèse

1) Généralités

L'angiogénèse est un processus complexe, variable d'un organe à un autre, qui nécessite une fine régulation, faisant intervenir différents types cellulaires: les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses, les cellules inflammatoires, les fibroblastes, mais aussi de nombreux composants de la matrice extracellulaire. Elle résulte de la balance entre l'action de facteurs anti- ou pro-angiogéniques. Un dérèglement de cette balance a généralement un impact très important sur la santé et contribue à l'apparition de diverses pathologies.

L'angiogénèse correspond au développement, à la croissance, au remodelage et à l'organisation d'un réseau vasculaire. Elle s'effectue par bourgeonnements capillaires à partir de vaisseaux préexistants

(ou «sprouting») et permet à ce réseau de devenir fonctionnel. Les mécanismes mis en jeu sont la dégradation de la matrice extracellulaire (MEC) et de la membrane basale (MB), la migration et la prolifération des cellules endothéliales (CE) ainsi que la formation de tubes endothéliaux avec une nouvelle membrane basale. Des péricytes, voire des cellules musculaires lisses (CML), viennent alors soutenir ces néovaisseaux pour les stabiliser (Figure 2).

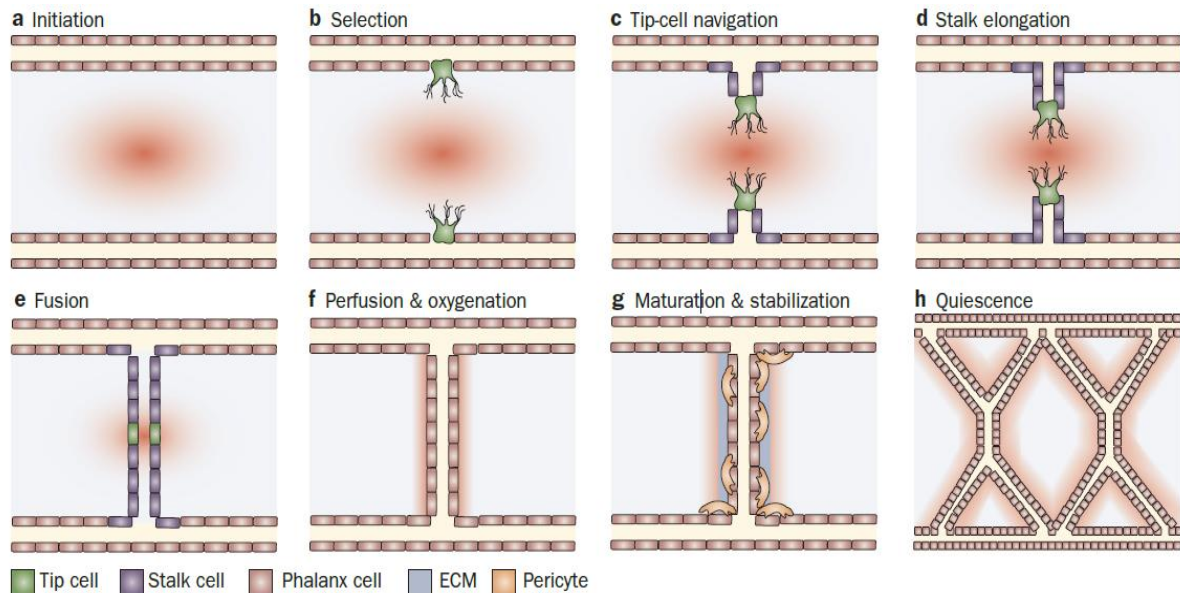


Figure 2: Les différentes étapes de l'angiogenèse. (a) En réponse à une hypoxie, des cellules non vasculaires expriment des facteurs de croissance et créent notamment un gradient de VEGF (tâche rouge diffuse). (b) Les cellules endothéliales exposées à la plus forte concentration en VEGF sont sélectionnées et deviennent des tip cells (en vert). (c) Les tip cells initient le bourgeonnement en suivant le gradient de VEGF et envahissent le tissu environnant en émettant de nombreux filopodes qui jouent le rôle de senseurs. (d) Le bourgeonnement ou «sprouting» s'allonge via la prolifération des cellules endothéliales stalk cells (violet) qui se situent juste derrière la tip cell. (e) Le nouveau branchement se connecte avec un autre branchement via la fusion des tip cells. (f) La formation de la lumière vasculaire permet au sang de circuler et ainsi l'oxygénation du tissu qui entraîne ainsi une diminution de la concentration en VEGF. (g) La maturation et la stabilisation du nouveau plexus vasculaire repose sur le recrutement des péricytes (en orange) et le dépôt de la matrice extracellulaire (ECM, en bleu). (h) Dans le réseau vasculaire stable, fonctionnel et mature, les cellules endothéliales adoptent un phénotype de quiescence et sont appelées phalanx cells (gris). D'après (Carmeliet et al 2009).

2) Vasodilatation, perméabilité vasculaire et dégradation de la matrice extracellulaire

La vasodilatation est un pré-requis à la migration des CE et au bourgeonnement des vaisseaux. Elle est dépendante du monoxyde d'azote (NO) qui induit fortement la transcription du gène *Vegf*. Celui

ci, fortement stimulé par l'hypoxie, augmente la perméabilité vasculaire en relocalisant les molécules d'adhésion intercellulaires PECAM-1 (platelet endothelial cell adhesion molecule-1) et la VE-cadhérine (Vascular Endothelial-cadhérine), et en altérant la structure des membranes cellulaires (Eliceiri et al 1999, Gale & Yancopoulos 1999). Ceci permet une extravasation de protéines plasmatiques favorisant la survie des CE et leur migration à travers la paroi vasculaire. La perméabilité vasculaire est finement régulée, notamment par les angiopoïétines 1 (Ang-1) et 2 (Ang-2). Elles se lient au même récepteur Tie2 tout en ayant des effets antagonistes. Ainsi, l'Ang-1 inhibe la perméabilité vasculaire en resserrant les jonctions intercellulaires (Gamble et al 2000, Thurston et al 2000). Au contraire, l'Ang-2 induit le détachement des CML et un relâchement de la MEC sous-jacente, permettant ainsi la migration des CE (Maisonpierre et al 1997). Enfin, la dégradation de la MEC fait intervenir des enzymes comme les métalloprotéases (MMPs) qui permettent de rendre disponible aux CE l'espace qui leur est nécessaire pour migrer hors de la paroi vasculaire, mais aussi le relargage de molécules séquestrées dans la MEC (FGF-2, VEGF). Plus d'une vingtaine de sous-types de MMPs ont été identifiés et jouent un rôle important dans la phase précoce de l'angiogenèse (Nelson et al 2000).

3) Prolifération et migration des cellules endothéliales

Dès que la paroi vasculaire est franchie et la MEC dégradée, les CE vont proliférer et migrer en créant des bourgeons capillaires. Un très grand nombre de molécules régulent l'angiogenèse et, bien qu'il soit difficile d'attribuer un rôle précis à chacun de ces acteurs moléculaires, certains éléments de réponses peuvent être apportés. En effet, il apparaît clair que cette étape de l'angiogenèse est avant tout sous le contrôle des VEGFs, angiopoïétines, FGFs et PDGFs.

Les VEGFs et leurs récepteurs jouent un rôle clé (Ferrara et al 2003, Leung et al 1989). En effet, le VEGF est le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire, capable de stimuler la prolifération et la migration des cellules endothéliales et d'augmenter la perméabilité cellulaire. De plus, le VEGF stimule l'expression de la NO synthase endothéliale (eNOS) qui entraîne une augmentation de la production de NO qui active lui-même la libération du VEGF (Kroll & Waltenberger 1998). D'autre part, l'Ang-1 est un chémoattractant pour les CE en potentialisant l'effet du VEGF (Suri et al 1998). Les membres de la famille FGF et PDGF stimulent aussi la croissance endothéliale et recrutent des cellules mésenchymateuses et/ou inflammatoires qui, à leur tour, secrètent des facteurs angiogéniques (Carmeliet 2000, Hirschi et al 1999). Des cytokines, membres de la superfamille du TGF- β , inhibent ou activent la croissance endothéliale selon le contexte (Pepper 1997). Le Tumor necrosis factor (TNF α) module la prolifération des CE induite par le VEGF en agissant par interférence au niveau de la phosphorylation de VEGFR-2 (Guo et al 2000). Enfin, des chémokines comme la

Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1) stimule la prolifération des CE (Belperio et al 2000). Les molécules impliquées dans les interactions cellule-matrice comme les intégrines $\alpha v\beta 3$ ou $\alpha 5\beta 1$ (Eliceiri & Cheresh 1999), ou cellule-cellule comme PECAM-1 (Ilan et al 1999), VE-cadhérine (Lampugnani et al 2003) et les éphrines (Wilkinson 2000) jouent un rôle majeur dans la prolifération et la migration des CE.

Inversement, certaines molécules peuvent empêcher l'étape d'angiogenèse comme la chondromoduline-1 (Hiraki et Shukunami, 2000), l'angiostatine (O'Reilly et al 1994), l'endostatine (O'Reilly et al 1997), l'antithrombine III, les interférons ou le facteur de croissance midkine (Htun van der Horst et al 2008).

4) «Sprouting», «tip cell», «stalk cells»

Au cours de ces dernières années, de nombreux travaux ont permis de mieux appréhender la phase d'angiogenèse au cours de laquelle le bourgeonnement endothélial ou «sprouting» entraîne la formation de nouvelles ramifications («branching») pour aboutir à un réseau tridimensionnel efficient. L'initiation ainsi que l'orientation des bourgeons ne peut se faire au hasard. Des mécanismes régulateurs doivent permettre la fusion des néovaisseaux pour constituer un réseau fonctionnel. A chaque bourgeonnement se trouvent deux types de cellules: la «tip cell» et les «stalk cells». La «tip cell» est la cellule endothéliale, jusque là quiescente, sélectionnée dans le vaisseau préexistant, qui va être activée et servir de senseur de l'environnement et de guide à la création de cette nouvelle ramification. Celle-ci va présenter des filopodes et des lamellipodes, s'étendre et migrer en allongeant la ramification en suivant le gradient de VEGF et de molécules de guidance présentes dans le microenvironnement. En arrière, les «stalk cells» prolifèrent, puis soutiennent et stabilisent le néovaisseau alors que la lumière vasculaire apparaît (Gerhardt et al 2003) (Figure 3).

Plusieurs études ont montré que le processus de sélection de la «tip cell» est induit par un gradient de concentration de VEGF. Une seule CE par site de «branching» doit être sélectionnée, les CE adjacentes devenant des «stalk cells» (Gerhardt et al 2003, Ruhrberg et al 2002).

Les «stalk cells» se mettent alors à proliférer, également sous l'influence du VEGF, avec des divisions polarisées selon un axe perpendiculaire au néo-vaisseau, permettant ainsi son élongation (Zeng et al 2007).

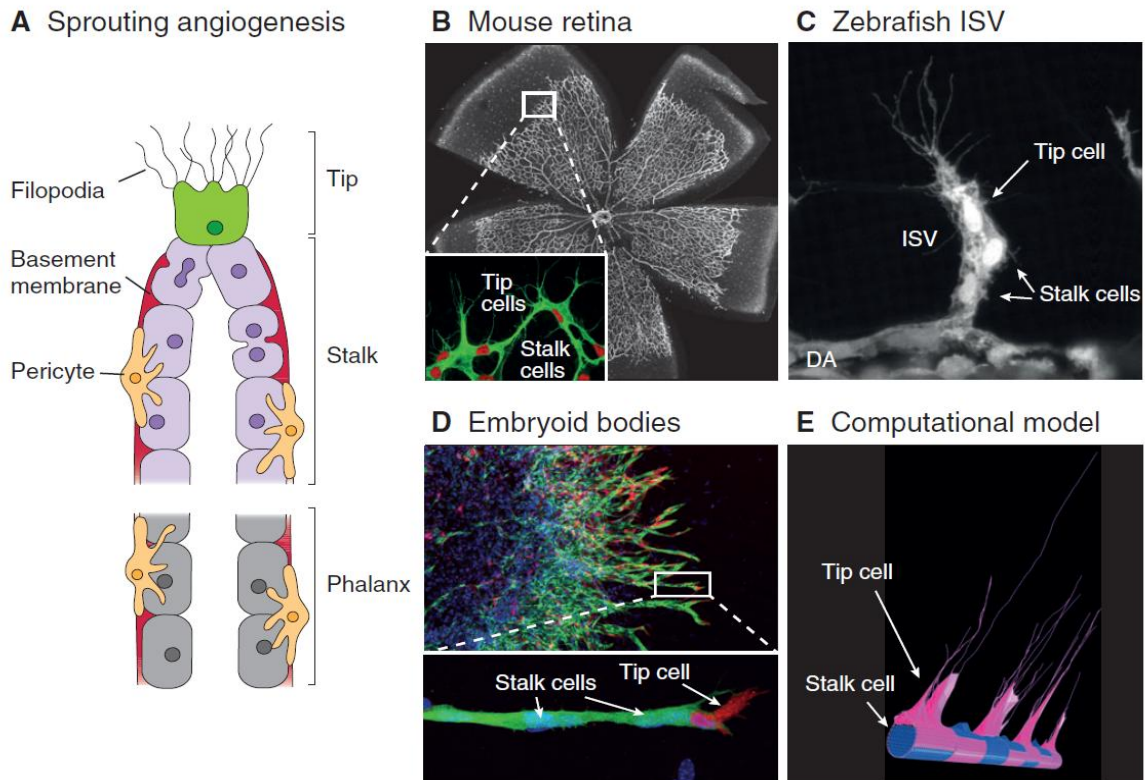


Figure 3: Le «sprouting» angiogénique. (A) Illustration schématique d'un bourgeonnement endothélial en formation. Le bourgeonnement est guidé par la tip cell qui utilise ses filopodes pour capter les signaux attractifs et répulsifs de l'environnement alors que les stalk cells prolifèrent. Ces deux types de CE sont activées tandis que les phalanx cells sont des cellules en quiescence. (B-D) Images représentatives de différents modèles de sprouting angiogénique mettant en évidence la présence de tip/stalk cells. (B) Rétine de souris 5 jours après la naissance (P5N). Rouge, noyau des CE (Erg); vert, vaisseaux (Isolectine-B4). (C) Vaisseaux intersomitiques (ISV) en formation chez l'embryon de poisson zèbre *Fli1:eGFPy1* 28 h après fertilisation. (D) Bourgeonnements en formation sur le modèle mosaïque d'un corps embryotaire *in vitro* constitué de cellules wild-type-DsRed (rouge) et de cellules *VEGFR2-EGFP/+* (vert). (E) Modèle de simulation de sélection des tip cells versus stalk cells. D'après (Geudens & Gerhardt 2011).

Cette sélection «tip cell/stalk cells» est médiée par la «tip cell» elle-même qui est exposée aux plus hauts niveaux de VEGF. En effet, parmi les gènes préférentiellement et fortement exprimés par la «tip cell» on retrouve le récepteur au VEGF, le VEGFR2 (Gerhardt et al 2003), ainsi que le Delta-like ligand 4 (Dll4), ligand des récepteurs Notch (Claxton & Fruttiger 2004, Shutter et al 2000).

Schématiquement, la liaison du VEGF au VEGF-R2, induit une cascade de signalisation qui permet à une cellule endothéliale de devenir une «tip cell», tandis que les cellules voisines sont inhibées dans leur devenir en tant que «tip cell» et deviennent des «stalk cells». Cette inhibition latérale repose sur

la communication cellulaire «tip-to-stalk» par la signalisation Dll4/Notch (Hellstrom et al 2007, Noguera-Troise et al 2007).

Chez les mammifères, les récepteurs Notch 1, 2, 3 et 4 interagissent avec les ligands Jagged 1 et 2 ainsi que Dll1, 3 et 4. Après fixation du ligand Dll4 exprimé par la tip cell sur le récepteur Notch1 présent au niveau des stalk cells, ce dernier est clivé sur sa partie cytoplasmique, libérant ainsi sa queue intracellulaire et générant le domaine intracellulaire de Notch (NICD) qui agit comme un régulateur de la transcription. Ceci diminue l'expression de Dll4 induite par le VEGF dans les tip cells, établissant ainsi un rétrocontrôle qui permet à la «tip cell» de conserver son phénotype et sa position de pointe et empêchant ainsi les cellules voisines de devenir elles-mêmes des «tip cells». L'activation de la voie de signalisation entraîne donc l'expression de gènes cibles dont la plupart exerce un contrôle négatif sur la voie tels que Hes1, Hey1, 2 ou Nrarp (Notch-regulated ankyrin repeat protein) (Roca & Adams 2007). Des études récentes révèlent notamment que Nrarp est exprimé dans les «stalk cells» au niveau des branchements, où il inhibe l'activité de Notch, pour induire l'arrêt du cycle cellulaire et maintenir la cellule dans un état de quiescence (Phng et al 2009).

Cette voie Dll4/Notch a tout d'abord été décrite comme antiproliférative et anti-angiogénique (Lobov et al 2007), notamment *via* la diminution d'expression des récepteurs du VEGF (Jakobsson et al 2009). Cependant, des données plus récemment publiées permettent d'affirmer qu'il s'agit en fait d'une balance très dynamique, finement régulée et modulée par l'expression des récepteurs VEGFR1 et VEGFR2 qui aboutit à la sélection et au maintien de la «tip cell» (Jakobsson et al 2010). C'est donc par un effet juxtacrine qu'est régulée la balance «tip cell/stalk cells» (De Smet et al 2009, Roca & Adams 2007) (Figure 4).

Ainsi, l'abolition de la signalisation Dll4/Notch aboutit à l'apparition d'un bourgeonnement anarchique avec plusieurs «tip cells» à chaque embranchement (Claxton & Fruttiger 2004).

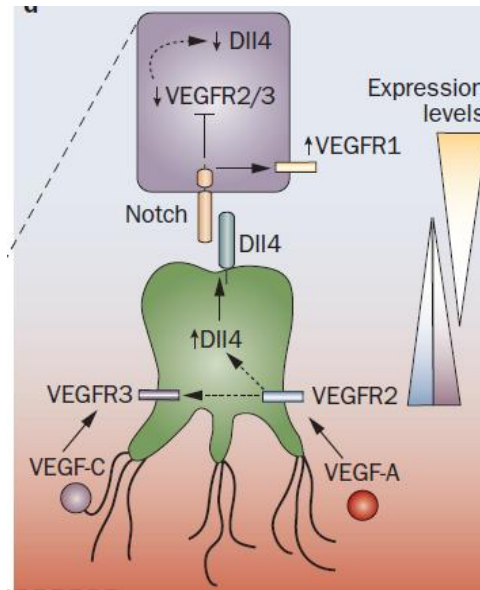


Figure 4: Sélection des tip cells via la balance entre les voies du VEGF et Notch. Le devenir de la cellule endothéliale est régulé par des mécanismes moléculaires distincts. Après la sélection de la tip cell induite par le VEGF, l'activation du récepteur VEGFR2 entraîne une augmentation de l'expression du récepteur VEGFR3 et du ligand Dll4 par la tip cell. Le ligand Dll4 active alors les récepteurs Notch de la cellule endothéliale voisine, ce qui induit une diminution d'expression de VEGFR2 et 3 et une augmentation de VEGFR1 dans ces cellules voisines qui vont alors adopter un phénotype de stalk cells qui ne migrent pas en réponse au VEGF mais prolifèrent. Tip cell: en vert; stalk cell: en violet. D'après (Carmeliet et al 2009).

5) Formation des tubes endothéliaux

Une fois que les CE ont migré et proliféré, celles-ci s'assemblent en tubes capillaires au sein desquels se forme la lumière des vaisseaux nouvellement formés. La formation de cette lumière vasculaire résulte de la fusion des vacuoles des cellules. En effet, les vacuoles se forment par les processus de pinocytose et coalescence pour créer une lumière entre les CE. (Mudhar et al 1993)

La formation des vacuoles dépend de l'interaction des intégrines avec la MEC, alors que la fusion des vacuoles requiert le réarrangement du cytosquelette d'actine et des microtubules (Davis et al 2002). Les petites GTPases Rac1 et Cdc42, mais pas RhoA, sont impliquées dans ces phénomènes et se retrouvent accumulées à la membrane des vacuoles durant la formation de la lumière vasculaire (Koh et al 2008).

Une fois la lumière formée, des signaux additionnels de prolifération et de croissance, comme le VEGF (Ruhrberg et al 2002), Notch (Sainson et al 2005) et la laminine (Jakobsson et al 2008), permettent la modification de la taille de la lumière. En association avec le VEGF, l'Ang-1 augmente

également le diamètre de la lumière (Suri et al 1998), ainsi que les intégrines $\alpha\beta3$, $\alpha5\beta1$ (Bayless et al 2000).

A l'inverse, certains facteurs endogènes inhibent la formation de la lumière, comme la thrombospondine-1 (TSP-1), l'angiostatine et l'endostatine (Gendron et al 2000).

6) Maturation des vaisseaux

Une fois le réseau endothélial formé, les cellules murales vont stabiliser les vaisseaux naissants en fournissant des facteurs de survie et antiprolifératifs aux CE (Hoch & Soriano 2003). Les deux grands types de cellules murales sont les CML, qui recouvrent les artères et les veines, et les péricytes qui forment une simple couche de cellules autour des capillaires. Ainsi, la maturation des artères implique un épaississement de la média de la paroi vasculaire *via* le dépôt de MEC. Le diamètre luminal est alors réduit et la résistance augmente.

Le développement et le recrutement des CML autour du tube endothélial requièrent de nombreuses molécules (Betsholtz C 2005). Le PDGF-BB ainsi que le VEGF sont chémoattractants pour les CML (Lindahl P 1998). Le PDGF, sécrété par les CE, attire les cellules péri-vasculaires exprimant le PDGF-R, induisant leur attachement à l'endothélium. En retour, la signalisation du TGF- β est activée : le TGF- $\beta1$, le récepteur TGF- $\beta R2$, l'endogline et Smad5 stimulent la différenciation des CML tout en inhibant la prolifération et la migration des CE (Pepper 1997). De plus, cette signalisation induit une altération de la MEC (Risau 1997). Les molécules de la MEC, comme le collagène, la laminine, la fibronectine, l'élastine, les glycosaminoglycanes, les protéoglycanes et les molécules d'adhésion, sont en effet nécessaires pour la maturation, la différenciation et la stabilisation endothéliale (Chen et al 2005, Rhodes & Simons 2007, Stringer 2006). Soncin et al. ont mis en évidence le rôle de la VE-Statine, un inhibiteur du recrutement des CML induit par le PDGF-BB (Soncin et al 2003).

Les récepteurs Tie ont un rôle important dans la formation et la stabilisation des vaisseaux. Les récepteurs Tie1 et Tie2 sont capables de lier les ligands Angiopoïétine 1 (Ang1) et 2 (Ang2). Les principales sources d'Ang-1 et Ang-2 sont les cellules murales et les cellules endothéliales. L'Ang-1 est connue pour stabiliser les vaisseaux naissants en facilitant l'interaction entre les CE et les cellules murales. Curieusement, en l'absence de cellules murales, l'Ang-1 recombinante est capable de restaurer l'augmentation de la taille des vaisseaux et de prévenir la formation d'œdèmes et d'hémorragies dans la rétine post-natale de souris. Ainsi, le mécanisme de maturation des vaisseaux par l'Ang-1 est encore mal connu. Le rôle de l'Ang-2 semble dépendre du contexte car, en absence de VEGF, l'Ang-2 agit comme un antagoniste de l'Ang-1 et conduit à une perte de stabilité des vaisseaux

induisant une régression vasculaire. A l'inverse, en présence de VEGF, l'Ang-2 facilite le bourgeonnement des vaisseaux (Thomas & Augustin 2009).

Comme on peut donc le constater, le développement d'un réseau vasculaire est un phénomène complexe, très finement régulé, et faisant intervenir notamment des notions de gradients spatio-temporels, d'hypoxie ou de facteurs de croissance vasculaire et d'interactions cellules-cellules et cellules-MEC.

III. Développement vasculaire de la rétine

A. Présentation générale

La rétine est constituée de deux principaux composants, la rétine neurale et la rétine vasculaire qui partagent des similitudes, se forment et se développent de manière concomitante (Figure 5).

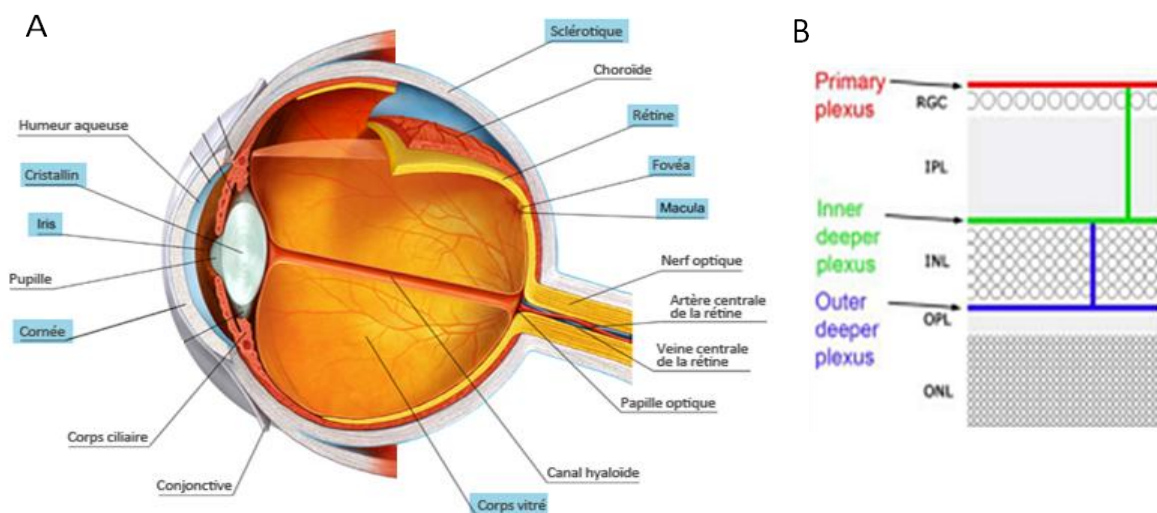


Figure 5: Localisation et structure de la rétine. (A) Anatomie de l'œil humain. (B) Section d'une rétine avec la face interne en haut et la face externe en bas. La rétine neurale est constituée de différentes couches cellulaires: la couche composée de cellules ganglionnaires rétiniennes (RGC), les couches plexiforme interne (IPL), nucléaire interne (INL), plexiforme externe (OPL) et nucléaire externe (ONL). Plexus vasculaire primaire: en rouge, plexus intermédiaire: en vert et plexus profond: en bleu. D'après (Fruttiger 2007).

La principale fonction de la rétine neurale est de transmettre la lumière de l'œil vers le cerveau. Les signaux photoniques sont décodés par les cellules photo-réceptrices de la couche nucléaire externe où elles sont converties en signaux électrochimiques. Ces derniers sont intégrés par différents interneurons localisés dans la couche nucléaire interne et sont ensuite transmis aux cellules

ganglionnaires de la rétine. A partir de ces cellules, les signaux électriques se propagent le long du nerf optique jusqu'au cortex visuel du cerveau. L'activité électrique intense de ces différents types de neurones nécessite un apport important en oxygène et en nutriments qui est assuré par deux réseaux vasculaires, la vascularisation de la rétine et celle de la choroïde. L'activité de la rétine neurale et la formation du réseau vasculaire rétinien sont interdépendants et se basent sur une communication et des échanges entre les neurones et les cellules endothéliales.

B. Vascularisation de la rétine chez l'homme et la souris

Dans l'ensemble, le système vasculaire rétinien chez l'homme et chez la souris se développe selon les mêmes grandes étapes. Le réseau vasculaire qui permet l'apport d'oxygène et de nutriments nécessaires aux couches profondes de la rétine fait l'objet de changements importants et d'une réorganisation au cours de son développement.

Dans un premier temps, la partie interne de l'œil est métaboliquement soutenue par le système vasculaire hyaloïde, un réseau artériel dans le corps vitré. Le sang entre par l'artère hyaloïde centrale au niveau du nerf optique, traverse les vaisseaux hyaloïdes dans le corps vitré, puis sort par un vaisseau collecteur annulaire à l'avant de l'œil. Dans les derniers stades de développement, le réseau vasculaire primitif hyaloïde est remplacé par le système vasculaire rétinien (Figure 6).

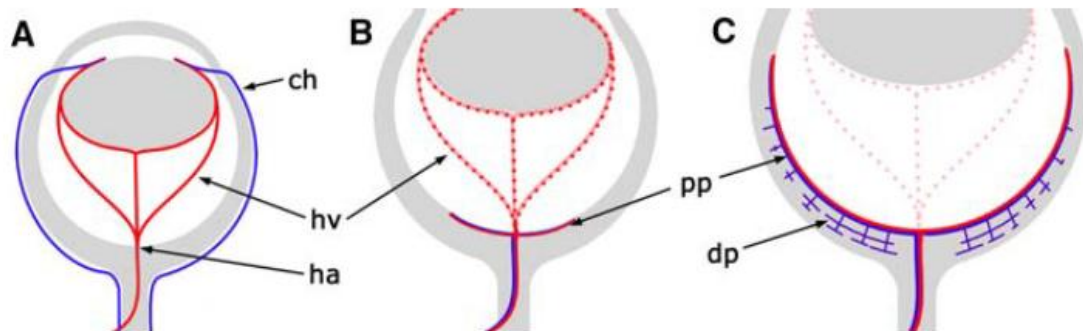


Figure 6: Développement et remodelage du réseau vasculaire dans l'œil. (A) Le réseau hyaloïde (hv) est approvisionné en sang par l'artère hyaloïde (ha) et est drainé par les veines du réseau de la choroïde (ch). **(B)** Le réseau hyaloïde régresse au fur à mesure que le plexus vasculaire primaire (pp) se forme à la surface de la rétine. Ce premier plexus est formé d'artères et de veines. **(C)** Les plexus vasculaires profonds (dp) se forment à partir des veines du plexus vasculaire primaire. D'après (Fruttiger 2007).

Ainsi, chez les deux espèces, les premiers vaisseaux proviennent de la tête du nerf optique et sont répartis sur la surface interne de la rétine. Ils forment un réseau vasculaire dense du centre vers la périphérie qui s'étend dans la couche de fibres nerveuses de la rétine et qui, contrairement au réseau hyaloïde, contient à la fois des artères et des veines entrant et sortant par le nerf optique.

La formation de ces vaisseaux est précédée d'un réseau d'astrocytes qui s'étend également à partir du nerf optique. Initialement, les vaisseaux rétiniens semblent suivre ce réseau d'astrocytes. Une fois que le réseau vasculaire recouvre l'ensemble de la rétine, les vaisseaux commencent à bourgeonner vers le bas, c'est-à-dire dans la couche plexiforme interne où ils établissent un second réseau vasculaire parallèle au premier mais qui n'est pas associé à celui des astrocytes rétiniens. Le réseau vasculaire est ensuite remodelé en trois réseaux parallèles mais interconnectés, situés dans la couche de fibres nerveuses et les couches plexiformes (Fruttiger 2007).

Un certain nombre d'études défendent l'hypothèse que le développement vasculaire primaire à la surface de la rétine se produirait par le mécanisme de vasculogenèse tandis que la formation du réseau vasculaire secondaire dans la couche plexiforme interne ferait intervenir le processus d'angiogenèse. La preuve de la survenue de la vasculogenèse au cours de la vascularisation primaire est basée sur l'identification d'angioblastes (notamment dans la rétine chez l'homme) circulant au niveau de la rétine avant l'apparition des cellules endothéliales (Chan-Ling et al 2004, Flower et al 1985, Hughes et al 2000, McLeod et al 2006). Cependant, tous les travaux ayant mis en évidence la présence de ces angioblastes dans la rétine ont eu recours à des méthodes d'identification controversées (Rechtman et al 2003, Urbich & Dimmeler 2004). Ainsi, des études plus récentes ont montré que ces cellules identifiées seraient en réalité des astrocytes immatures, non des précurseurs endothéliaux, et que le développement du réseau vasculaire primaire se ferait par le mécanisme d'angiogenèse. D'autre part, l'identification au front de bourgeonnement du réseau vasculaire de cellules endothéliales spécialisées appelées «tip cells» tend à prouver que la formation du plexus primaire se fait par angiogenèse.(Fruttiger 2002, Gerhardt et al 2003).

1) Cinétique de développement vasculaire chez l'homme

Chez l'homme, la vascularisation rétinienne débute *in utero* à environ 16 semaines de gestation, tandis que la régression du réseau hyaloïde est généralement terminée avant 34 semaines c'est-à-dire autour de la mi-gestation. A ce stade, le développement de la vascularisation intra-rétinien est déjà bien avancé. La rétine nasale devient pleinement vascularisée à environ 36 semaines de gestation, et les vaisseaux temporaux atteignent l'ora serrata à environ 40 semaines. Un nouveau né

à terme présente ainsi un développement complet des vaisseaux rétiniens et une régression totale du réseau vasculaire hyaloïde (Mitchell et al 1998, Paysse 2009, Stahl et al 2010).

2) Cinétique de développement vasculaire chez la souris

Le modèle de développement vasculaire post-natal de la rétine chez la souris est un modèle de choix pour l'étude de l'angiogenèse. En effet, c'est un modèle bien décrit et largement utilisé qui permet d'analyser les différentes étapes de formation d'un vaisseau sanguin.

Contrairement à l'homme, la souris possède une vascularisation rétinienne immature et un réseau hyaloïde persistant à la naissance. Ce réseau hyaloïde ne commence à régresser que lorsque le plexus primaire commence à se former, c'est-à-dire à partir de P0 (Figure 7).

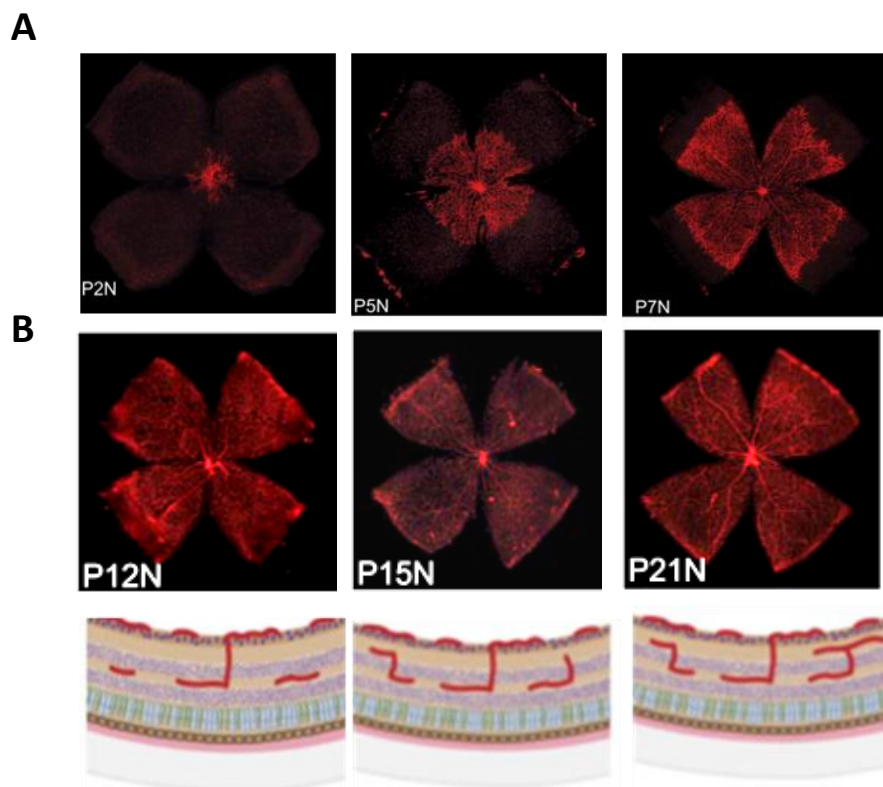


Figure 7: Développement vasculaire post-natal de la rétine chez la souris. Le réseau vasculaire est marqué avec l'isolectineB4 (rouge). A la naissance (P0N), la rétine est avasculaire.

(A) Le plexus vasculaire primaire superficiel se forme progressivement durant la première semaine post-natale, c'est à dire entre P0N et P8N, et se développe radialement du nerf optique situé au centre de la rétine vers la périphérie de la rétine.

(B) A partir de P8N, le plexus primaire plonge verticalement dans la rétine neurale pour former entre P8N et P12N le plexus vasculaire profond. Entre P12N et P15N, le plexus intermédiaire se forme, puis le réseau vasculaire est remodelé pour devenir mature à P21N. PS: plexus superficiel primaire, PP: plexus profond et PI: plexus intermédiaire. D'après (Stahl et al 2010).

Chez la souris, le plexus vasculaire primaire atteint la périphérie de la rétine dans les 8 jours (P8N) après la naissance, les vaisseaux en formation à la périphérie du réseau vasculaire étant moins matures que les vaisseaux centraux. Puis, entre le 8^{ème} (P8N) et 12^{ème} (P12N) jour après la naissance, le plexus superficiel bourgeonne horizontalement pour former progressivement le plexus profond, puis le plexus intermédiaire entre le 12^{ème} (P12N) et 15^{ème} (P15N) jour. Ainsi, à 21 jours (P21N), le réseau vasculaire rétinien est entièrement formé, remodelé et mature (Fruttiger 2007, Stahl et al 2010).

C. Régulation du développement vasculaire rétinien chez la souris

1) Régulation au niveau cellulaire

a) Rôle des astrocytes

Le développement vasculaire rétinien est précédé et dépendant de l'invasion d'astrocytes qui migrent à la surface de la rétine sous l'influence du facteur PDGFA sécrété par les cellules ganglionnaires rétiniennes (Mudhar et al 1993). Ils émergent de la tête du nerf optique, prolifèrent et envahissent la rétine de manière centrifuge, formant ainsi un réseau cellulaire qui sert de support au réseau vasculaire. Il existe un lien étroit entre la formation de ce réseau d'astrocytes et le plexus vasculaire primaire. En effet, chez les espèces qui présentent une rétine partiellement vascularisée (lapin et cheval), les astrocytes sont absents de ces zones avasculaires, montrant que ces cellules sont indispensables à la vascularisation de la rétine (Schnitzer 1987). De plus, au début du développement, les astrocytes non recouverts par les vaisseaux sont soumis à une hypoxie importante. Ceci entraîne l'expression du facteur HIF1 α (Semenza 2010), ainsi qu'une forte expression de VEGFA par les astrocytes. Il a été ainsi tout d'abord proposé qu'un gradient de VEGFA se crée entre le centre et la périphérie de la rétine, stimule et oriente alors la formation des vaisseaux sanguins (Stone et al 1995, West et al 2005). Cependant, une étude plus récente montre que le VEGFA sécrété par les astrocytes n'est pas essentiel à la formation du réseau vasculaire rétinien, suggérant que les astrocytes pourraient réguler cette angiogenèse *via* la sécrétion de facteurs n'ayant pas encore été identifiés (Scott et al 2010).

b) Rôle des macrophages

Le remodelage ou «pruning» du réseau vasculaire fait notamment intervenir les leucocytes qui adhèrent au réseau *via* CD18 et active l'apoptose sélective des CE *via* le ligand Fas (FasL). Il a été démontré que le blocage de FasL ou de CD18 avec des anticorps augmente la densité vasculaire (Ishida et al 2003). De manière intéressante, la déplétion des macrophages par l'injection

intraoculaire de liposomes de clodronate entraîne un effet opposé, réduit la densité vasculaire et inhibe la régression du réseau hyaloïde (Checchin et al 2006). D'autre part, des études ont montré que les souris mutantes hétérozygotes pour BMP4, dépourvues de macrophages dans le vitré, ou les souris déplétées des macrophages par injection de clodronate, présentent des anomalies de régression du réseau hyaloïde suggérant un rôle important dans l'angiogenèse de la rétine (Chang et al 2001, Diez-Roux & Lang 1997). Plus récemment, différentes équipes ont montré que pendant l'angiogenèse rétinienne, les macrophages sont étroitement associés aux cellules endothéliales qui bourgeonnent et facilitent l'anastomose en formant des ponts entre les bourgeons voisins néoformés (Checchin et al 2006, Fantin et al 2010). Outtz et al. ont mis en évidence que la signalisation Notch dans les macrophages est importante pour leur localisation et leur interaction avec les cellules endothéliales lors de l'angiogenèse (Outtz et al 2011).

c) Rôle des cellules murales

La signalisation réciproque entre les cellules endothéliales et les cellules murales (péricytes et cellules musculaires lisses) est au cœur du processus de maturation de réseau vasculaire. Les CE recrutent les cellules murales *via* la sécrétion de PDGFB qui active le récepteur PDGFR β présent sur les cellules murales (Hellström et al 1999). Réciproquement, les cellules murales peuvent sécréter l'angiopoïétine 1 qui active le récepteur Tie2 des CE (Nishishita & Lin 2004, Suri et al 1998). Une étude pionnière a démontré que l'injection intraoculaire de PDGFB soluble entraîne un détachement des cellules murales (Benjamin et al 1998). D'autre part, l'administration d'un anticorps bloquant anti-PDGFR β inhibe le recrutement des cellules murales et induit des altérations importantes du remodelage du réseau vasculaire rétinien. L'injection simultanée de la protéine recombinante Ang1 peut restaurer en partie ce phénotype (Uemura et al 2002).

2) Régulation au niveau moléculaire

a) Le VEGF (Vascular endothelial growth factor)

Comme expliqué plus haut, il a été tout d'abord proposé que la formation du plexus vasculaire primaire est dépendante du gradient de VEGFA sécrété par les astrocytes (Stone et al 1995). Cependant, une étude plus récente montre que la sécrétion de VEGFA par ces astrocytes n'est pas essentielle à la formation de ce réseau vasculaire et suggère un mécanisme de compensation. En effet, la sécrétion de VEGFA en plus faible quantité par d'autres cellules telles que les neurones ou les cellules ganglionnaires de la rétine pourrait être suffisante à la croissance de ce plexus vasculaire primaire (Scott et al 2010). De manière intéressante, il a été démontré que la formation des plexus

vasculaires profonds est indépendante du réseau d'astrocytes. Le mécanisme est encore mal élucidé mais des études ont montré que le bourgeonnement du plexus primaire pour former les plexus profonds se fait sous l'influence du VEGFA sécrété par les corps des cellules de Müller situés dans la couche nucléaire interne. Les bourgeoisements plongent et poussent le long des extensions de ces cellules puis s'arrêtent au niveau de la limite inférieure de la couche nucléaire interne et donnent naissance aux deux plexus profonds parallèles au premier (Fruttiger 2002, Fruttiger 2007, Stone et al 1995).

De plus, Ruhrberg, et al. ont montré qu'une distribution spatiale des isoformes du VEGFA sécrétés dans la rétine est essentielle à la régulation de la croissance et de la taille des vaisseaux ainsi qu'à la densité des capillaires. Le gradient et la concentration de VEGFA dans le milieu extracellulaire permettent respectivement de guider et de contrôler finement la migration des tip cells ainsi que la prolifération des stalk cells. Ainsi, des mutations de ces différents isoformes entraînent des altérations importantes du développement vasculaire rétinien et une persistance du réseau hyaloïde (Gerhardt et al 2003, Ruhrberg et al 2002, Stalmans et al 2002).

L'ensemble de ces données montrent le rôle clé du VEGF dans la mise en place du réseau vasculaire de la rétine.

b) Voie Dll4/Notch

D'autre part, la formation du plexus vasculaire se fait par un mécanisme de «sprouting», c'est-à-dire par bourgeonnement de cellules endothéliales et caractérisé par la présence au niveau du front de formation du réseau vasculaire de deux types de CE: les «tip cells» et les «stalk cells». Comme décrit dans le paragraphe précédent, la sélection des «tip cells» et la régulation de la sélection «tip/stalk cells» sont finement régulées par une balance entre les voies du VEGF et Dll4/Notch. Depuis ces dernières années, l'utilisation de modèles de souris mutées pour les gènes Dll4 (Benedito et al 2008, Leslie et al 2007, Lobov et al 2007, Suchting et al 2006) Dll1 (Limbourg et al 2007, Napp et al 2012), Jagged1 (Benedito et al 2009), Notch1 (Hellstrom et al 2007), Notch4 (Carlson et al 2005, James et al 2014) ou Nrarp (Phng et al 2009) ont montré que ces animaux mutants présentent de nombreuses anomalies de vascularisation de la rétine. Des altérations importantes de la sélection des tip cells, de la densité vasculaire, de la prolifération, de la différenciation artério-veineuse et de la stabilité des vaisseaux ont été observées. Ces travaux ont ainsi mis en évidence que les différents partenaires de la voie Dll4/Notch jouent un rôle essentiel dans le développement vasculaire de la rétine (Tableau 1).

Mutants et phénotypes vasculaires rétiniens associés	<i>Dll4</i> ^{+/-}	<i>Dll1</i> ^{+/-}	<i>Jagged1</i> ^{ΔEC}	<i>Jagged1</i> ^{ΔGF}	<i>Notch1</i> ^{ΔEC}	<i>Notch4</i> ^{-/-}	<i>Nrarp</i> ^{-/-}
Expansion radiale du plexus primaire (PP)	X	X	Diminué	X	X	X	Diminué
% de vascularisation du PP	Augmenté	Normal	Diminué	X	X	Diminué	Diminué
% de vascularisation du plexus profond	X	Diminué	X	X	X	X	Normal
Nombre de tip cells/100μm	Augmenté	Diminué	Diminué	Augmenté	Augmenté	X	X
Nombre de filopodes/tip cell	Augmenté	X	Diminué	Augmenté	Augmenté	X	Normal
Nombre de points de branchement au niveau veineux	Augmenté	Diminué	Diminué	Augmenté	X	Normal	Diminué
Nombre de points de branchement au niveau artériel	Augmenté	Diminué	Diminué	Augmenté	X	Normal	Diminué
Prolifération	Normale	X	Diminuée	Augmentée	X	X	Diminuée
Shunt artère/veine dans le PP	Non	X	Non	Non	X	X	Oui
Régression des vaisseaux (marquage IB4/collagèneIV)	X	X	Normale	X	X	X	Augmentée
Maturation des vaisseaux (marquage αSMA/NG2)	Normale	X	Diminuée	X	X	X	Normale

Tableau1: Phénotypes vasculaires rétiniens décrits et associés aux différentes souris mutées pour les acteurs de la voie Notch. Croix: paramètre non étudié

c) Voies Wnt/Frizzled

Ce point sera décrit en détails dans la partie 2: Le système Wnt/Fzd, IV. Rôle de la signalisation Wnt/Fzd dans le développement vasculaire, D. Angiogenèse post-natale de la rétine

d) Autres mécanismes de régulation

-Angiopoïétines

Comme décrit plus haut, l'angiopoïétine 1 intervient dans le recrutement des cellules murales par les CE et dans le processus de maturation de réseau vasculaire. D'autre part, Hackett et al. ont montré

que les souris déficientes pour l'angiopoïétine2 présentent de légères altérations du plexus vasculaire primaire dans la rétine et sont surtout caractérisées par l'absence de formation des plexus vasculaires profonds et une persistance du réseau hyaloïde (Hackett et al 2000, Hackett et al 2002). Une deuxième étude a mis en évidence que l'Ang2 active l'angiogenèse en antagonisant la signalisation Ang1/Tie2 (Maisonpierre et al 1997).

-Bone morphometric proteins (BMP)

Les protéines BMP9 et 10 jouent également un rôle critique dans le remodelage du réseau vasculaire rétinien. En effet, Ricard et al. ont montré que le blocage de BMP9 à l'aide d'un anticorps monoclonal augmente la densité du réseau vasculaire. De plus, l'injection du domaine extracellulaire du récepteur Alk1 ou le blocage de BMP10 dans les souris délétées pour BMP9 entraîne des altérations importantes de la vascularisation rétinienne (Ricard et al 2012). Enfin, Larrivée et al. ont mis en évidence que le récepteur Alk1 *via* sa liaison avec les ligands BMP9 et 10 contrôle l'angiogenèse et notamment le sprouting en augmentant la signalisation Notch (Larrivee et al 2012).

-Ephrines

Le couple ligand-récepteur EphB4-EphrinB2 joue un rôle important dans le développement cardiovasculaire, est un marqueur de la différenciation artério-veineuse et régule la prolifération et la migration des cellules endothéliales (Adams et al 1999, Kertesz et al 2006, Steinle et al 2003). Cependant, le rôle des Ephrines dans le développement vasculaire rétinien n'a pas encore été clairement identifié. Récemment, Sawamiphak et al. ont montré que les souris mutées pour *ephrinB2* dans les cellules endothéliales présentent des anomalies du phénotype des tip cells dans la rétine (Sawamiphak et al 2010).

-Egfl7

Egfl7 est un facteur pro-angiogénique qui n'est exprimé que par les cellules endothéliales. Des modèles murins de surexpression de *Egfl7* dans les CE présentent des défauts du développement et de la maturation du système cardiovasculaire, notamment une altération de l'angiogenèse de la rétine avec des altérations morphologiques des veines et des artères reliés à une diminution de la voie Notch (Nichol et al., 2010). De manière intéressante, Poissonnier et al. ont récemment mis en évidence que *Egfl7* est exprimé par toutes le CE au début du développement du réseau vasculaire rétinien, tandis que son expression se limite par la suite aux veines lorsque le réseau vasculaire mature (Poissonnier et al., 2014). Cette expression différentielle de *Egfl7* entre veines et artères

pourrait expliquer le phénotype artério-veineux observé chez la souris et suggère un lien potentiel entre *Egfl7* et la voie Notch dans la différenciation artério-veineuse.

-Fibroblast growth factor receptor (FGFR)

D'autre part, dans les souris transgéniques surexprimant le dominant négatif du récepteur au FGF, le réseau vasculaire primaire se développe mais le réseau hyaloïde ne régresse pas (Rousseau et al 2003).

-Molécules de guidance des axones

Enfin, de nombreux ligands tels que PlexinD1, Robo1/4 ou Unc5b impliqués dans le processus d'orientation des axones, ainsi que les récepteurs de ces ligands, à savoir Sema3E, Slit1/2 et Netrin1 sont exprimés dans la rétine. Des études ont ainsi mis en évidence que ces molécules de guidance axonale joueraient un rôle au cours de la vascularisation post-natale de la rétine en régulant notamment, le «sprouting» et le remodelage vasculaires (Carmeliet & Tessier-Lavigne 2005, Eichmann et al 2005, Erskine et al 2000, Klagsbrun & Eichmann 2005, Larrivee et al 2007).

IV. Pathologies vasculaires de la rétine chez l'homme: rétinopathies

L'angiogenèse pathologique dans le système vasculaire rétinien est impliquée dans plusieurs maladies oculaires humaines, notamment dans la rétinopathie du prématuré (RP) et la rétinopathie diabétique (RDP). Ces deux pathologies oculaires sont caractérisées par un développement vasculaire prolifératif anormal et sont les causes les plus fréquentes de cécité chez les nourrissons pour la RP et chez les adultes pour la RDP. Les prévalences de la RP et de la ROP sont en hausse en raison d'une augmentation du nombre et de la survie des nouveau-nés prématurés d'une part, et d'une augmentation importante du diabète de type 2 chez l'adulte d'autre part.

A. Rétinopathie chez le prématuré

1) Physiopathologie

On considère qu'un enfant naît prématuré si sa naissance a lieu avant 37 semaines d'âge gestationnel. On distingue 3 niveaux de prématurité : la prématurité moyenne (entre 33 et 37 semaines), la grande prématurité (entre 28 et 32 semaines) et l'extrême prématurité (avant 28 semaines). La prématurité représente 6,2% des naissances. Elle est la plus forte cause de mortalité et de morbidité périnatale.

La rétinopathie du prématuré (RP) est définie comme un processus néovasculaire anormal de la rétine chez les enfants prématurés qui ont une vascularisation incomplète de la rétine. Le nombre de naissances de prématurés a augmenté dans le monde entier et s'accompagne d'une augmentation du nombre de rétinopathie du prématuré dans les pays possédant une technologie médicale qui permet une meilleure prise en charge de ces enfants. La RP touche 15-20% des prématurés et est ainsi devenue la principale cause mondiale de cécité chez l'enfant. La sévérité de la rétinopathie du prématuré dépend de plusieurs facteurs de risque, notamment un poids à la naissance inférieur à 1500g, un âge gestationnel inférieur à 32 semaines, une ventilation mécanique ou une supplémentation en oxygène à des taux élevés (Good & Gendron 2005, Lad et al 2009, McColm & Fleck 2001).

Lorsqu'un nouveau né naît prématurément, le développement physiologique vasculaire de la rétine est interrompu menant ainsi à un réseau vasculaire rétinien incomplet qui ne recouvre pas l'intégralité de la surface de la rétine. En effet, la prise en charge du prématuré fait souvent intervenir l'oxygénothérapie qui entraîne une hyperoxie au sein de la rétine. Cette hyperoxie induit une diminution de facteurs de croissance pro-angiogéniques tels que le VEGF ou l'IGF-1 ainsi qu'une augmentation de la production d'espèces réactives de oxygène, bloquant ainsi la l'angiogenèse physiologique de la rétine (phase 1). A l'arrêt du traitement par l'oxygène, la rétine est soumise à une hypoxie qui se traduit par une augmentation importante de la sécrétion de VEGF et de la signalisation pro-angiogénique. Une phase de vasoprolifération est alors observée et peut conduire à la formation de vaisseaux anormaux et perméables dans le vitré (phase 2) (Figure 8). Dans les formes graves, il y a formation d'un tissu fibro-vasculaire qui se contracte et exerce des tractions sur la rétine qui entraîne une distorsion, voire un décollement de la rétine, et donc une cécité (Hartnett & Penn 2012, Hauspurg et al 2011, York et al 2004).

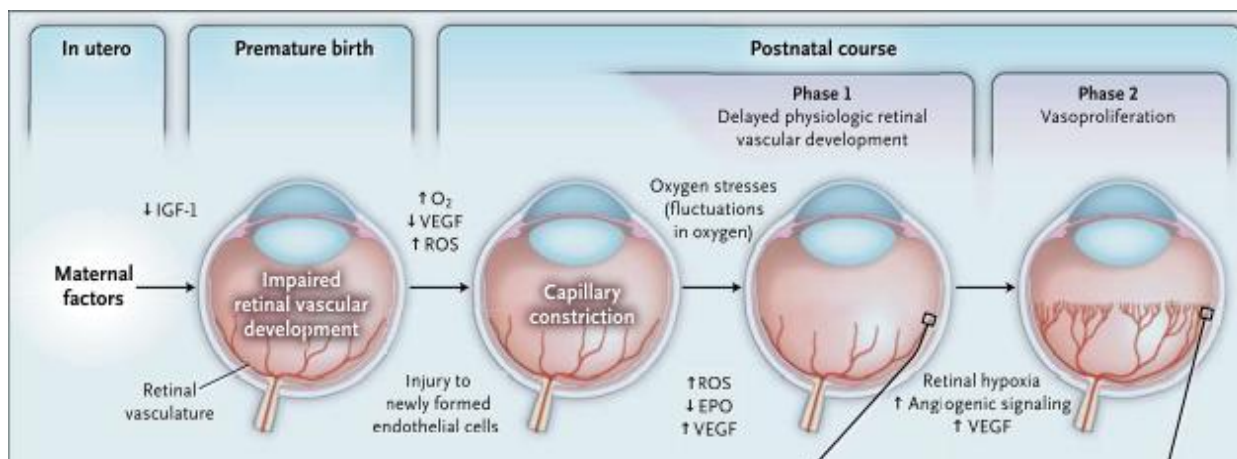


Figure 8. Les deux phases de la rétinopathie du prématuré

Dans la rétinopathie du prématuré, on observe initialement un retard du développement physiologique du réseau vasculaire rétinien, se traduisant par une zone avasculaire périphérique dans la rétine (phase 1). Plus tard, une vasoprolifération se manifestant par une angiogenèse intravitréenne peut survenir au niveau de la jonction entre la zone vasculaire et la zone avasculaire de la rétine (phase 2). D'après (Hartnett & Penn 2012).

Selon la classification internationale de la rétinopathie du prématuré (1984, révisée en 2005), les ROP sont classées selon deux principaux paramètres, à savoir la zone et le stade. Cette classification présentée dans la figure suivante est utilisée pour le diagnostic et le traitement des ROP (Figure 9).

Zone (aire de vascularisation de la rétine)

- I: vascularisation à l'intérieur d'un cercle centré sur le nerf optique, dont le rayon est deux fois la distance entre le nerf optique et la macula
- II: vascularisation s'étendant au-delà de la zone I, dans un cercle dont le rayon est la distance entre le nerf optique et l'ora serrata nasale
- III: vascularisation s'étendant au-delà de la zone I et II

Stade (sévérité de la maladie)

- 1: ligne
 - 2: crête (avec volume)
 - 3: angiogenèse intravitréenne
 - 4: détachement partiel de la rétine
 - 5: détachement total de la rétine
- Maladie supplémentaire: dilatation et tortuosité des vaisseaux rétiens

Figure 9: Classification des rétinopathies du prématuré selon deux critères: la zone et le stade

2) Traitements

Il existe différents stades de gravité de la maladie mais la plupart des formes dépistées sont mineures et guérissent spontanément sans séquelles fonctionnelles. Toutefois, certaines formes plus avancées peuvent nécessiter une prise en charge spécialisée (photocoagulation au laser) et pour les formes les plus sévères un traitement chirurgical, avec un pronostic plus réservé. Le dépistage précoce de cette rétinopathie reste essentiel et est réalisé lors du séjour de ces enfants en réanimation néonatale ou en néonatalogie par un examen de fond d'œil, puis le suivi en consultation se poursuit au moins pendant la première année de vie, en étroite collaboration avec les pédiatres.

La photocoagulation au laser est le traitement de référence et a pour objectif de détruire la rétine avasculaire périphérique. Elle consiste à appliquer un laser à la périphérie avasculaire de la rétine pour les rétinopathies du prématuré de type:

- Zone I: stade 3 ou stade 1 or 2 avec maladie supplémentaire
- Zone II: stade 2 ou 3 avec maladie supplémentaire

Pour les formes plus sévères de rétinopathies avec un décollement total de la rétine déjà observé, une vitrectomie qui consiste à remplacer le vitré par une solution saline peut être pratiquée. Cette chirurgie présente environ 25-50% de succès et peut augmenter le risque de glaucomes et cataractes (Hartnett & Penn 2012).

D'autre part, des thérapies anti-angiogéniques anti-VEGF sont utilisées pour les formes de stade 3 et touchant la zone I. Ces thérapies ont pour but de réduire les effets du VEGF, à savoir principalement de diminuer la néovascularisation. Ainsi, une étude a montré qu'un traitement par l'anticorps monoclonal anti VEGF bevacizumab administré par voie intra-vitréenne, associé à une photocoagulation au laser, permet d'obtenir de meilleurs résultats (Mintz-Hittner et al 2001). Cependant, l'utilisation de ces thérapies anti-VEGF a été remise en cause. D'autres études ont en effet mis en évidence l'apparition d'effets secondaires graves suite à une thérapie avec des agents anti-VEGF chez des prématurés, notamment un décollement de la rétine, une persistance de la zone avasculaire périphérique et une néovascularisation intravitréenne récurrente (Hu et al 2012, Ittiara et al 2013, Sato et al 2012). La dose, la posologie et le type d'agent anti-VEGF qui peuvent réduire les formes sévères de rétinopathie du prématuré sans altérer le développement de l'œil ou d'autres organes sont actuellement en étude.

B. Rétinopathie diabétique

1) Physiopathologie

Les diabètes affectent plus de 300 millions de personnes dans le monde et devraient toucher environ 500 millions de personnes en 2030 (Fédération Internationale des diabètes, 2011). Des études ont montré que presque tous les patients atteints de diabète de type 1 et plus de 60% des patients atteints du diabète de type 2 développent une rétinopathie plus ou moins sévère au bout de 20 ans. D'autre part, des études de populations suggèrent qu'un tiers des patients diabétiques ont des signes de rétinopathies et qu'un dixième montrent des troubles importants de la vision liés à une rétinopathie (Robinson et al 2012, Wong et al 2006, Zhang et al 2010).

La rétinopathie diabétique est une complication microvasculaire majeure du diabète et reste l'une des principales causes de cécité dans le monde. Ainsi, un diagnostic précoce et une prévention de la rétinopathie chez chaque diabétique sont indispensables pour prévenir la perte de la vision chez ces patients. Cliniquement, la rétinopathie diabétique peut être classée en rétinopathie non proliférante (RDNP) et en rétinopathie proliférante (RDP) (Cheung et al 2010). La RDNP est la forme la plus fréquente et se caractérise par la présence de micro-anévrismes et de taches hémorragiques signes d'ischémie rétinienne et est subdivisée en différents stades de progression: légère, modérée et sévère. La forme sévère, appelée également rétinopathie pré-proliférante, présente des altérations microvasculaires de la rétine plus importantes. En l'absence de traitement de cette forme, celle-ci peut évoluer vers une RDP qui se caractérise par une néovascularisation anormale de la rétine et la présence d'hémorragies dans la rétine et le vitré, entraînant *in fine* un détachement de la rétine. Enfin, un œdème maculaire peut être observé à tous les stades dans les RDNP et RDP et est à présent la première cause de cécité chez les patients atteints de rétinopathie diabétique (Cheung et al 2010) (Figure 10).

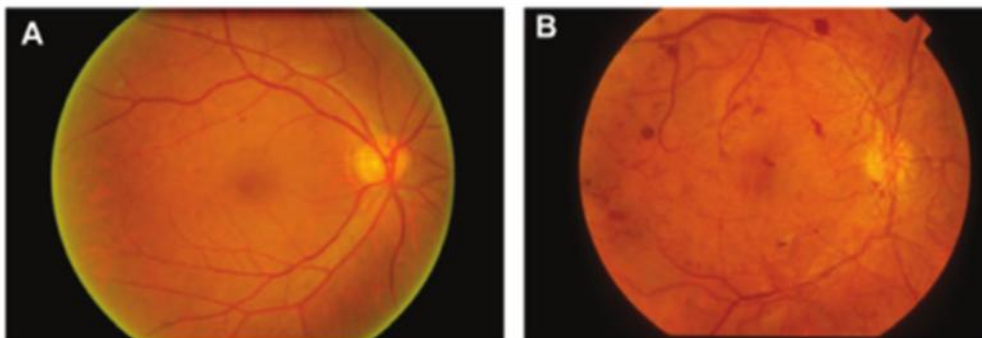


Figure 10: Fond d'œil de patients atteints (A) de rétinopathie diabétique non proliférante (RDNP) et (B) de rétinopathie diabétique proliférante (RDP). D'après (Robinson et al 2012).

Les trois principaux facteurs de risque de la rétinopathie du diabétique sont un diabète prolongé, une hyperglycémie et une hypertension (Robinson et al 2012, Wong et al 2006). Des preuves émergentes suggèrent une composante génétique pour la rétinopathie diabétique, cependant aucun gène spécifique associé à la pathologie n'a été clairement identifié malgré de nombreuses études (Abhary et al 2009, Liew et al 2006, Sobrin et al 2011).

La pathogenèse du développement de la rétinopathie diabétique est complexe et fait intervenir de multiples mécanismes interconnectés qui conduisent à des altérations de la cellule et à des changements adaptatifs de la rétine (Robert & Frank 2004). Ainsi, la cause fondamentale de la RD n'a pas été complètement élucidée malgré de nombreuses études. Depuis quelques années, la rétinopathie a été largement caractérisée par des anomalies microvasculaires, incluant une dysfonction endothéliale, une perméabilité vasculaire accrue, une occlusion et dégénérescence vasculaires (Curtis et al 2009). Plus récemment, des études ont montré que les complications dans la rétine chez le diabétique sont la résultante d'altérations structurelles et fonctionnelles à la fois du compartiment microvasculaire mais aussi de la neuroglie (Barber et al 2011, Curtis et al 2009, Villarroel et al 2010). Les mécanismes exacts par lesquels l'hyperglycémie initie les altérations vasculaires et neuronales n'ont pas été entièrement identifiés. Cependant, il a été proposé que les dommages cellulaires dans la rétine seraient causés notamment par une augmentation du flux par la voie des polyols, d'une production accrue de produits terminaux issus de la glycation (AGE), d'une augmentation du stress oxydatif, d'une activation de la protéine kinase C (PKC) (Cheung et al 2010, Robert & Frank 2004) et d'une inflammation (Liou 2010, Tang & Kern 2011) conduisant à la sécrétion ainsi qu'à l'activation de cytokines et de facteurs de croissance tels que VEGF, IGF1, endothéline-1, TNF α ou angiopoïétine2. La néovascularisation pathologique dans la rétine chez le patient diabétique résulte d'une dérégulation de la balance entre facteurs pro- et anti-angiogéniques (Khan & Chakrabarti 2007, Wirostko et al 2008). Toutefois, ces différentes hypothèses devront être vérifiées par des études et essais cliniques chez l'homme (Figure 11).

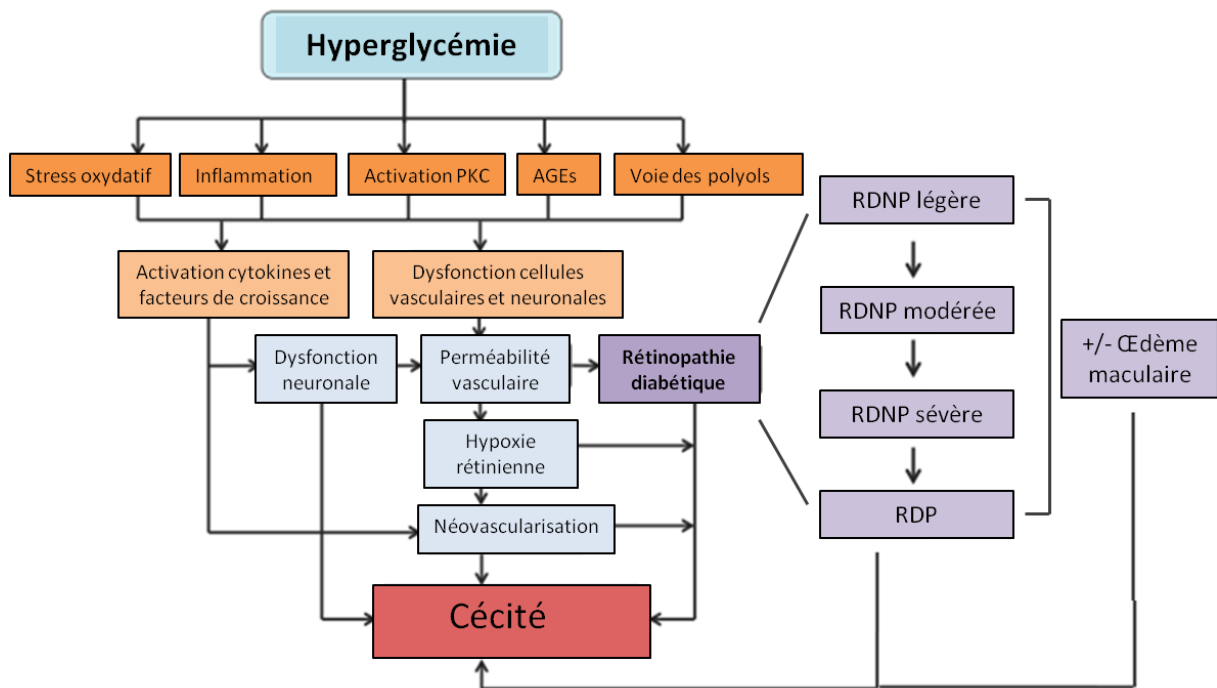


Figure 11: Facteurs influençant la pathogénèse de la rétinopathie diabétique et les différents stades de la pathologie. PKC: phospho kinase C, AGE: produits de glycation avancée, RDNP: rétinopathie diabétique non proliférante, RDP: rétinopathie diabétique proliférante. D'après (Robinson et al 2012).

2) Traitements

La prise en charge de la rétinopathie diabétique (RD) dépend du stade de la maladie et cherche à ralentir ou à prévenir l'évolution de la maladie. La prévention des complications des RD mettant en jeu le pronostic visuel est préférable au traitement d'une affection déjà bien établie. Ainsi, les interventions sont plus efficaces si elles sont mises en place avant la survenue d'une rétinopathie significative. Compte-tenu de l'importance d'un diagnostic précoce, tous les patients diabétiques devraient faire l'objet de bilans de routine pour identifier la RD à un stade soignable.

La photocoagulation au laser reste le traitement ophtalmique de référence pour la rétinopathie diabétique menaçant la vision. Les deux types de traitements au laser pour une rétinopathie diabétique sont la photocoagulation panrétinienne pour une rétinopathie proliférante et la photocoagulation au laser focale pour l'œdème maculaire diabétique. Le but de la photocoagulation panrétinienne consiste à brûler différentes zones réparties sur toute la rétine, en épargnant la macula afin de promouvoir la régression et l'arrêt de la progression de la néovascularisation rétinienne, en diminuant la production de VEGF induite par l'ischémie. Pour la photocoagulation

focale, le mécanisme d'action n'est pas vraiment connu. Il agirait plutôt en stimulant les mécanismes de réabsorption de l'œdème rétinien (Cheung et al 2010, Mohamed et al 2007).

La vitrectomie est indiquée dans le traitement des formes avancées de RD, dont la RD proliférante avec hémorragie du vitré ou avec fibrose, et de l'œdème maculaire persistant avec traction du vitré. Cette intervention chirurgicale consiste à retirer le vitré de l'œil et lever d'éventuelles tractions vitréo-réiniennes. La vitrectomie fait généralement suite à un traitement par laser ou est associée au laser (Stefansson 2009)(Diabetic Retinopathy Clinical Research Network , 2010).

D'autre part, des résultats d'essais cliniques randomisés ont montré que l'injection intra-vitréenne de corticoïdes (acétonide de triamcinolone) conduit à une amélioration significative de l'œdème maculaire et de l'acuité visuelle. Plus récemment, l'utilisation d'implants réiniens ou intravitréens permettant l'administration prolongée de corticostéroïdes (acétonide de fluocinolone ou de dexaméthasone) chez des patients atteints d'œdème maculaire a montré des résultats bénéfiques similaires (Network et al 2012, Yilmaz et al 2009).

Enfin, les produits réduisant les effets du VEGF injectés en intra-vitréen ont pour objectif de réduire la perméabilité et la néovascularisation, qui caractérisent l'œdème maculaire et la RD proliférante. Sur la base de résultats préliminaires prometteurs dans la RD (augmentation de l'acuité visuelle, réduction de l'œdème), des essais cliniques randomisés ont été menés ou sont encore en cours pour évaluer trois produits inhibant les effets du VEGF. Les produits à l'étude sont le ranibizumab (un fragment d'anticorps recombinant humanisé contre toutes les isoformes de VEGF-A (Lee et al 2009, Network et al 2012) et le bevacizumab (Cheung et al 2014, Lazic & Gabric 2007). Le ranibizumab a été approuvé pour le traitement de l'œdème maculaire en Europe (Agence européenne du médicament, EMEA, janvier 2011). Plusieurs autres antagonistes du VEGF font actuellement l'objet d'investigations comme traitement potentiel de la RD, dont l'aflibercept connu également sous la dénomination «VEGF Trap-Eye» (une protéine de fusion recombinante active contre toutes les isoformes VEGF-A et le facteur de croissance placentaire) (Moradi et al 2013).

Partie 2: Le système Wnt/Frizzled

La signalisation Wnt/Frizzled (Wnt/Fzd) met en jeu des morphogènes Wnt qui agissent en tant que ligands pour activer des voies de signalisation, et ce, par le biais de récepteurs Frizzled (Fzd). Le système Wnt/Fzd met en jeu 19 ligands Wnt et 10 récepteurs Frizzled et active différentes voies de signalisation. Des études ont émis l'hypothèse que certains Wnt activeraient préférentiellement la voie de signalisation Wnt canonique, tandis que d'autres activeraient les voies de signalisation non-canoniques. Plusieurs membres du système Wnt/Fzd possèdent un profil d'expression spatio-temporel et pourraient interagir de façon spécifique, permettant une régulation fine de la réponse initiée par l'activation du système (Angers & Moon 2009).

Depuis plusieurs années, les fonctions de ce système ont fait l'objet de nombreuses études génétiques. Ainsi, les voies Wnt/Fzd contrôlent divers processus cellulaires et biologiques et interviennent notamment dans la régulation de nombreuses propriétés et fonctions cellulaires (adhésion, prolifération, migration, apoptose, polarité, différenciation). Ce système joue un rôle essentiel au cours de l'embryogenèse (convergence-extension, formation de la crête neurale, formation de l'axe antéro-postérieur) et participe au développement et à la maturation tissulaire (système nerveux central, système cardiovasculaire). Enfin, les composants de la voie de signalisation Wnt ont été reliés chez l'homme à diverses pathologies telles que les cancers, l'ostéoporose ou encore la maladie d'Alzheimer (Angers & Moon 2009).

I. Structure et fonctions des ligands Wnt, des récepteurs Fzd et des partenaires Dishevelled

A. Structure

Les ligands Wnt sont des glycoprotéines riches en cystéine. Au moins 19 membres de la famille Wnt ont été décrits à ce jour et la plupart d'entre eux sont très conservés dans l'évolution (Huelsenken & Birchmeier 2001). Bien que les membres de la famille Wnt aient un haut degré de similarité de séquence, l'expression de différentes protéines Wnt peut aboutir à des résultats très différents en termes de signalisation (Mikels & Nusse 2006). Pour devenir fonctionnelles, les protéines Wnt subissent des modifications post-traductionnelles dont la glycosylation et la palmitoylation (Kikuchi et al 2007). Ces caractéristiques physico-chimiques combinées conduisent à des difficultés pour purifier ces protéines Wnt. Les différences de phénotype observées ont permis de distinguer deux sous-classes parmi la famille des Wnt qui activeraient deux voies de signalisation différentes: la sous-famille comprenant Wnt1, 3a, 7a, 7b et 8 activerait préférentiellement la voie canonique; et la sous-

famille comprenant Wnt2, 4, 5a, et 11 activerait plutôt les voies non canoniques (Veeman et al 2003, Wallingford et al 2002).

Il a été suggéré que plusieurs classes de récepteurs et corécepteurs (Fzd, Lrp, Ryk, Ror) peuvent interagir avec les protéines Wnt. Les récepteurs de la voie Wnt les plus étudiés sont les membres de la famille Frizzled. Ces récepteurs Fzd sont des protéines à sept domaines transmembranaires avec un grand domaine extracellulaire N-terminal (Schulte & Bryja 2007). Les gènes Frizzled ont d'abord été identifiés chez la Drosophile lors d'études portant sur les mutations qui perturbent la polarité des cellules épidermiques (Wang et al 1996). Chez les mammifères, 10 membres de la famille ont été décrits à ce jour. Il a été également mis en évidence que les membres de la famille Lrp (Lipoprotein receptor related proteins) agissent comme des corécepteurs de la voie Wnt (Huelsenken & Birchmeier 2001). L'analyse des séquences en acides aminés suggère que les dix gènes Frizzled retrouvés chez l'Homme se répartissent en quatre groupes principaux. Fzd1, Fzd2 et Fzd7 partagent environ 75% de leur identité, Fzd5 et Fzd8 70%, Fzd4, Fzd9 et Fzd10 65% et Fzd3 et Fzd6 50% (Fredriksson et al 2003). Les gènes entre les différents clusters partagent entre 20% et 40% de similarité de séquence (Figure 12).

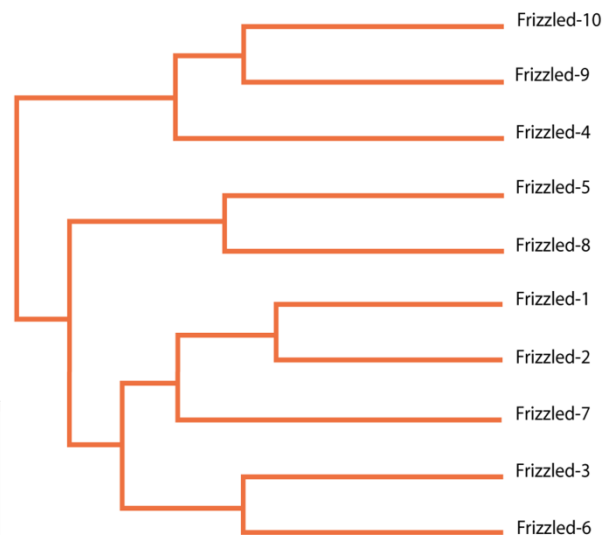


Figure 12: Arbre phylogénétique des récepteurs Frizzled. Le récepteur Fzd7 est phylogénétiquement plus proche de Fzd1 et Fzd2 avec lesquels il partage 75% d'identité. D'après R&D Systems.

La structure des récepteurs Frizzled est conservée de la Drosophile à l'Homme. La plus grande divergence d'identité pour les domaines cytoplasmiques des récepteurs Frizzled se trouve dans la

queue C-terminale. Les récepteurs Fzd peuvent être considérés comme des récepteurs membranaires composés de trois domaines principaux (Wang et al 1996). La partie N-terminale contient un domaine N-terminal ou cystéine riche domain (CRD) qui participe (avec ou sans corécepteurs, comme Lrp5/6) à la liaison de l'agoniste (par exemple Wnt) ou antagoniste (par exemple, les ligands soluble-Frizzled-related protein (sFRP) ou les ligands Dickkopf) (Hsieh 2004). La région transmembranaire est composée de sept hélices alpha hydrophobes qui traversent la bicouche lipidique. Trois boucles intracellulaires (iLoop1, iLoop2 et iLoop3) et une queue cytoplasmique communiquent en aval avec les éléments de signalisation cytoplasmiques. Le motif C-terminal « Ser/Thr-XXX-Val » constitue un domaine de liaison pour les protéines possédant un domaine PDZ (Figure 13). On retrouve ce motif chez les Fzd1, 2, 4, 5, 7, 8 et 10 mais pas chez les Fzd3, 6 et 9. La taille des protéines des membres de la famille Frizzled varie de 537 (hFzd4, la plus courte) à 706 (hFzd6, la plus longue) résidus d'acides aminés (Chen et al 2004, Wang et al 2006).

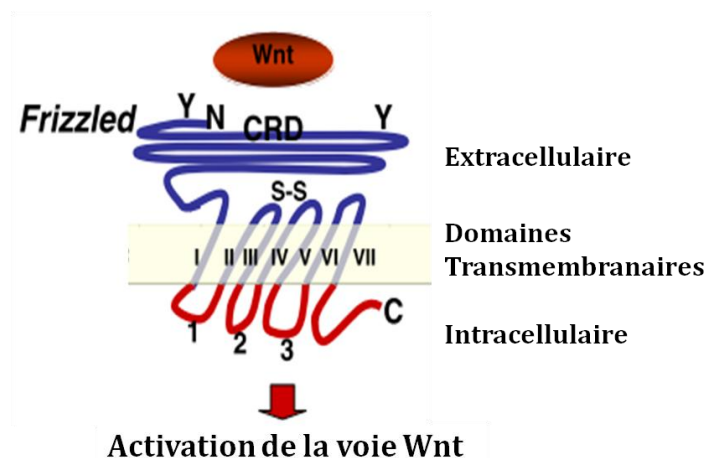


Figure 13: Structure des récepteurs Frizzled. Les facteurs Wnt se lient aux récepteurs Fzd avec une forte affinité via le domaine Cysteine-Rich Domain (CRD) de Fzd. La région transmembranaire est composée de sept hélices alpha hydrophobes. Trois boucles intracellulaires et une queue cytoplasmique communiquent en aval avec les éléments de signalisation cytoplasmiques. D'après (Wang et al 2006).

Les récepteurs Frizzled peuvent activer les 3 principales voies de signalisation du système Wnt/Fzd. Cependant, les mécanismes biochimiques par lesquels la liaison du ligand Wnt au récepteur Fzd induit une transduction du signal restent encore mal compris. Les facteurs Wnt se lient aux récepteurs Fzd avec une forte affinité via le domaine CRD de Fzd (Dann et al 2001). Ce domaine qui est nécessaire à la fixation des ligands ne semble pas indispensable à la transduction du signal

(Povelones & Nusse 2005). En revanche, la dimérisation des récepteurs Fzd pourrait à elle seule induire l'activation de la voie canonique (Carron et al 2003).

La protéine cytoplasmique Dishevelled (Dvl) est considérée comme plaque tournante du système Wnt/Fzd. Les protéines Dvl ont été identifiées dans les modèles d'étude pour lesquels la voie Wnt/Fzd a été décrite, notamment chez le xénope, la souris et l'homme. Chez les mammifères, il existe 3 homologues du gène *Dvl* de la drosophile : *Dvl1*, 2 et 3 (Seménov & Snyder 1997, Sussman et al 1994, Yang et al 1996).

Dvl est un composant essentiel de la voie Wnt/Fzd puisqu'il participe à l'activation des voies de signalisation. En effet, la liaison spécifique entre un ligand Wnt et un récepteur Fzd aboutit à l'activation de Dvl, laquelle passe par sa phosphorylation et son recrutement à la membrane au niveau de la queue intra-cytoplasmique de Fzd (Schwarz-Romond et al 2007, Wong et al 2003, Yokoyama et al 2007). En fonction de la spécificité de liaison, Dvl va activer un ensemble de protéines spécifiques qui lui sont associées et permettre l'activation de telle ou telle voie.

La capacité de Dvl à orienter le signal vers une voie de signalisation plutôt qu'une autre semble provenir de la structure même de cette protéine (Figure 14). En effet, Dvl est une protéine qui fait environ 500 à 600 acides aminés et qui est composée de 3 domaines conservés appelés DIX, PDZ et DEP. Plusieurs études suggèrent que Dvl active les différentes voies de signalisation Wnt/Fzd par le biais des différents domaines (Li et al 1999). Des études par mutations ont permis d'attribuer aux domaines de Dvl des fonctions particulières. Ainsi, des mutations dans le domaine DIX situé en N-terminal affectent préférentiellement la voie de signalisation canonique, tandis que des mutations dans le domaine DEP en C-terminal affectent plutôt la voie PCP (Penton et al 2002, Schwarz-Romond et al 2007, Wallingford et al 2000). Le domaine PDZ est impliqué dans les interactions protéine-protéine (notamment avec les Fzd), dans la transduction du signal et dans les jonctions cellulaires comme les jonctions serrées. De par ses nombreuses associations, le domaine PDZ semble fonctionner à la fois dans les voies canoniques et non canoniques (Grandy et al 2009). Cependant, malgré ces informations, le mécanisme par lequel Dvl transduit sélectivement une voie de signalisation plutôt qu'une autre n'est pas encore clair.



Figure 14: Représentation schématique de la structure modulaire de Dishevelled
D'après (Cadigan & Nusse 1997).

B. Fonctions

Les nombreuses données collectées concernant les fonctions du système Wnt/Fzd proviennent d'études génétiques effectuées sur différents modèles (drosophile, poisson-zèbre, souris) et d'études biochimiques ou de biologie cellulaire réalisées sur le xénope, l'oursin, l'embryon de poulet ou la culture de cellules de mammifères. Il a été mis en évidence que le système Wnt/Fzd intervient dans l'adhésion (Lilien & Balsamo 2005), la différenciation, la polarité, la migration, la prolifération (Eisenberg & Eisenberg 2006, Logan & Nusse 2004, Peifer & Polakis 2000, Speese & Budnik 2007) ou encore la survie et l'apoptose des cellules (Patapoutian & Reichardt 2000, Wodarz 1998). Des études ont démontré l'importance de la voie de transduction Wnt/Frizzled (Fzd) dans le développement et la maturation du système nerveux central (Ikeya et al 1997, Liu et al 1999) et le système cardiovasculaire (Naito et al 2006, Palpant et al 2007, Singh et al 2007). Les altérations de ces voies peuvent ainsi conduire à une morphogenèse anormale et à des malformations congénitales chez l'Homme (Jordan et al 2001, Niemann et al 2004, Rodova et al 2002). Dans les tissus matures, le système Wnt/Fzd est impliqué dans l'auto-renouvellement des cellules souches embryonnaires (Bakre et al 2007), la formation osseuse (Canalis et al 2007) et est responsable du maintien de la cohésion de nombreux tissus (He et al 2004, Reya et al 2003, Willert et al 2003).

Les composants de la voie de signalisation Wnt ont été reliés à la tumorigenèse (Reya & Clevers 2005) dans des pathologies telles que la polypose adénomateuse (Munemitsu et al 1995), le cancer du colon (Morin et al 1997), le médulloblastome (Dahmen et al 2001, Sauvageot et al 2007) et le cancer des poumons (Xi & Chen 2014, Xu et al 2007). D'autres études ont révélé que le dysfonctionnement de la voie Wnt/Fzd peut conduire à des maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer (Balaraman et al 2006, Rios et al 2014, Tang 2014), à l'ostéoporose (Colaïanni et al 2014, Kahn 2014) et à des maladies cardiovasculaires dont l'insuffisance cardiaque (Barandon et al 2005, van de Schans et al 2007).

Les résultats recueillis au cours de ces années ont été réunis sur un site élaboré et fréquemment mis à jour par l'équipe de Roel Nusse à l'Université de Stanford « The Wnt Homepage » (<http://web.stanford.edu/group/nusselab/cgi-bin/wnt/>) et ont été reportés en annexes Tableaux 3-5.

II. Voies Wnt/Frizzled

Le système Wnt/Fzd est schématiquement subdivisé en deux voies :

- la voie Wnt canonique, dépendante de la β -caténine
- les voies de signalisation indépendantes de la β -caténine subdivisée en deux voies:
 - la voie de la polarité cellulaire planaire (PCP)
 - la voie dépendante du calcium.

Malgré les nombreuses investigations et études qui ont été menées sur le système Wnt/Fzd, notre connaissance de ces voies de signalisation, bien qu'ayant beaucoup progressée, reste à ce jour incomplète. En effet, l'existence de dix-neuf Wnt et de dix Fzd conduit à une multiplicité d'interactions possibles et explique la complexité de ce système. D'autre part, en plus des ligands Wnt et des récepteurs Fzd, il existe un grand nombre d'autres molécules pouvant réguler et moduler ces voies de signalisation rendant ainsi ce système très complexe.

A. Voie Wnt canonique

La voie Wnt/ β -caténine également appelée voie Wnt canonique est la voie de signalisation Wnt la plus étudiée (Kikuchi et al 2006, Nelson & Nusse 2004). Cette voie fait intervenir en tant que second messenger, la β -caténine qui a d'abord été caractérisée en tant que protéine d'échafaudage qui relie schématiquement la queue cytoplasmique de cadhérines classiques (la VE-cadhérine et la N-cadhérine) au cytosquelette d'actine *via* l' α -caténine.

En absence de stimulation par les ligands Wnt, la β -caténine cytosolique est recrutée dans un complexe qui va permettre sa dégradation et contribuer au maintien de niveaux d'expression cytoplasmiques bas de cette protéine. Ce complexe est composé de l'Axin2, des gènes suppresseurs de tumeur APC (adenomatous poliposis coli), de la caséine kinase 1 bis (CK1A) et de la glycogène synthase kinase-3 β (GSK-3 β). APC et Axin2 se lient à la β -caténine nouvellement synthétisée et servent de protéines d'échafaudage dans la séquestration de la β -caténine (Hinoi et al 2000). Cette dernière est ainsi phosphorylée sur des résidus sérine/thréonine à son extrémité N-terminale (codée par l'exon 3) par la CK1A, puis elle fait l'objet de trois autres phosphorylations par la GSK-3 β . La β -caténine phosphorylée induit le recrutement et la liaison de l'ubiquitine ligase E3 β -TrCP qui transforme la β -caténine en une cible pour la dégradation par le protéasome. En conséquence, les niveaux de β -caténine libre dans les cellules restent faibles. Le facteur de transcription TCF (T-cell factor)/LEF (Lymphoid enhancer binding factor) reste complexé avec Groucho qui assurent la

répression des gènes cibles de Wnt et la formation du complexe nucléaire TCF/LEF/ β -caténine est empêchée (Kimelman & Xu 2006).

Ainsi, dans l'état «off» de la signalisation Wnt, la GSK-3 β est constitutivement active et les cellules maintiennent de faibles niveaux cytoplasmiques et nucléaires de β -caténine tandis qu'une autre partie se retrouve associée aux cadhérines présentes à la membrane plasmique (Nelson & Nusse 2004) (Figure 15, gauche).

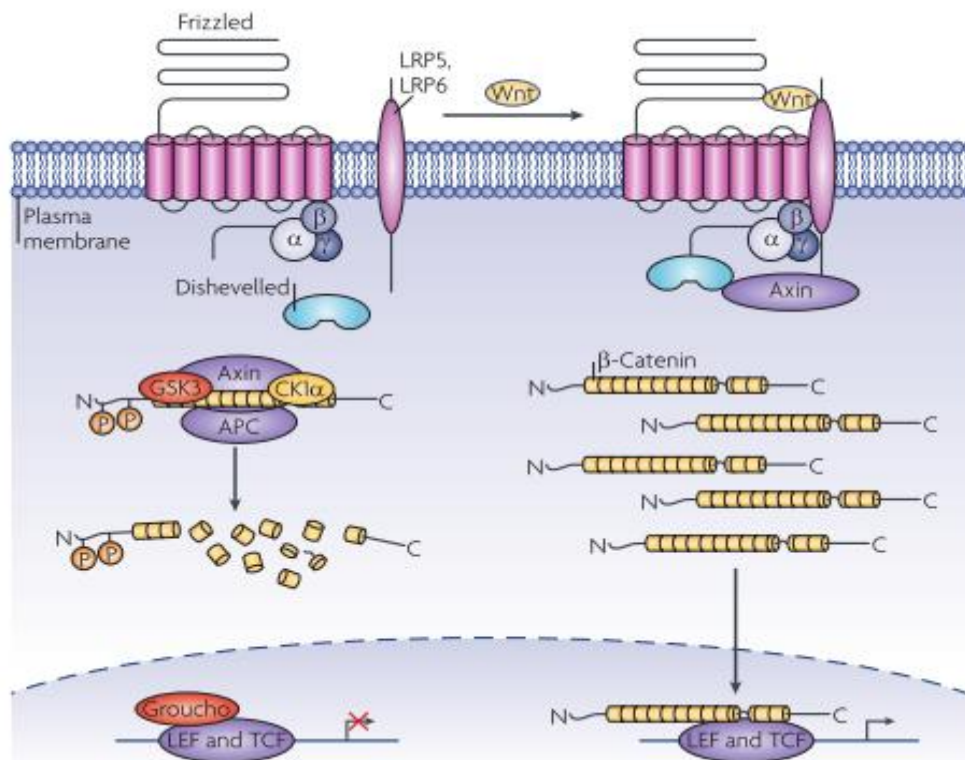


Figure 15: La voie Wnt canonique

A gauche, état «off» de la signalisation Wnt: lorsque les récepteurs Fzd ne sont pas liés à des protéines Wnt, un complexe de dégradation de la β -caténine, composé de nombreuses protéines dont l'APC et l'Axin, se forme. Ces protéines se lient à la β -caténine et conduisent à sa phosphorylation. Ceci conduit au recrutement d'une ubiquitine ligase E3, qui transforme la β -caténine en une cible pour la dégradation par le protéasome.

A droite, état «on» de la signalisation Wnt: la formation du complexe Wnt/Fzd/Lrp inhibe l'activité kinase du complexe de dégradation de la β -caténine. La β -caténine n'est plus dégradée, va s'accumuler dans le cytoplasme et être transloquée dans le noyau pour interagir avec les facteurs TCF/LEF liés à l'ADN et transactiver l'expression de gènes cibles. D'après (Angers & Moon 2009).

La signalisation Wnt/ β -caténine est engagée quand un ligand Wnt se lie à un complexe formé par un récepteur transmembranaire Fzd et un corécepteur Lrp5/6 (Cong et al 2004).

La protéine Dvl est alors phosphorylée, activée, recrutée à la membrane et permettrait ainsi le recrutement de l'Axin (et du reste du complexe de dégradation) à la membrane qui peut alors interagir avec la queue intra-cytoplasmique de Lrp 5/6. L'Axin est alors dégradée, ce qui favorise le désassemblage du complexe de dégradation et protège la β -caténine cytosolique (Cliffe et al 2003, Tolwinski et al 2003). L'activation de Dvl entraîne également l'inhibition de la GSK-3 β , ce qui permet de diminuer la phosphorylation de la β -caténine et sa dégradation. Ainsi, l'activation de la voie canonique permet une stabilisation post-traductionnelle de la β -caténine par une dégradation de l'Axin et une inhibition de la GSK-3 β qui sont dépendantes des Wnt. A mesure que le taux de β -caténine cytosolique augmente, celle-ci peut être transloquée dans le noyau pour interagir avec les facteurs LEF/TCF liés à l'ADN et transactiver l'expression de gènes cibles (Figure 15, droite).

La voie Wnt canonique joue un rôle important au cours du développement mais intervient également dans la régulation de la prolifération, la différenciation, l'apoptose cellulaire et l'homéostasie tissulaire. On a pu mettre en évidence une dérégulation de cette voie dans plusieurs pathologies, notamment dans les cancers. Cette voie participant à de nombreux processus cellulaires et biologiques régulent de nombreux gènes cibles (Logan & Nusse 2004, MacDonald et al 2009, Vlad et al 2008).

Parmi ces gènes, on peut citer c-myc (He et al 1998), c-jun (Mann et al 1999), la E-cadhérine (Anna et al 2003), le VEGF (Zhang et al 2001) les métalloprotéases matricielles comme la MMP7 (Brabletz et al 1999), MMP2 et 9 (Wu et al 2007), les éphrines EphB/ephrin-B (Batlle et al 2002). Les composants de la voie Wnt, incluant Wnt3A (Zhang et al 2009), Fzd7 (Willert et al 2002), Axin2 (Jho et al 2002), TCF/LEF (Filali et al 2002) sont également régulés par la voie β -caténine.

D'autres gènes cibles ont été identifiés et permettent de mieux comprendre la régulation de nombreux processus biologiques par cette voie de signalisation. Une liste de ces gènes cibles est mise à jour régulièrement et peut être consultée sur le site:

http://web.stanford.edu/group/nusselab/cgi-bin/wnt/target_genes

B. Voies Wnt non canoniques

Pendant plusieurs années, la recherche dans le domaine de la signalisation Wnt/Fzd s'est focalisée sur la voie canonique dépendante de la β -caténine. Cependant, depuis ces 15 dernières années, un nombre croissant de travaux viennent démontrer l'implication de voies non canoniques, indépendantes de la β -caténine (Veeman et al 2003). Ces voies restent encore moins bien caractérisées que la voie canonique mais peuvent être divisées en 2 branches distinctes: la voie de polarité planaire cellulaire (PCP ou Planar Cell Polarity) et la voie calcium-dépendante (Wnt/Ca²⁺). Les

voies de signalisation non canoniques ont été mises en évidence dans les mouvements cellulaires de convergence-extension ayant lieu lors de la gastrulation des vertébrés (Myers et al 2002), en particulier chez le xénope (Du et al 1995) (Figure 16).

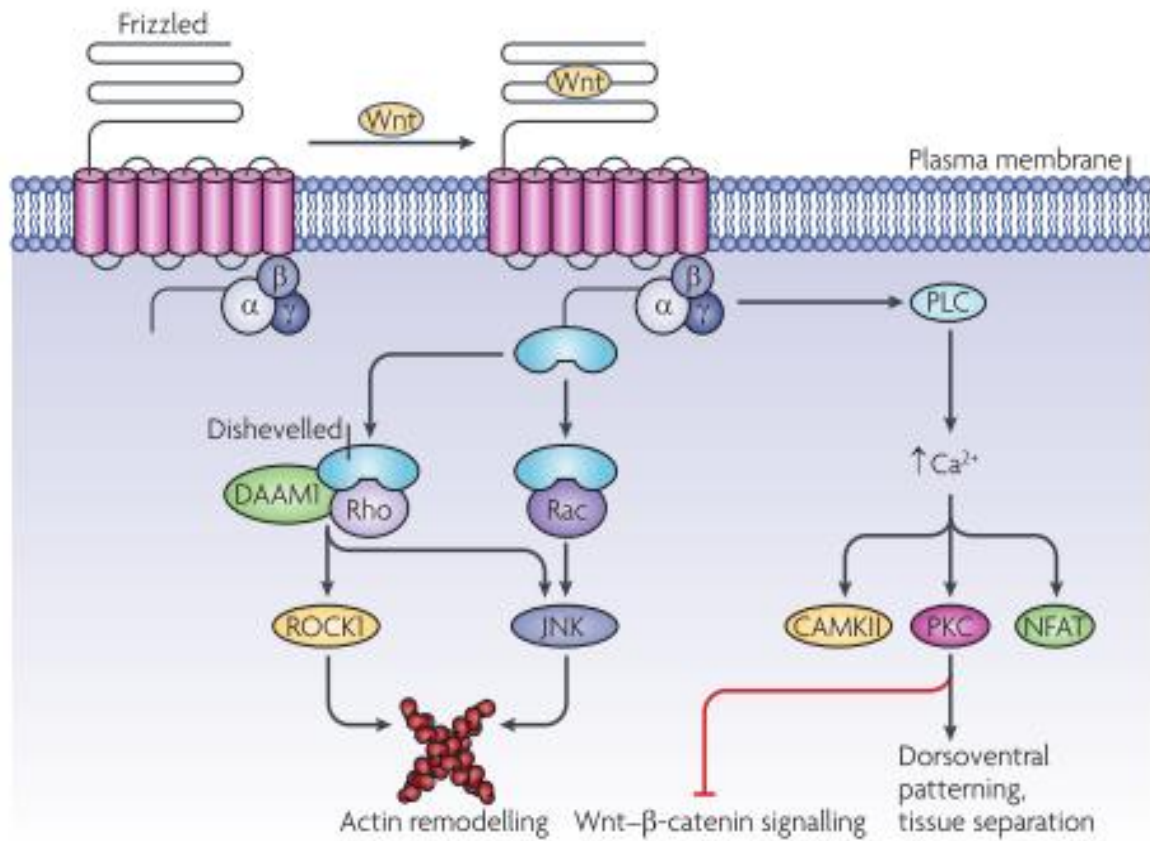


Figure 16: Les voies Wnt non canoniques.

Les récepteurs Fzd engagent leur protéine G hétérotrimérique (composée des sous-unités α , β et γ) et/ou les protéines Dvl pour initier les voies de signalisation non canoniques.

A gauche, la voie de polarité cellulaire planaire (PCP): Cette voie entraîne l'activation des petites GTPases (small G proteins) Rho et Rac pour réguler le cytosquelette d'actine. Dishevelled-associated activator of morphogenesis 1 (DAAM1), lorsqu'il est complexé avec Dishevelled et Rho, active la Rho-associated protein kinase 1 (Rock1), tandis que le complexe Dishevelled-Rac GTPase active jun kinase N-terminal (JNK) et interviennent ainsi dans le remodelage de l'actine.

A droite, la voie dépendante du Calcium: Cette voie entraîne l'activation de la phospholipase C (PLC) et induit une augmentation de la concentration et des flux de Ca^{2+} intracellulaires qui conduit à l'activation de la calmodulin-dependent protein kinase (CaMKII), de la protéine kinase C (PKC) et du facteur de transcription nucléaire des cellules T (NFAT). D'après (Angers & Moon 2009).

1) La voie de la polarité cellulaire planaire

La voie de signalisation PCP, découverte tout d'abord chez la drosophile, est un mécanisme conservé de régulation de l'organisation du tissu épithélial. En effet, les cellules de l'épithélium possèdent une polarité apico-basolatérale et sont également polarisées le long du plan de la couche épithéliale. Chez la drosophile, cette organisation régit l'orientation des structures comprenant l'orientation des follicules pileux, les soies et l'organisation hexagonale des ommatidies de l'œil (Fanto & McNeill 2004, Zallen 2007). Chez les vertébrés, ce système est à la base de l'organisation des cils de l'épithélium sensoriel dans l'oreille interne (Montcouquiol et al 2003), de l'orientation des poils (Guo et al 2004) et de la migration des cellules mésodermes dorsales durant la gastrulation (Wang & Nathans 2007). Plus récemment, des études ont montré que la voie PCP est impliquée dans des processus physiologiques du développement tels que la migration neuronale, la guidance des axones et l'organogenèse du cœur, du poumon, du rein et de l'œil (Gessert & Kuhl 2010, Jiang et al 2013, Tissir & Goffinet 2010, Wang 2009, Yates & Dean 2011).

La voie PCP met en jeu la régulation du cytosquelette d'actine pour une organisation polarisée des structures et une migration dirigée. Comme pour la voie canonique, l'activation de la voie PCP requiert l'activation de récepteurs Fzd et le recrutement de Dvl à la membrane. Cependant, après la relocalisation de Dvl à la membrane, on peut observer une activation de deux branches indépendantes faisant intervenir les petites GTPases Rho et Rac (Gao & Chen 2010, Habas et al 2003, Tahinci et al 2007). La première branche active Rho et la molécule DAAM1 (Dishevelled associated activator of morphogenesis 1) qui activent ensuite ROCK (Rho-associated kinase) (Habas et al 2001, Ju et al 2010). La deuxième branche implique l'activation de Rac puis de Jun-N-terminal kinase (JNK) (Fanto & McNeill 2004, Kikuchi et al 2007) (Figure 16, gauche).

2) La voie dépendante du calcium

La voie Wnt/Ca²⁺ reste la voie de signalisation Wnt/Fzd la moins décrite, mais il a été démontré que cette voie intervient dans des processus importants au cours du développement ou en pathologie (Henry Ho et al 2012). La voie Wnt/Ca²⁺ joue ainsi un rôle dans la polarité dorso-ventrale et les mouvements de convergence-extension (Kühl et al 2000, Lin et al 2010) et est également impliquée dans les cancers (Dissanayake et al 2007, Pukrop et al 2006).

Cette voie de signalisation Wnt non canonique fait intervenir la liaison de protéines Wnt sur des récepteurs Fzd, le recrutement de Dvl et l'activation de la phospholipase C (PLC) en aval. Ceci entraîne une augmentation de la concentration du calcium intracellulaire (Kikuchi et al 2007, Pandur et al 2002) et induit l'activation de plusieurs cibles en aval y compris la protéine kinase C (PKC) et la Calcium calmoduline kinase II (CaMKII) (Pongracz & Stockley 2006). Le taux élevé de Ca²⁺ peut

également activer la calcineurine phosphatase qui induit la déphosphorylation du facteur de transcription nucléaire des cellules T (NFAT), résultant en une accumulation de NFAT dans le noyau et une activation de gènes cibles (van Es et al 2003) (Figure 16, droite).

III. Autres co-récepteurs et ligands des voies Wnt/Fzd

Plusieurs études récentes ont élargi notre connaissance du répertoire des co-récepteurs et ligands modulateurs (activateurs ou inhibiteurs) des voies Wnt/Fzd. Ainsi, de nombreuses protéines solubles et sécrétées peuvent agir comme des agonistes ou antagonistes des voies de signalisation Wnt/Fzd.

A. Co-récepteurs Lrp5/6

Lrp5 et Lrp6 sont des protéines possédant un seul domaine transmembranaire et constituent une sous-famille de la famille des récepteurs low density lipoprotein (LDL), dont les membres jouent divers rôles dans le métabolisme et le développement (Herz & Bock 2002). Les rôles de Lrp5/6 dans la voie de signalisation Wnt ont été découverts par des études génétiques. Les souris mutantes pour Lrp5 et 6 présentent des phénotypes touchant le développement et semblables à ceux causés par des mutations de plusieurs protéines Wnt (Kato et al 2002, Kelly et al 2004, Pinson et al 2000). De plus, une mutation de Lrp6 dans le domaine intracellulaire conduit à une protéine totalement inactive et bloque la voie de signalisation Wnt/Fzd (Tamai et al 2004). Inversement, les mutants Lrp5/6 au niveau du domaine extracellulaire peuvent activer la voie β -caténine de façon constitutive dans les cellules de mammifères (Liu et al 2003, Mao et al 2001) et chez les embryons de Xénope (Tamai et al 2004). Contrairement aux récepteurs Fzd, qui sont essentiels pour activer les différentes voies de signalisation Wnt, Lrp5/6 semblent être spécifiquement requis pour activer la voie Wnt/ β -caténine (Seménov et al 2001). Chez l'homme des mutations de Lrp5 sont associées à des pathologies osseuse (Boyden et al 2002) et oculaires (Toomes et al 2004).

B. Autres ligands modulateurs des voies Wnt/Fzd

Le premier groupe d'antagonistes inclut les secreted Frizzled-related protein (sFRP) et le Wnt inhibitory factor 1 (WIF-1) qui peuvent se lier directement aux ligands Wnt, les séquestrer et bloquer ainsi les voies canoniques et non canoniques (Bovolenta et al 2008). Ces ligands possèdent des fonctions angiogéniques opposées en fonction de leur concentration et du profil d'expression des récepteurs Fzd (Xavier et al 2014). En effet, il a été démontré que sFRP1 est capable d'activer l'angiogenèse physiologique dans le modèle de membrane chorio-allantoïque du poulet (Dufourcq et al 2002) et la néovascularisation dans un modèle d'ischémie de la patte (Dufourcq et al 2008b). Au

contraire, sFRP1 inhibe l'angiogenèse dans un modèle d'hépto-carcinome (Hu et al 2009). Les propriétés anti-angiogéniques de WIF ont été étudiées *in vivo* dans un modèle tumorale et *in vitro* (Hu et al 2009).

Le deuxième groupe d'antagonistes comprend les 4 protéines de la famille Dickkopf (Dkk1-4). Ces protéines se lient *via* leur domaine C-terminal au co-récepteur Lrp5/6 et empêchent ainsi son interaction avec les ligands Wnt (Semenov et al 2005). Une étude a montré que ces protéines sont capables d'inhiber la croissance tumorale (Niehrs 2006).

D'autres facteurs solubles tels que la Norrin ou la R-spondin peuvent également réguler positivement les voies de signalisation Wnt/Fzd. La Norrin est une protéine sécrétée qui agit comme un facteur de croissance à la fois de manière autocrine et paracrine. Son rôle dans l'angiogenèse a été d'abord décrit dans le développement vasculaire de la rétine (Xu et al 2004, Ye et al 2009) puis dans celui de l'oreille interne et de l'appareil reproducteur femelle (Rehm et al 2002). Les gènes R-spondin représentent une famille de protéines sécrétées conservées (R-spondin1-4) qui sont capables d'induire les voies Wnt/Fzd (Kazanskaya et al 2004) et d'activer la transcription de gènes fortement mitogènes impliquées dans des cancers (Seshagiri et al 2012).

IV. Rôle de la signalisation Wnt/Fzd dans le développement vasculaire

Des données récentes ont démontré, *via* l'analyse des phénotypes de souris mutantes, que la signalisation Wnt/Fzd est impliquée dans différents évènements de la morphogenèse vasculaire. Ainsi, parmi les nombreuses voies de signalisation, les voies Wnt/Fzd apparaissent comme jouer un rôle crucial dans la régulation des différentes étapes cellulaires et moléculaires essentielles à la formation d'un réseau vasculaire fonctionnel dans les différents organes.

A. Expression et signalisation Wnt/Fzd dans les cellules endothéliales

Plusieurs études ont démontré *in vitro* et *in vivo* que la signalisation Wnt/Fzd est présente dans les cellules endothéliales. *In vitro*, les cellules endothéliales peuvent exprimer tous les récepteurs Fzd (Fzd1-10), les co-récepteurs Lrp5/6 ainsi que différents modulateurs de ces voies tels que sFRP1, sFRP3, Dkk1 et Dkk3 et peuvent répondre à différentes protéines Wnt selon le contexte cellulaire ou tissulaire (Dufourcq et al 2008b, Goodwin et al 2006, Masckauchan et al 2005). En effet, les cellules endothéliales ainsi que les cellules murales, les astrocytes, les neurones, les cellules musculaires et les cellules souches mésenchymateuses expriment les protéines Wnt qui agissent alors de manière

autocrine et/ou paracrine et régulent les fonctions des cellules endothéliales durant l'angiogenèse physiologique ou post-ischémique (Goodwin et al 2006, Leroux et al 2010).

Par exemple, les cellules endothéliales expriment Wnt-5a, Wnt-7a et Wnt-10b et les cellules musculaires lisses vasculaires expriment Wnt-5a (Wright et al 1999). *In vivo*, les vaisseaux du placenta expriment Wnt-2 (Monkley et al 1996) et les vaisseaux du sac vitellin de la souris expriment Wnt-5a et Wnt-10b (Ishikawa et al 2001). De plus, Fzd2 est exprimé *in vivo* dans l'aorte et le tronc pulmonaire (van Gijn et al 2001) et les deux Fzd1 et Fzd2 sont exprimés dans l'aorte de rat adulte (Mao et al 2000). Les profils d'expression de ces gènes Fzd semblent varier en fonction de la localisation des vaisseaux, ainsi Fzd2 n'est pas exprimée par les artères pulmonaires, les artères sous-clavière, les artères coronaires ou les veines thoracique au cours du développement embryonnaire chez la souris (van Gijn et al 2001) et ni Fzd1, ni Fzd2 ne sont exprimés par les vaisseaux cardiaques chez le rat adulte (Blankesteyn et al 1997). Enfin, les vaisseaux sanguins du sac vitellin murin expriment Fzd5 (Ishikawa et al 2001).

D'autre part, Phng et al. ont démontré que la voie Wnt canonique est fortement activée dans les vaisseaux sanguins envahissant le cerveau durant l'embryogenèse et durant l'angiogenèse post-natale de la rétine (Phng et al 2009). L'activation de cette voie a donc été mise en évidence durant les stades précoces embryonnaires et post-natals (Corada et al 2010).

De plus, des études *in vivo* ont montré l'implication de la voie Wnt/ β -caténine dans le développement vasculaire. Ainsi, la délétion de la β -caténine dans les cellules endothéliales induit une létalité embryonnaire précoce *in utero* due à une altération de la formation des lumières des vaisseaux et la présence d'hémorragies diffuses (Cattelino et al 2003). Les mutants délétés pour la β -caténine présentent un défaut de différenciation des cellules mésenchymateuses qui entraîne des altérations de la formation des valves du cœur (Liebner et al 2004). De manière assez paradoxale, la stabilisation génétique de la β -caténine induit également un fort phénotype vasculaire avec des altérations des vaisseaux intersomitiques, du bourgeonnement, du remodelage et du branchement vasculaires associées à une perte du caractère veineux notamment au niveau de la rétine (Corada et al 2010).

Enfin, il a été également démontré que la voie Wnt joue un rôle indirect sur l'angiogenèse *via* le maintien et la mobilisation des cellules progénitrices (Aicher et al 2008). Des études récentes ont mis en évidence que la signalisation Wnt est impliquée dans le devenir des cellules souches en participant à la reprogrammation des cellules souches hématopoïétiques et à leur différenciation en cellules endothéliales (Florian et al 2013).

B. Développement placentaire

Les composants de la signalisation Wnt/Fzd jouent un rôle important dans le développement placentaire chez la souris (Sonderegger et al 2007). La voie canonique est essentielle à l'activation, l'adhésion et l'implantation du blastocyste (Xie et al 2008). De plus, les éléments des voies Wnt/Fzd contrôlent différentes étapes du développement placentaire telles que la fusion de la membrane chorio-allantoïque, la morphogenèse du branchement, le développement du labyrinthe et l'angiogenèse placentaire (Cross et al 2006). Ainsi, on observe un défaut d'attachement chorio-allantoïque dans les mutants Wnt7b, R-spondin3 et les doubles mutants Lef1/Tcf1 (Aoki et al 2007, Galceran et al 1999, Parr et al 2001). De plus, les mutants Wnt2 présentent des couches du labyrinthe faiblement développées avec des œdèmes et une vascularisation fœtale diminuée, accompagnée d'un défaut de fusion chorio-allantoïque (Monkley et al 1996). D'autre part, les mutants Fzd5 présentent des défauts d'angiogenèse placentaire et du sac vitellin. En effet, le plexus primaire ainsi que les larges vaisseaux vitellins sont présents jusqu'à E10.5 puis régressent (Ishikawa et al 2001). Plus récemment, les facteurs de transcription Bcl9 et GCM1, impliqués dans la morphogenèse du branchement placentaire, ont été identifiés comme de nouvelles cibles de la voie canonique dans le développement placentaire (Matsuura et al 2011).

C. Vascularisation du cerveau

Dans le système nerveux central (SNC), les réseaux vasculaires se forment par le processus d'angiogenèse qui nécessite la prolifération, le bourgeonnement et la migration des cellules endothéliales. Les vaisseaux cérébraux forment alors une structure protectrice appelée la barrière hémato-encéphalique (BHE) qui maintient l'intégrité et l'homéostasie du tissu cérébral essentielles au bon fonctionnement du SNC. Les principales structures de la BHE qui sont responsables du contrôle des flux para-cellulaires entre cellules épithéliales et endothéliales sont les jonctions serrées (Armulik et al 2010).

Des études récentes ont émis l'hypothèse que certains composants du système Wnt/Fzd, dont la voie canonique, pourraient être des acteurs essentiels à la vascularisation cérébrale et à l'induction de la différenciation de la BHE, étant donné qu'ils semblent être régulés durant l'angiogenèse cérébrale et le développement de la BHE. En effet, il a été démontré que l'expression des ligands Wnt7a et Wnt7b est enrichie dans le SNC et que l'activation de la voie Wnt/ β -caténine est suivie par la formation et différenciation des vaisseaux cérébraux (Stenman et al 2008). Les souris doublement mutées pour Wnt7a/7b présentent des défauts sévères de l'angiogenèse du SNC (Daneman et al 2009). De plus, Wang et al. ont montré que la délétion de Fzd4 dans les cellules endothéliales entraîne une augmentation de la perméabilité de la BHE et que la signalisation Fzd4/Norrin peut réguler les

protéines des jonctions endothéliales (Wang et al 2012). D'autre part, la délétion conditionnelle de la β -caténine dans les CE et l'injection du récepteur soluble Fzd8-CRD (inhibiteur des Wnt) entraînent l'apparition de vaisseaux plus larges et hémorragiques dans le parenchyme cérébral (Daneman et al 2009, Liebner et al 2008) (Figure 17). Il a été également démontré que la voie canonique est essentielle à la maturation des jonctions serrées de la BHE *in vitro* et *in vivo* (Stenman et al 2008). Enfin la claudine 3, marqueur spécifique des CE différenciées du cerveau, est spécifiquement induite suite à une activation par Wnt3a, montrant ainsi que l'activation de la voie Wnt/ β -caténine est une étape importante pour que les CE acquièrent les propriétés caractéristiques du tissu cérébral (Paolinelli et al 2013).

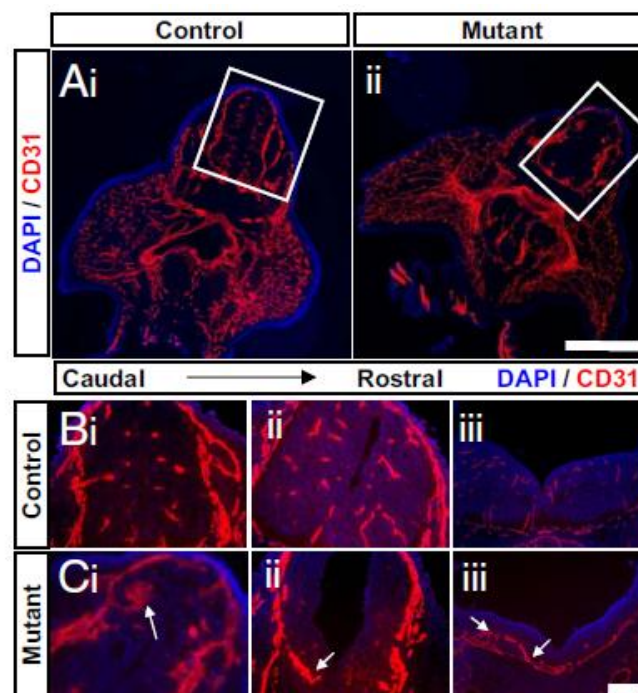


Figure 17: Altérations importantes de la vascularisation du système nerveux central chez les embryons de souris mutées pour la β -caténine dans les cellules endothéliales (notées Mutant). D'après (Daneman et al 2009).

D. Angiogenèse post-natale de la rétine

Les voies Wnt/Fzd jouent un rôle important au cours du développement post-natal de la rétine et interviennent notamment au cours de la régression du réseau hyaloïde primitif qui est toujours présent à la naissance. En effet, Lang et al. ont démontré un rôle critique de Wnt7b sécrétés par les macrophages dans la mort programmée des cellules endothéliales (Lobov et al 2005), tandis que Nathans et al. ont mis en évidence que la mutation de *fzd5* et *fzd4* entraîne des défauts de régression du hyaloïde (Liu & Nathans 2008, Xu et al 2004, Zhou et al 2014). Ces données ont permis d'émettre

l'hypothèse que le Wnt7b secrété par les macrophages peut agir de manière paracrine et se lier au Fzd4 des cellules endothéliales du hyaloïde pour activer la voie canonique qui est essentielle à la régression de ce réseau primitif (Lobov et al 2005).

De plus, Stefater et al. ont récemment proposé un rôle direct des voies Wnt non canoniques dans la régulation du branchement du réseau vasculaire profond de la rétine. Dans le plexus profond, les cellules myéloïdes expriment les récepteurs Fzd7 et Fzd8 et produisent des ligands Wnt. Ces ligands peuvent agir de manière autocrine et se lier aux récepteurs Fzd pour induire la sécrétion de Flt-1 par ces cellules myéloïdes résidentes et réguler l'angiogenèse rétinienne induite par le VEGF (Stefater et al 2011). Enfin, la dérégulation de la sécrétion des Wnt ou la mutation de Wnt5a et Wnt11 entraînent des phénotypes similaires avec une augmentation du branchement du plexus profond (Korn et al 2014, Stefater et al 2011).

De manière très intéressante, deux pathologies oculaires caractérisées par une altération du développement rétinien entraînant une cécité congénitale chez l'homme, à savoir la vitrorétinopathie exsudative familiale (FEVR) et la maladie de Norrie, ont été reliées à des altérations de la signalisation Wnt (Nikopoulos et al 2010, Poulter et al 2010, Shastry et al 1997, Toomes et al 2004). La maladie de Norrie a été ainsi imputée à des mutations du gène *Ndp*. D'autre part, Xu et al. ont établi un lien moléculaire entre le récepteur Fzd4 et le ligand Norrin secrété par les cellules de Müller (Xu et al 2004). Au niveau cellulaire, le complexe Fzd4, Lrp5 et Tspan12 est activé suite à la fixation du ligand Norrin et active la voie Wnt canonique (Junge et al 2009, Xu et al 2004). L'analyse des souris mutantes pour *fzd4*, *Norrin*, *Lrp5*, *Tspan12*, et dans une moindre mesure *Lef1*, montre un phénotype rétinien similaire avec la présence d'un plexus vasculaire primaire altéré et incomplet, l'absence des plexus vasculaires profond et intermédiaire ainsi qu'une anastomose artério-veineuse et des hémorragies intraoculaires (Junge et al 2009, Luhmann et al 2005, Phng et al 2009, Richter et al 1998, Xia et al 2010, Xu et al 2004) (Tableau 2).

Mutants et phénotypes vasculaires rétiniens associés	<i>Ndp</i> ^{-/-}	<i>Fzd4</i> ^{-/-}	<i>Lrp5</i> ^{-/-}	<i>Tspan12</i> ^{-/-}	<i>Lef1</i> ^{-/-}
Expansion radiale du plexus primaire (PP)	Diminuée	Diminuée	Diminuée	Diminuée	Diminuée
% de vascularisation du PP	Diminué et incomplet	Diminué et incomplet	Diminué et incomplet	Diminué et incomplet	Diminué mais complet
plexus profond	Absent	Absent	Absent	Absent	Présent
Nombre de tip cells/100µm	Augmenté	X	Diminué	X	X
Nombre de filopodes/tip cell	Augmenté	X	X	X	Normal
Nombre de points de branchement au niveau veineux	Diminué	Augmenté	X	Diminué	Diminué
Nombre de points de branchement au niveau artériel	Diminué	Augmenté	X	Diminué	Diminué
Prolifération	Diminuée	Diminuée	X	X	X
Shunt artère/veine dans le PP	Oui	Oui	Oui	Oui	Non
Persistance du réseau hyaloïde	Oui	Oui	Oui	Oui	Non
Régression des vaisseaux (marquage IB4/collagèneIV)	Diminuée	Diminuée	X	X	Augmentée
Maturation des vaisseaux (marquage αSMA/NG2)	X	Diminuée	X	X	X

Tableau 2: Phénotypes vasculaires rétiniens décrits et associés aux différentes souris mutées pour les acteurs des voies Wnt/Fzd. Croix: paramètre non étudié

Enfin, Dkk2 contrairement à Dkk1, semble jouer un rôle important dans l'angiogenèse car il augmente la formation du réseau vasculaire rétinien. Cette activité pro-angiogénique de Dkk2 dans les cellules endothéliales est liée à l'activation de la voie Cdc42 *via* l'internalisation de Lrp6 et ce indépendamment de la voie Wnt canonique (Min et al 2011).

E. Convergence des voies Wnt canonique et Notch au cours de l'angiogenèse

Des études récentes ont montré l'existence d'une balance entre la voie Wnt canonique et la voie Notch qui permet de réguler finement le processus d'angiogenèse.

Corada et al. ont mis en évidence que l'expression du ligand Dll4 et de Notch1 est induite *via* l'activité transcriptionnelle de la β -caténine et que l'interaction entre les voies canonique et Notch est cruciale au cours de la différenciation des cellules endothéliales et de la morphogenèse vasculaire embryonnaire (Corada et al 2010).

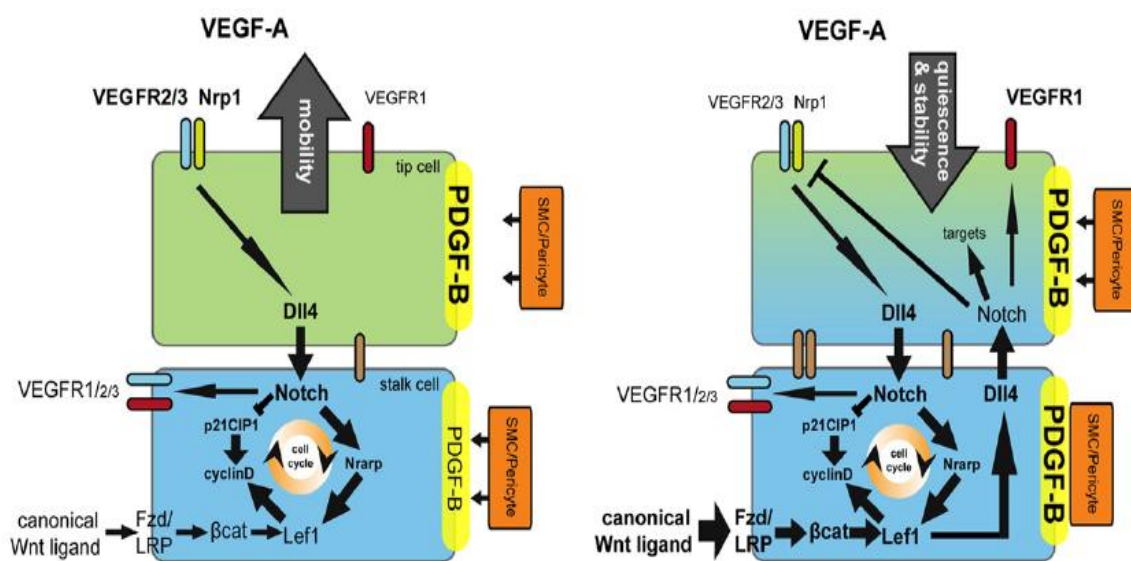


Figure 18: Convergence des voies Wnt canonique et Notch au cours du sprouting.

A gauche: La signalisation basale Wnt/ β -caténine au cours du sprouting angiogénique. L'activation de la voie Notch dans la stalk cell diminue l'expression de cyclin-dependent kinase inhibitor p21CIP1 conduisant à l'arrêt du cycle cellulaire. L'augmentation d'expression de Nrp1 entraîne l'activation de la voie Wnt/ β -caténine via Lef1 ce qui induit la reprise du cycle cellulaire malgré la signalisation Notch. Dans les stalk cells, la voie Notch diminue l'expression de VEGFR2/3 de la neuropiline1 (Nrp1) et augmente l'expression de VEGFR1.

A droite: Effets de la sur-activation de la voie Wnt/ β -caténine au cours du sprouting. L'activation plus forte de la voie Wnt/ β -caténine entraîne l'augmentation d'expression de Dll4 qui augmente la signalisation Notch et oriente la cellule adjacente vers un phénotype stalk cell via la diminution d'expression de VEGFR2/3, Nrp1 et une augmentation de VEGFR1 qui tend vers la stabilité et la quiescence cellulaire. D'après (Reis & Liebner 2013).

D'autre part, les mutants délétés pour Notch-regulated ankyrin protein (Nrarp), un gène régulé par la voie Notch (Krebs et al 2001), présentent des altérations au niveau de l'expansion radiale et du branchement du réseau vasculaire rétinien. Les auteurs ont démontré que Notch1 augmente l'expression de Nrarp qui en retour régule négativement Notch1 et active la voie dépendante de la β -caténine *via* Lef1 (Phng et al 2009) (Figure 18).

De manière intéressante, il a été également décrit qu'il existe une coopération entre la signalisation Notch et β -caténine dans un modèle de cellules souches embryonnaires *in vitro*. Yamamizu et al. ont montré que la β -caténine est capable de former un complexe nucléaire «artériel» avec les facteurs de transcription Notch intracellular domain (NICD) et RBP-J, qui sont activés par la signalisation Notch, et permet l'induction de l'expression de marqueurs artériels par les cellules endothéliales tels que EphrinB2, Dll4 ou CXCR4 (Yamamizu et al 2010) (Figure 19).

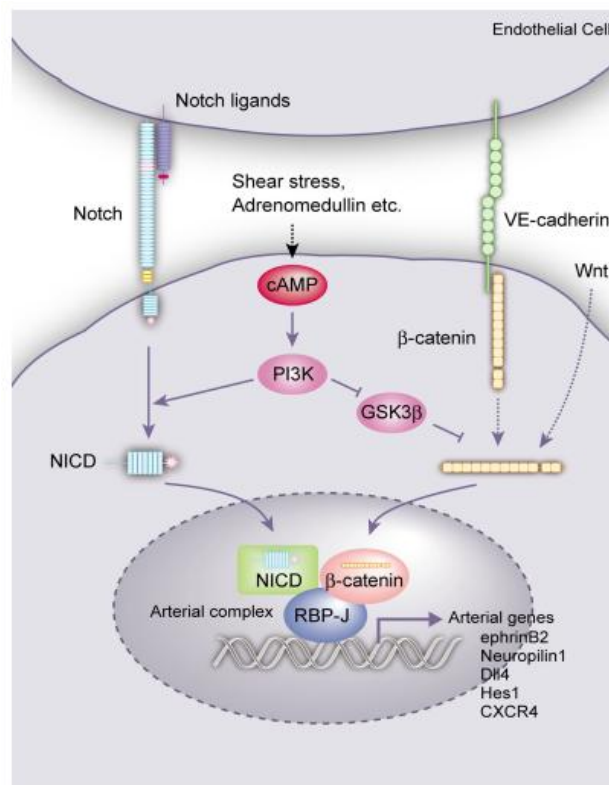


Figure 19: Convergence des voies Notch et β -caténine dans la différenciation artério-veineuse des cellules endothéliales. La signalisation de l'AMPC, les forces de cisaillement ou d'autres facteurs entraînent l'activation des voies Notch et β -caténine via la PI3K et/ou la GSK-3 β dans les progéniteurs endothéliaux et les CE différenciées. L'activation des deux voies entraîne la formation d'un complexe protéique RBP-J, NICD et β -caténine (complexe artériel) et active la transcription de gènes qui sont des marqueurs artériels. L'activation de la voie Notch via la fixation d'un ligand Dll ou l'activation de la voie β -caténine via la fixation d'un ligand Wnt ou la VE-cadhérine pourraient induire également la formation de ce complexe. D'après (Yamamizu et al 2010).

Enfin, il a été récemment montré que la délétion spécifique de Sox17 dans les CE chez la souris s'accompagne d'une altération importante de la différenciation artérielle, du branchement et du remodelage vasculaires. Au niveau moléculaire, la voie Wnt/ β -caténine entraîne une augmentation de la transcription de Sox17 qui activerait la voie Notch et agirait donc en amont du système Notch. Ces données présentent Sox17 comme un lien entre les voies Wnt canonique et Notch et comme un composant du réseau complexe de signalisation qui orchestre la différenciation artério-veineuse (Corada et al 2013, Morini & Dejana 2014) (Figure 20).

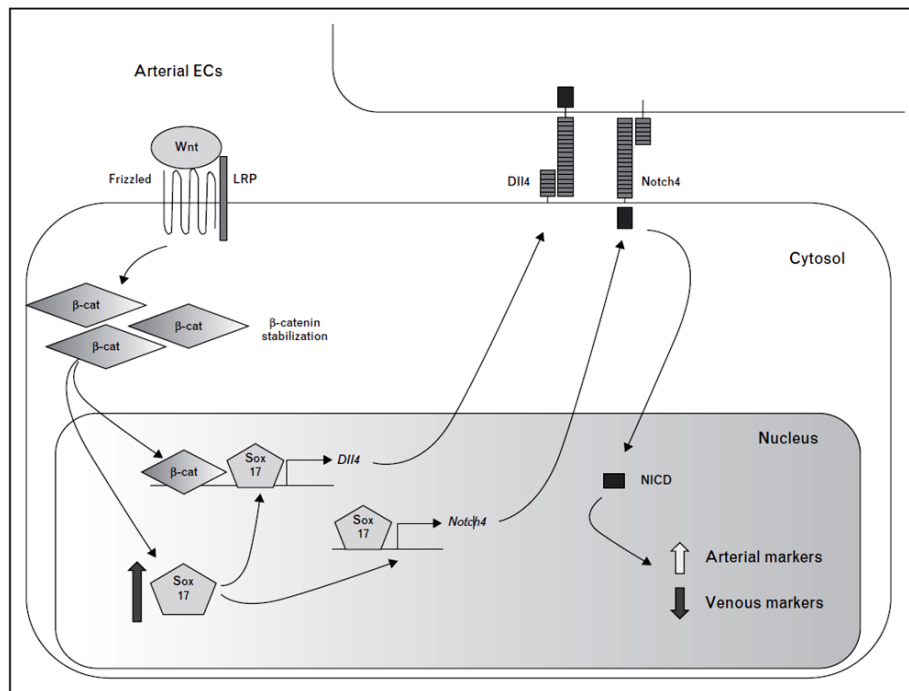


Figure 20: Wnt, Sox et Notch coopèrent dans la définition de l'identité artérielle des cellules endothéliales. La fixation des ligands Wnt sur les récepteurs Fzd et corécepteurs Lrp exprimés par les CE entraîne la stabilisation de la β -caténine qui augmente en retour l'expression de Sox17. Le promoteur de Dll4 est la cible de la β -caténine et de Sox17. De plus, Sox17 contrôle positivement l'expression de gènes impliqués dans la signalisation Notch tels que Notch4 (cible directe) et les marqueurs artériels CXCR4 et EphrinB2, mais diminue l'expression des marqueurs veineux. D'après (Morini & Dejana 2014).

F. Pathologies vasculaires oculaires

1) Rétinopathie induite par l'oxygène (OIR)

Le modèle murin de rétinopathie induite par l'oxygène (OIR) est un modèle bien caractérisé qui récapitule les caractéristiques de la rétinopathie chez le prématuré (Smith et al 1994).

Il a été proposé que l'activation des voies Wnt participe à la stabilité des vaisseaux en conditions pathologiques et augmente la revascularisation de la rétine dans le modèle OIR. Des études ont ainsi montré que l'OIR induit une augmentation de l'expression endogène de la Norrin, de Fzd4 et de Lrp5 (Chen et al 2011, Ohlmann et al 2010). De plus, l'expression ectopique de la Norrin ou un traitement exogène par injection de la protéine recombinante Norrin permet de restaurer le développement vasculaire. Il a ainsi été démontré que la Norrin induit l'expression de l'Angiopoïétine 2 et participe au maintien de la balance entre formation et régression vasculaires (Ohlmann et al 2010, Tokunaga et al 2013). De manière similaire, l'inhibition de la voie Wnt canonique par la délétion génétique de Lrp5 ou Dvl2 entraîne une diminution de la néovascularisation pathologique. En effet, le blocage de la voie dépendante de la β -caténine diminue l'expression de la claudine5 qui est une protéine des jonctions serrées, ce qui explique partiellement la déstabilisation de l'endothélium en conditions hypoxiques pathologiques (Chen et al 2011).

2) Néovascularisation de la choroïde

La dégénérescence maculaire liée à l'âge est une maladie évolutive de la rétine provoquée par une dégénérescence progressive de la macula qui entraîne des altérations de la vision centrale. Parmi les deux formes décrites, seule la forme exsudative ou humide (environ 20% des cas) est caractérisée par le développement de néovaisseaux issus de la choroïde sous l'épithélium pigmentaire et/ou qui franchissent l'épithélium pigmentaire et se développent directement sous la rétine maculaire. Cette néovascularisation choroïdienne entraîne un œdème intra-rétinien, des hémorragies et un décollement maculaire exsudatif, responsable de la baisse d'acuité visuelle (Cougnard-Gregoire et al 2013, Edwards et al 2005, Holz et al 2014, Muñoz et al 2005).

Les modèles de néovascularisation choroïdienne chez les rongeurs (rat, souris) sont communément utilisés pour étudier la néovascularisation de la choroïde dans les formes exsudatives de la DMLA. Ainsi, il a été tout d'abord démontré que l'activation de la voie canonique dans l'œil induit une néovascularisation pathologique sub-oculaire dans un modèle murin. Dans les souris mutantes pour very low density lipoprotein receptor (Vldlr), une augmentation d'expression de Lrp5/6 et d'activation de la voie Wnt/ β -caténine a été observée (Chen et al 2007). De plus, une étude récente a mis en évidence que la chirurgie au laser peut entraîner une néovascularisation sévère de la choroïde due à une sur-activation de la voie canonique. Enfin, il a été récemment montré qu'un traitement avec un anticorps anti Lrp6 permet de diminuer cette néovascularisation ainsi que les hémorragies associées (Hu et al 2013).

V. Lien entre la β -caténine et les cadhérines: les jonctions adhérentes

A. Généralités

Comme décrit précédemment, la β -caténine est un acteur central de la voie canonique mais joue également un rôle essentiel dans la stabilisation des jonctions adhérentes qui régulent à la fois l'adhésion entre les cellules, la concentration locale de protéines d'échafaudages et de molécules de signalisation, l'intégrité et la perméabilité vasculaires (Dejana et al 2008).

Les jonctions adhérentes sont composées de cadhérines dont la queue cytoplasmique est directement liée à d'autres protéines, telles que la β -caténine ou la γ -caténine (plakoglobine) et la caténine p120 et indirectement liée à l' α -caténine *via* la β -caténine ou la γ -caténine (Gumbiner 2005) (Figure 21).

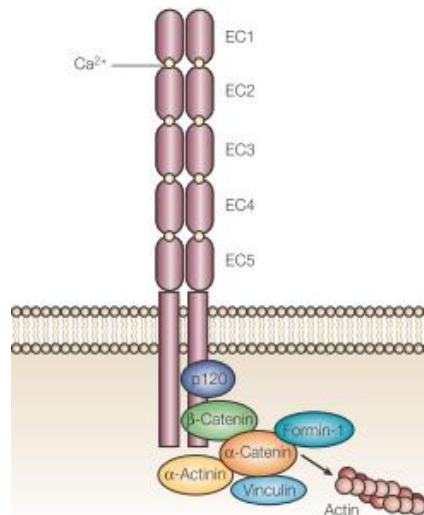


Figure 21: Complexe cadhérine-caténine. Les jonctions adhérentes sont composées principalement de cadhérines dont la queue cytoplasmique est directement liée à d'autres protéines, telles que la β -caténine ou la γ -caténine (plakoglobine) ou la caténine p120 et indirectement à l' α -caténine *via* la β -caténine ou la γ -caténine. D'après (Gumbiner 2005).

Les cadhérines classiques, divisées en type I et II, ont été les premières cadhérines à avoir été mises en évidence et comprennent la E-cadhérine (épithéliale), la N-cadhérine (neuronale) et la VE-cadhérine (endothélium vasculaire) (Nollet et al 2000).

Les cadhérines sont à l'origine d'interactions homophiliques dépendantes du calcium et sont concentrées aux jonctions adhérentes (Angst et al 2001, Leckband & Sivasankar 2000). Ce sont des glycoprotéines transmembranaires, dont la partie extracellulaire, comprenant cinq domaines

extracellulaires (EC), est responsable de la fonction adhésive. En effet, une cadhérine d'un type donné interagit ainsi avec une cadhérine du même type par le biais d'interactions homophiliques mettant en jeu la partie extracellulaire et permettant aux cellules d'un même type de s'associer les unes aux autres. Les cadhérines possèdent aussi un domaine transmembranaire et une région cytoplasmique capable de recruter des connecteurs au cytosquelette d'actine comme la bêta- et l'alpha-caténine et d'activer des cascades de signalisation cellulaire. Les cadhérines jouent un rôle important car l'activation du signal d'adhérence dépendant de ces glycoprotéines contrôle la polarité et la forme des cellules, module l'expression génique et régule la prolifération, la survie et la différenciation cellulaires (Wheelock & Johnsony 2003).

B. La VE-cadhérine

1) Structure de la VE-cadhérine

La VE-cadhérine est la cadhérine majoritairement exprimée par l'endothélium et fait partie de la sous-famille des cadhérines classiques de type II. Son domaine extracellulaire ne contient pas de poche hydrophobe constituée par le motif HAV, mais possède à l'extrémité N-terminale deux résidus tryptophane (Trp-2 et Trp-4) (Nollet et al 2000). La VE-cadhérine possède un seul domaine transmembranaire et une queue cytoplasmique qui présente deux sites d'interaction distincts pour les caténines appelés JMD pour JuxtaMembrane Domain et CBD pour Catenin binding domain. Le JMD est responsable de l'interaction avec la caténine p120 (Lampugnani et al 1997), tandis que CBD régit la liaison avec la β -caténine et la plakoglobine (Navarro et al 1995, Potter et al 2005) (Figure 22). Si la β -caténine et la plakoglobine peuvent se lier à l' α -caténine qui est capable de réguler le cytosquelette d'actine (Lampugnani et al 1995), la manière dont le complexe cadhérine-caténine interagit avec l'actine est toujours un sujet de débat, étant donné que l'interaction directe du complexe cadhérine- β -caténine- α -caténine avec les filaments d'actine a été remise en cause. Ainsi, de nombreuses protéines liant l'actine telles que l' α -actinine (Nieset et al 1997), la vinculine (Weiss et al 1998) ou plus récemment Eplin (Abe & Takeichi 2008, Chervin-Petinot et al 2012) ont été décrites comme pouvant lier l' α -caténine et relier les complexes d'adhésion à l'actine (Bravi et al 2014, Giannotta et al 2013).

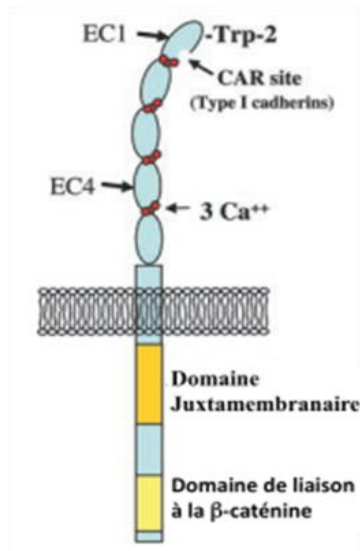


Figure 22: Structure de la VE-cadhérine. La VE-cadhérine est une glycoprotéine dont la partie extracellulaire comprend cinq domaines extracellulaires (EC). Ces domaines possèdent des sites de fixation des ions calcium. La VE-cadhérine possède une région transmembranaire et une région cytoplasmique qui contient un site d'interaction pour p120 (JMD) et un site d'interaction pour la β -caténine et la plakoglobine (CBD). D'après (Vincent et al 2004).

2) Fonctions de la VE-cadhérine

Des études pionnières ont montré que l'expression de la VE-cadhérine par les cellules CHO après transfection (Chinese Hamster Ovary), induit une adhésion cellulaire homophile dépendante du calcium et conduit à une diminution de la perméabilité cellulaire (Breviario et al 1995). Ces résultats ont permis de montrer un rôle de la VE-cadhérine dans l'organisation, l'adhésion et la perméabilité de l'endothélium vasculaire (Gulino et al 1998). D'autre part, l'importance de la VE-cadhérine a été confirmée par invalidation génique chez la souris qui entraîne une létalité à mi-gestation. Les embryons *VE-cadhérine*^{-/-} présentent des malformations vasculaires (défauts d'angiogenèse, absence de bourgeonnement des cellules) durant leur développement embryonnaire. Ce phénotype important est similaire à celui obtenu lors de la mutation du domaine cytoplasmique de la VE-cadhérine (Carmeliet et al 1999, Gory-Fauré et al 1999). De manière intéressante, Sidibé et al. ont récemment démontré que les souris mutées pour un site de phosphorylation de la VE-cadhérine (Y685F) présentent une augmentation de la perméabilité vasculaire et une apparition d'œdèmes au niveau des ovaires et de l'utérus (Sidibé et al 2014).

L'association de la VE-cadhérine avec les caténines est nécessaire pour une fine régulation de la perméabilité endothéliale et la stabilisation des jonctions cellulaires. Une forme tronquée de la VE-cadhérine au niveau du domaine responsable de la liaison avec la β -caténine a permis de montrer

que la VE-cadhérine était toujours capable d'établir des jonctions homophiliques au niveau extracellulaire, mais la force de ces jonctions était sévèrement diminuée (Navarro et al 1995). Chez l'adulte, l'utilisation d'anticorps dirigés contre la partie extracellulaire de la VE-cadhérine a permis de mettre en évidence une augmentation de la perméabilité, une fragilité vasculaire et des hémorragies (Corada et al 1999). L'utilisation de ces anticorps bloque l'angiogenèse et la croissance tumorale chez la souris (Corada et al 2002, Liao et al 2002, May et al 2005).

De plus, Montero-Balaguer et al. ont réalisé des expériences chez le poisson zèbre qui ont permis de montrer qu'une réduction de l'expression de la VE-cadhérine, par l'utilisation de faibles doses de morpholinos, conduit à des fragilités vasculaires, des hémorragies au niveau de la tête et une augmentation de la perméabilité, ce qui suggère que la quantité totale de protéine présente est importante pour la stabilité vasculaire. De plus, ces auteurs ont pu montrer que l'abrogation de l'expression de la VE-cadhérine empêche l'établissement de jonctions intercellulaires conduisant à une augmentation du processus de bourgeonnement vasculaire (Montero-Balaguer et al 2009).

Enfin, Almagro et al. ont récemment mis en évidence que la VE-cadhérine est exprimée au niveau des filopodes des cellules endothéliales. Ces auteurs ont notamment montré que la myosine-X établit un lien entre les filaments d'actine et la VE-cadhérine, permettant à la VE-cadhérine d'être transportée le long des câbles d'actine au niveau des filopodes pour favoriser l'établissement de jonctions cellulaires (Almagro et al 2010).

3) Régulation des jonctions cellulaires

Les cellules endothéliales possèdent différents mécanismes permettant de réguler la perméabilité vasculaire. De tels mécanismes se concentrent sur l'organisation des jonctions adhérentes et plus particulièrement sur la VE-cadhérine. Les jonctions cellulaires sont très dynamiques et la perméabilité vasculaire peut être augmentée notamment par des cytokines inflammatoires telles que l'histamine (Andriopoulou et al 1999), le TNF α (Angelini et al 2006) et le VEGF (Esser et al 1998). En effet, le VEGF est capable de promouvoir la prolifération vasculaire dans les situations «pro-angiogéniques» mais aussi d'augmenter la perméabilité vasculaire et la survie endothéliale dans les vaisseaux quiescents (Esser et al 1998, Kouklis et al 2003).

La régulation de la VE-cadhérine fait intervenir notamment la modulation de ses différents sites de phosphorylation (tyrosine ou sérine). En présence de VEGF, celui-ci se lie à son récepteur le VEGF-R2. Ce complexe s'associe à la VE-cadhérine et à la protéine tyrosine kinase Src conduisant à une perte de stabilité des jonctions cellulaires (Corada et al 2002, Lambeng et al 2005). En effet, la protéine

kinase Src conduit à une phosphorylation de la VE-cadhérine sur des résidus tyrosine (T-685) et est associée à une modification de la perméabilité vasculaire (Wallez et al 2007). La VE-cadhérine phosphorylée interagit également avec la protéine Csk (C-terminal Src kinase). Le complexe VE-cadhérine-Csk pourrait inhiber la protéine Src conduisant ainsi à une diminution de la prolifération (Baumeister et al 2005).

Plus récemment, Orsenigo et al. ont mis en évidence *in vivo* deux autres sites de phosphorylation de la VE-cadhérine (T658 et T685). La phosphorylation de ces sites par la Src est dépendante des forces de cisaillement, n'est observée que dans les veines, non dans les artères, et entraîne l'internalisation, l'ubiquitination de la VE-cadhérine et une augmentation de la perméabilité en conditions inflammatoires (Orsenigo et al 2012).

La VE-cadhérine peut être également internalisée de manière dépendante de la clathrine (Xiao et al 2005). De façon intéressante, la liaison de p120 à la VE-cadhérine prévient l'internalisation et la dégradation de celle-ci, introduisant la notion que p120 est un signal de rétention à la membrane plasmique. Ainsi, une diminution de l'affinité de p120 pour la VE-cadhérine (phosphorylation de la VE-cadhérine) conduirait à l'internalisation de celle-ci. Le VEGF conduit à une perturbation des jonctions endothéliales par l'activation de la protéine Src, qui est ensuite responsable de la phosphorylation de Vav2, un facteur d'échange de la guanine (GEF) de la GTPase Rac. Rac activé induit la phosphorylation de la PAK kinase conduisant à une phosphorylation de la VE-cadhérine sur la sérine 665. Ceci induit le recrutement de la β -arrestine 2 qui conduit à l'internalisation de la VE-cadhérine. (Gavard & Gutkind 2006).

4) Lien entre la voie canonique et la VE-cadhérine

Si la majorité des études se sont portées soit sur la compréhension de la voie Wnt canonique, soit sur l'adhésion cellulaire dépendante des cadhérines, il est clair qu'il existe des connexions entre la voie β -caténine canonique et les jonctions adhérentes dépendantes de la VE-cadhérine.

En effet, l'une des conséquences possibles de l'engagement de la VE-cadhérine dans les jonctions adhérentes stables est la régulation du niveau d'expression de la β -caténine dans le noyau. Même si le mécanisme n'est pas encore bien connu, celui-ci s'appuie sur l'observation d'une diminution de la β -caténine au noyau lorsque la VE-cadhérine participe aux jonctions stables des CE confluentes, tandis que la β -caténine s'accumule au noyau et active la transcription de gènes cibles de la voie canonique quand les jonctions cellulaires sont plus lâches dans les CE éparses ou en migration (Heuberger & Birchmeier 2010, Taddei et al 2008).

Il n'a pas encore été clairement démontré que la β -caténine concentrée au noyau dérive des jonctions cellulaires après son détachement de la VE-cadhérine. Cependant, une étude réalisée sur des cellules épithéliales indique que la β -caténine peut se dissocier de la E-cadhérine et être relocalisée au noyau (Kam & Quaranta 2009).

D'autre part, de nouvelles données dans les cellules épithéliales suggèrent l'existence de deux réservoirs de β -caténine au niveau de la membrane plasmique. Le premier serait lié aux complexes formés par les cadhérines et serait ainsi protégé de la dégradation. Le deuxième serait associé à la membrane, au niveau des contacts cellule-cellule, au complexe de dégradation (formé par Axin, GSK-3 β et APC) qui peut induire la phosphorylation en N-terminal de la β -caténine. Cette dernière peut alors être adressée au protéasome, limitant ainsi le niveau d'expression de la β -caténine au niveau de la membrane plasmique et par conséquent celui au niveau nucléaire, mais également la transcription des gènes cibles de la voie canonique. Les cadhérines peuvent favoriser la liaison de la β -caténine à ce complexe de dégradation, c'est pourquoi, la stabilité des jonctions pourrait réguler l'activité du complexe de dégradation de la β -caténine et limiter de manière indirecte la voie de signalisation Wnt (Maher et al 2009). Ainsi, l'activité transcriptionnelle de la β -caténine pourrait être régulée par les cadhérines, dont la VE-cadhérine, et par l'état des jonctions adhérentes, mais il reste à déterminer si un tel mécanisme existe dans les cellules endothéliales.

VI. Frizzled-7

Le récepteur Fzd7 murin (Wang et al 1996) est l'orthologue du récepteur Fzd7 humain (Sagara et al 1998). Chacun des neuf résidus d'acides aminés de l'homme sont conservés chez le chimpanzé, la vache, la souris et le rat. Les orthologues de *fzd7* chez les mammifères et la plupart des autres membres de la famille Fzd partagent une architecture commune constituée d'un domaine extracellulaire CRD, de sept domaines transmembranaires, et d'un domaine cytoplasmique Dishevelled (DVL)-binding motif (Katoh & Katoh 2007a). Enfin, les protéines Fzd7 chez le Xénope, le poulet et la souris sont extrêmement conservées et présentent une grande homologie (El-Messaoudi & Renucci 2001).

A. Expression de Fzd7

1) Chez la souris

Le récepteur Fzd7 murin est exprimé dans l'épiblaste, l'endoderme et le mésoderme (Kemp et al 2007). Ce récepteur est également exprimé dans les frontières ventro-latérales des somites nouvellement formés, le tube neural et le mésenchyme au cours de l'embryogenèse (Borello et al

1999). Il est également exprimé dans le cerveau adulte, les yeux, le cœur, le rein, le foie, le poumon, la rate (Wang et al 1996) mais aussi dans les cryptes intestinales et le côlon (Gregorieff et al 2005).

2) Chez l'homme

Le récepteur Fzd7 humain est exprimé dans le blastocyste et dans les cellules souches embryonnaires, les progéniteurs endodermiques et neuronaux dérivés des cellules souches embryonnaires et la cochlée fœtale (Katoh & Katoh 2007b). Ce récepteur est fortement exprimé dans le rein et le poumon du fœtus, le muscle squelettique et le cœur des adultes, mais faiblement exprimé dans le cerveau adulte et les reins (Sagara et al 1998). Fzd7 est aussi exprimé dans le tractus gastro-intestinal, y compris l'œsophage, l'estomac, le duodénum et le côlon (Kirikoshi et al 2001). Fzd7 est préférentiellement exprimé dans les cryptes coliques (Kosinski et al 2007). De plus, il a été montré que l'expression de Fzd7 dans les cellules souches mésenchymateuses est diminuée au cours de l'ostéogenèse (Boland et al 2004).

D'autre part, le récepteur Fzd7 est fortement exprimé dans différents types de cancer. Il est notamment exprimé dans les cellules du cancer colorectal SW480, les cellules du cancer du poumon A549 et les cellules tumorales du cerveau G361, mais faiblement exprimé dans les cellules HeLa (Sagara et al 1998). Fzd7 est régulé positivement dans le cancer gastrique (Kirikoshi et al 2001, Sagara et al 1998), le cancer de l'œsophage (Tanaka et al 1998), le cancer colorectal (Sagara et al 1998, Vincan et al 2007b) et le cancer du foie (Merle et al 2004).

B. Rôles de Fzd7

1) Développement

De nombreuses études ont démontré l'implication de Fzd7 dans la régulation de différents processus cellulaires pendant les premiers stades de l'embryogenèse tels que les mouvements de convergence-extension, la séparation des tissus pendant la gastrulation, la formation de l'axe dorso-ventral et l'induction du mésoderme et de la crête neurale.

Les rôles de Fzd7 ont surtout été étudiés dans les modèles de développement chez le Xénope, le poisson Zèbre et plus récemment chez la souris.

a) Xénope

Des expériences de gain de fonction de *Xfzd7* et des études *in vitro* ont montré que *Xfzd7* peut interagir avec plusieurs ligands *XWnt* (tels que ***XWnt8b***, ***XWnt5a*** et ***XWnt11***) pour activer les voies de signalisation canonique et non canoniques (Djiane et al 2000, Medina et al 2000, Sumanas & Ekker 2001).

La surexpression de l'orthologue *Fzd7* dans le mésoderme dorsal du Xénope affecte le processus de convergence-extension, induit un retard de l'invagination du mésoderme au cours de la gastrulation et perturbe la migration des cellules de la crête neurale. La transduction du signal par le biais de ***XWnt5a*** et ***XWnt11*** et de *Fzd7* active la cascade de signalisation PKC-Cdc42, une activation dépendante de *Dvl* mais indépendante de la β -caténine (De Calisto et al 2005, Djiane et al 2000, Medina & Steinbeisser 2000, Penzo-Mendèz et al 2003).

D'autre part, des expériences de perte de fonction ont mis en évidence l'interaction entre *Xfzd7* et ***XWnt8b*** ainsi que le rôle de *Xfzd7* dans le contrôle de la spécification de l'axe dorso-ventral *via* la voie *Wnt*/ β -caténine. (Sumanas & Ekker 2001, Sumanas et al 2000). L'activation de *Xfzd7* par ***XWnt1***, ***XWnt7b*** et ***XWnt8*** participe également à la régulation de l'induction de la crête neurale *via* la voie β -caténine (Abu-Elmagd et al 2006).

A l'inverse, dans le chordo-mésoderme, *Xfzd7* régule les mouvements cellulaires au cours de la gastrulation *via* différentes voies non canoniques. En effet, l'activation de la voie PKC par la liaison entre *XWnt5a*, ***XWnt11*** et *Xfzd7* permet de contrôler la séparation des tissus mésodermique et ectodermique tandis que la voie *Fzd7*/*JNK* régule la convergence-extension du mésoderme axial. (Kim et al 2008a, Medina et al 2004, Winklbauer et al 2001).

Enfin, une étude plus récente a montré que différents niveaux d'activation de la voie *Wnt*/*Fzd7* permettent de moduler l'organogenèse du tube digestif chez le Xénope. Les voies de signalisation *Fzd7*/ β -caténine et *Fzd7*/*JNK* coordonnent ainsi la prolifération, la morphogenèse et le devenir des cellules progénitrices de l'endoderme (Zhang et al 2013).

b) Poisson zèbre

La fonction de *Fzd7* au cours de la gastrulation chez le Xénope est conservée chez le poisson zèbre *via* la voie de signalisation non canonique faisant intervenir *Cdc42* (Knowlton & Kelly 2004). Chez le poisson zèbre, ***Wnt11*** interagit avec *Fzd7* et induit le recrutement de *dishevelled* et de *Flamingo* intervenant ainsi dans la régulation des mouvements de convergence-extension (Witzel et al 2006).

c) Poulet

Chez le poulet, Wnt6 se lie à l'orthologue de Fzd7 et active la cascade de signalisation β -caténine lors de l'induction de la crête neurale (Lewis et al 2004).

d) Souris

Chez la souris, la transduction du signal Wnt6 par Fzd7 active la voie de signalisation β -caténine au cours de la somitogenèse (Linker et al 2005).

De plus, une étude très récente a mis en évidence le rôle redondant de Fzd7 et Fzd2 chez la souris. En effet, Yu et al. ont montré que ces deux récepteurs interviennent synergiquement dans le contrôle des processus de convergence-extension et de la fermeture du septum ventriculaire et du palais chez la souris. Fzd7 et Fzd2 sont capables d'activer la voie de signalisation canonique ainsi que la voie de polarité cellulaire planaire et réguleraient ces différentes étapes de l'embryogenèse *via* leurs interactions avec différents ligands Wnt (Wnt3a, Wnt5a et Wnt11) et avec Dvl3 et Vangl2 (Yu et al 2012) (Figure 23).

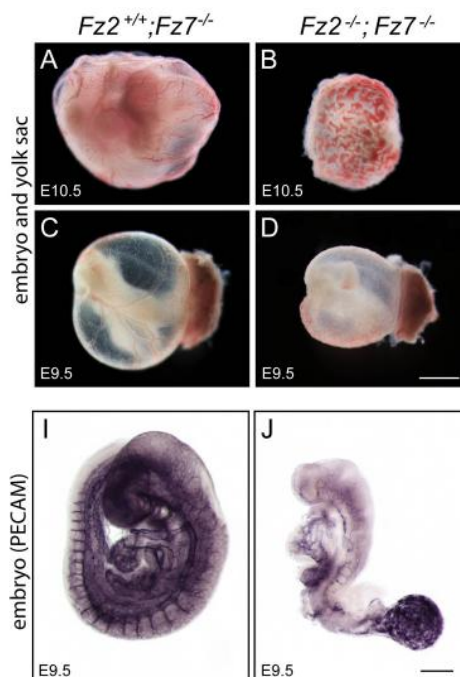


Figure 23: Altérations vasculaires majeures chez l'embryon de souris doublement mutée pour *fzd7* et *fzd2*. D'après (Yu et al 2012).

2) Cellules souches

Divers auteurs ont mis en évidence le rôle de Fzd7 dans l'auto renouvellement des cellules souches embryonnaires et dans leur différenciation vers la lignée hématopoïétique. Melchior et al. ont montré que l'expression de Fzd7 est augmentée dans les cellules souches embryonnaires humaines comparées aux cellules différenciées et que son inhibition par des shRNA conduit à une diminution de l'expression de Oct-4, un facteur intervenant dans le maintien des cellules souches dans un état indifférencié (Melchior et al 2008). D'autres études menées sur des cellules souches embryonnaires humaines ont montré que Wnt11 induit la différenciation vers la lignée hématopoïétique en induisant l'expression de Fzd7 et de la E-cadhérine. A l'inverse, la voie canonique (Wnt3a) est importante dans la prolifération des progéniteurs hémogéniques et hématopoïétiques qui apparaissent lors du développement du corps embryonnaire (Vijayaragavan et al 2009).

Une étude récente a montré que Fzd7 est fortement exprimé par les cellules progénitrices de la cornée chez l'homme. De plus, l'inhibition de Fzd7 par des shRNA entraîne une perte des caractéristiques de ces cellules suggérant que Fzd7 aide à maintenir les cellules progénitrices de la cornée dans un état indifférencié (Mei et al 2014).

3) Cancers

Comme décrit précédemment, Fzd7 est fortement exprimé dans certains types de cancers chez l'homme. Il est surexprimé dans 90% des carcinomes hépatocellulaires et régule positivement la migration ainsi que la prolifération des cellules tumorales (Merle et al 2004, Merle et al 2005). La transduction du signal par le biais de Wnt3 et de Fzd7 active la cascade de signalisation β -caténine/TCF dans le carcinome hépatique (Bengochea et al 2008, Kim et al 2008b).

Fzd7 est fréquemment surexprimé dans les cancers colorectaux et régule la motilité, l'invasion et les propriétés métastatiques des cellules cancéreuses *via* la voie canonique et non canonique. Fzd7 joue également un rôle important dans l'épithélialisation et dans la transition épithélio-mésenchymateuse dans la lignée cellulaire humaine de cancer colorectal LIM1863 (Kittler et al 2007, Vincan et al 2007a).

Une étude récente de Yang et al. a montré que Fzd7 est surexprimé dans des cancers du sein triplement négatifs. Fzd7, *via* l'activation de la voie canonique, intervient essentiellement dans la prolifération des cellules cancéreuses (Yang et al 2011).

Ces différents travaux ont mis en évidence un rôle critique de Fzd7 dans la tumorigenèse et ont permis d'identifier ce récepteur comme un nouveau bio-marqueur et une cible thérapeutique potentielle dans le traitement des cancers. L'inhibition pharmacologique de Fzd7 *in vitro* et *in vivo*

par l'utilisation de petits peptides (RHPD) ou d'un antagoniste (Fj9), qui inhibent l'interaction entre Fzd7 et Dvl, induit l'inhibition de la voie canonique, permettant ainsi d'augmenter l'apoptose des cellules tumorales dans le carcinome hépatocellulaire et de diminuer la croissance de ces tumeurs (Fujii et al 2007, Nambotin et al 2011). L'utilisation d'un récepteur Fzd7 soluble, *in vitro* et *in vivo*, entraîne l'inhibition de la voie canonique et sensibilise les cellules de carcinomes hépatiques à d'autres chimiothérapies telles que la doxorubicine (Wei et al 2011). Enfin, Ueno et al. ont montré que l'inhibition de Fzd7 *in vitro* par une stratégie d'ARN interférence entraîne une diminution de la viabilité des cellules et de leur activité d'invasion et que le siRNA-*fzd7* pourrait être un réactif thérapeutique utilisé dans le traitement du cancer colorectal (Ueno et al 2009).

L'ensemble de ces données indiquent que les orthologues de Fzd7 sont capables de transmettre les signaux de la voie Wnt canonique et non-canonique en fonction du contexte au cours de l'embryogenèse, de l'homéostasie des tissus adultes et en pathologie.

Matériel et méthodes

I. Analyses *in vivo*

A. Génération et caractérisation des souris délétées pour *fzd7* spécifiquement dans les cellules endothéliales

Afin d'étudier le rôle de *Fzd7* en biologie vasculaire, nous avons généré plusieurs lignées de souris transgéniques. Ainsi, les souris transgéniques portant des séquences Flox encadrant la séquence codante de *fzd7* (exon2) notées *fzd7^{F/F}* ont été générées par le laboratoire et ont été élevées dans un fond génétique C57BL6/J. La cassette néomycine de cette construction a été enlevée par recombinaison avec une flippase en croisant les souris *fzd7^{F/F}* avec des souris *Flp*. Les souris homozygotes *fzd7^{F/F}* présentent un développement normal, sont viables et fertiles. Pour étudier l'effet de la délétion spécifique de *fzd7* dans les cellules endothéliales sur le développement vasculaire, nous avons utilisés deux lignées de souris: la lignée Tie2-Cre (Kisanuki 2001) qui permet une délétion spécifique constitutive de *fzd7* dans les cellules endothéliales (mais également dans les progéniteurs endothéliaux et les cellules myéloïdes) et la lignée PDGFb-Cre^{ERT2} (notée PDGFb-iCre) (Claxton et al 2008) qui permet une délétion spécifique de *fzd7* dans les cellules endothéliales induite par l'injection de tamoxifène. Les souris Tie2-Cre et PDGFb-Cre^{ERT2} ont été élevées dans un fond génétique *fzd7^{F/F}* et les mâles Tie2-Cre et PDGFb-Cre^{ERT2} ont ainsi été croisés avec des femelles *fzd7^{F/F}* pour donner des souris Tie2-Cre+, *fzd7^{F/F}* (notées *fzd7^{ECKO}*) et PDGFb-Cre^{ERT2}+, *fzd7^{F/F}* (notées *fzd7^{iECKO}*) qui sont délétées pour *fzd7* dans l'endothélium et des souris Tie2-Cre-, *fzd7^{F/F}* (notées *fzd7^{ECWT}*) et PDGFb-Cre^{ERT2}-, *fzd7^{F/F}* (notées *fzd7^{iECWT}*) qui sont les contrôles correspondants. Pour la lignée PDGFb-Cre^{ERT2}, la délétion post-natale de *fzd7* dans les cellules endothéliales a été induite par l'injection de tamoxifène (50µl d'une solution à 5mg/mL) en intra-péritonéale à P1, P2 et P3 chez les nouveaux nés. Les souris issues de ces croisements sont viables et fertiles (Figure 24).

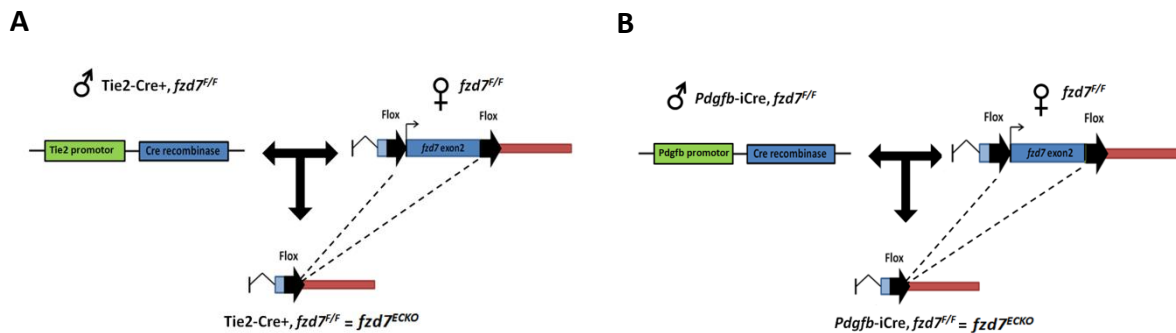


Figure 24: Génération des souris $fzd7^{ECKO}$ et $fzd7^{iECKO}$. (A) Les souris floxées pour le gène $fzd7$ ($fzd7^{F/F}$) ont été générées par le laboratoire. Les souris homozygotes $fzd7^{F/F}$ ont été croisées avec des souris exprimant la cre-recombinase sous le promoteur *Tie2* pour générer des souris délétées pour $fzd7$ dans les cellules endothéliales (souris $Tie2-Cre+$, $fzd7^{F/F}$ ou $fzd7^{ECKO}$) et les souris contrôles (souris $Tie2-Cre-$, $fzd7^{F/F}$ ou $fzd7^{ECWT}$). (B) Les souris homozygotes $fzd7^{F/F}$ ont été croisées avec des souris exprimant la cre-recombinase sous le promoteur inductible *PDGFb-i* pour générer des souris délétées pour $fzd7$ dans les cellules endothéliales (souris $PDGFb-iCre+$, $fzd7^{F/F}$ ou $fzd7^{iECKO}$) et les souris contrôles (souris $PDGFb-iCre-$, $fzd7^{F/F}$ ou $fzd7^{iECWT}$) après injection de tamoxifène.

Pour génotyper les souris issues de ces croisements, l'ADN d'un échantillon de queue provenant de l'animal est extrait dans une solution de tampon de lyse (DirectPCR, Viagen) supplémentée en protéinase K. Après centrifugation, le surnageant contenant l'ADN extrait est soumis à une réaction de polymérase en chaîne (PCR). Les amorces utilisées pour la PCR ont été les suivantes (Tableau 6):

Gène	Sens	Séquence 5'-3'
	Anti-sens	
<i>mTie2-Cre</i>	F	TAAAGATATCTCACGTA CTGACGGTG
	B	TCTCTGACCAGAGTCATCCTTAGC
<i>mPDGFb-Cre</i>	F	CCAGCCGCCGTCGCAACT
	B	GCCGCCGGGATCACTCTCG

Tableau 6: Liste des amorces utilisées pour le génotypage

Pour vérifier la spécificité et l'efficacité de la Cre-recombinase, nous avons croisé des souris transgéniques exprimant la Cre sous le promoteur *Tie2* ou *PDGFb-i* avec des souris transgéniques *Gt(ROSA)26Sortm4(ACTB-tdTomato,-EGFP)Luo/J* exprimant un gène rapporteur et notées souris mT/mG (A. Eichmann laboratory). Lorsque la Cre recombinase est exprimée sous le promoteur *Tie2* et *PDGFb-i*, il y a excision de la cassette tomato encadrée par des séquences Flox et expression de la GFP par les cellules endothéliales. Ainsi, seuls les vaisseaux sanguins expriment la GFP et apparaissent en vert, tandis que les autres tissus et cellules exprimant la tomato sont en rouge,

montrant ainsi la spécificité et l'efficacité de recombinaison de la Cre sous nos deux promoteurs (Figure 25).

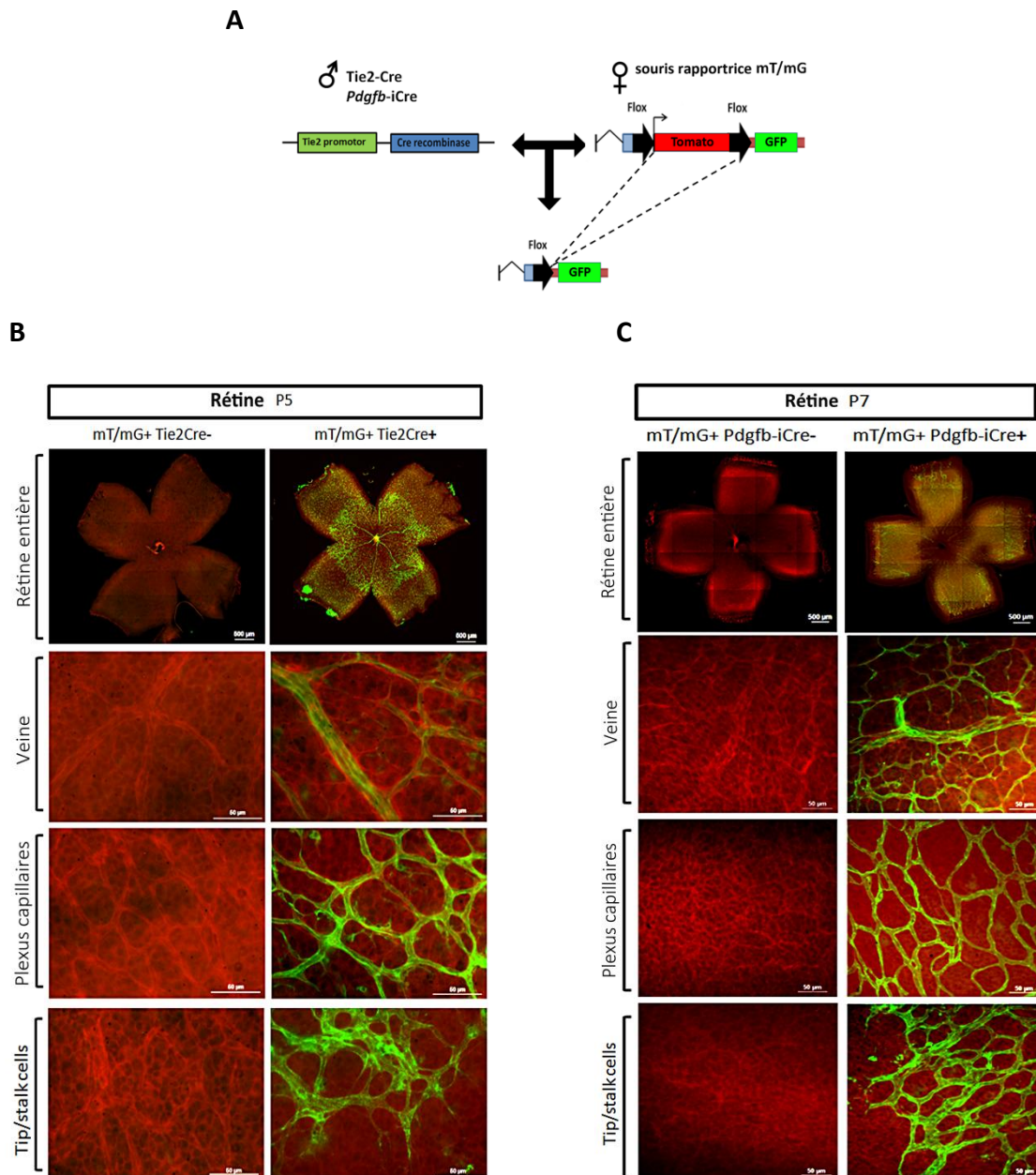


Figure 25: Expression de la Cre recombinase dans les cellules endothéliales. (A) Les souris transgéniques exprimant la Cre recombinase sous le promoteur Tie2 ou le promoteur inducible PDGFB-i ont été croisées avec des souris rapportrices *Gt(ROSA)26Sortm4(ACTB-tdTomato,-EGFP)Luo/J* notées souris mT/mG. L'expression de la Cre recombinase se traduit par l'expression de la GFP et donc l'observation d'une fluorescence verte. Seuls les vaisseaux sanguins dans les rétines de souris Cre+ sous le contrôle du promoteur Tie2 à P5 (B) et du promoteur inducible PDGFB-i à P7 (C) expriment la GFP montrant ainsi que l'expression de la Cre sous ces deux promoteurs est spécifique des cellules endothéliales.

Enfin, pour vérifier si la délétion de *fzd7* sous le contrôle des promoteurs Tie2-Cre et PDGFb-iCre se traduit bien par une diminution d'expression du transcrite de *fzd7* dans la rétine et dans les CE, des qPCR ont été réalisées sur des rétines de souris *fzd7^{ECKO}* ou *fzd7^{iECKO}* et leur contrôles respectifs à P7 (Figure 26 A-B), mais aussi dans les CE isolées à partir des poumons de ces souris (Figure 26 C).

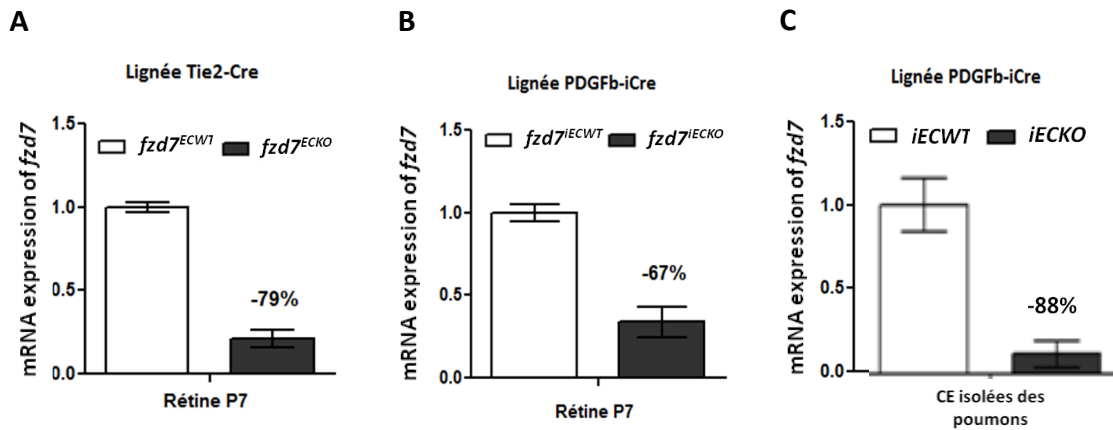


Figure 26: Forte diminution d'expression de *fzd7* dans les rétines de souris délétées pour *fzd7* dans les CE vs souris contrôles pour les deux lignées de souris. (A-C) Des qPCR réalisées sur des rétines de souris *fzd7^{ECKO}* et *fzd7^{ECWT}* à P7 pour la lignée Tie2-Cre (A), sur des rétines (B) et des CE isolées à partir des poumons (C) de souris *fzd7^{iECKO}* et *fzd7^{iECWT}* à P7 pour la lignée PDGFb-iCre montrent une forte diminution voire une extinction d'expression du transcrite de *fzd7* chez les souris mutantes.

Nos résultats ont montré une forte diminution du transcrite de *fzd7* dans les rétines des souris *fzd7^{ECKO}* et *fzd7^{iECKO}* comparées à leurs contrôles respectifs *fzd7^{ECWT}* et *fzd7^{iECWT}* pour les deux lignées Tie2-Cre et PDGFb-iCre inducible. Les mêmes résultats ont été retrouvés dans les ARNm des CE isolées à partir des poumons de souris *fzd7^{iECKO}* vs *fzd7^{iECWT}*. Ces deux modèles de souris sont valides et nous ont permis de continuer notre étude sur le rôle de Fzd7 dans la fonction vasculaire et l'angiogénèse.

B. Souris délétées pour Dishevelled 1 (DVL1-/-)

Les animaux hétérozygotes pour Dishevelled1 (DVL1+/-) (Lijam et al 1997) ont été élevés dans un fond génétique C57BL6/J et ensuite croisés entre eux pour générer des souris délétées pour DVL1 (DVL1-/-) et leur contrôles (DVL1+/+).

Les amorces utilisées pour le génotypage par PCR des animaux issus de ce croisement ont été les suivantes (Tableau 7):

Gène	Sens	Séquence 5'-3'
	Anti-sens	
<i>mDvl1 WT</i>	F	CGCCGCCGATCCCCTCTC
	B	TCTGCCCAATTCCACCTGCTTCTT
<i>mDvl1 KO</i>	F	CGCCGCCGATCCCCTCTC
	B	AGGCCTACCCGCTTCCATTGCTCA

Tableau 7: Liste des amorces utilisées pour le génotypage

C. Procédures chez l'animal

Toutes les procédures chez l'animal ont été menées en accord avec les normes et réglementations européennes et françaises en matière d'expérimentation animale.

D. Injections intra-vitréenne et traitements chez la souris

Pour les injections intra-vitréennes, les souris ont été anesthésiées avec de l'isoflurane (Aerrane®, Baxter). Des injections de 0,5µl ont été réalisées à l'aide d'une aiguille de 33 gauges et d'un micro-injecteur UltraMicroPomp III avec un contrôleur Micro4 Controller (World Precision Instruments). Les siRNA utilisés à une concentration de 100µM ont été injectés en intra-vitréen à P3 et P5 et les souris ont été sacrifiées à P7 pour l'analyse du réseau vasculaire rétinien. Pour les expériences de réversion de phénotype, les souris ont été injectées à P4 en intra-vitréen avec la protéine recombinante Dll4 (rDll4, R&D) à une concentration de 4µg/µl ou avec une solution de PBS-0,5% BSA (pour les souris contrôles) et les souris ont été sacrifiées à P5 pour l'analyse.

Le chlorure de lithium (LiCl, Merck) utilisé à 50mg/kg ou du PBS1X a été injecté en intra-péritonéal à P5 et P6 et les souris ont été sacrifiées à P7 pour l'analyse.

E. Test de perméabilité *in vivo*: test de Miles

100µL de Bleu Evans ont été injectés en intra-veineux (veine de la queue) chez les souris. Après 30min, les souris ont été anesthésiées avec 1,5% d'isoflurane et 100µL de PBS1X ou de VEGF (20ng) ont été injectés en sous-cutanée. Après 30min, les souris ont été euthanasiées, des prélèvements de peau ont été réalisés puis placés dans une solution de formamide à 56°C pour extraire le bleu Evans. L'absorbance du Bleu Evans extrait est lue à 630nm avec un spectrophotomètre (Tecan).

F. Modèle d'irritation chronique de la peau

Une solution à 5% SDS/PBS1X a été appliquée sur la peau une fois par jour pendant 10 jours comme décrit précédemment par Cramer et al. Les souris ont été euthanasiées et les échantillons de peau prélevés et fixés dans une solution de PFA4%-PBS1X et enfin montés en paraffine. Une coloration à l'hématoxyline et à l'éosine a été réalisée pour l'analyse de l'épaisseur des échantillons de peau prélevés. Les images ont été acquises avec un microscope droit Microphot FXA (Nikon) et les images ont été quantifiées avec le logiciel Image J.

G. Modèle de rétinopathie induite par l'oxygène (OIR)

Le modèle de rétinopathie ischémique utilisé est le modèle de rétinopathie induite par l'oxygène chez la souris appelé OIR (oxygen-induced retinopathy) (Smith et al 1994).

Les nouveau-nés ont été maintenus à atmosphère ambiante (~21% d'O₂) avec leurs mères, de la naissance à 7 jours après la naissance (de P0 à P7). De P7 à P12, les souris ont été placées dans un caisson (Proox P110 A-Chamber, Biospherix) sous atmosphère contrôlée avec un pourcentage d'O₂ fixé à 75%, puis les souris ont été replacées à atmosphère ambiante (~21% d'O₂) à P12. Les souris ont été euthanasiées à P12, P14 ou P17 et les yeux ont été prélevés pour l'analyse après immuno-marquages ou pour une analyse génique.

H. Immunohistologie

Pour les immuno-marquages réalisés sur des rétines *in toto*, les yeux des nouveaux nés ont été prélevés à P5, P7, P9, P10, P12, P14, P15, P17 et P21, disséqués et marqués comme décrit précédemment (Nature protocol Adams 2010). Brièvement, les yeux sont prélevés, fixés dans du para-formaldéhyde 4%-PBS1X (PFA 4%) et rincés au PBS1X. Une incision dans la cornée est pratiquée pour enlever le cristallin. Puis, la cornée, la sclérotique et la couche rétinienne pigmentaire sont retirées délicatement. Enfin, quatre incisions radiales profondes sont effectuées pour diviser la rétine en quatre quadrants. Les rétines ont été marquées avec les anticorps suivants: anti CD31 (BMA), anti Fzd7 (R&D), Isolectine-B4-FITC (Sigma), anti Collagène IV (Santa cruz), puis étalées et montées entre lame et lamelle avec du milieu de montage Vectashield (Vector).

Pour les essais de prolifération *in vivo*, une injection intra-péritonéale de 5-Bromo-2'-désoxy-uridine (BrdU) (Sigma) (50µl d'une solution à 5mg/ml) a été réalisée et les souris ont été sacrifiées 6h après injection à P7, P14 ou P17 pour être analysées. Après une fixation avec du PFA4%-PBS1X, les yeux ont été disséqués et les rétines *in toto* ont été immuno-marquées avec un anticorps IB4 et anti-BrdU

(Oxford Biotechno) selon le protocole suivant. Les rétines fixées sont incubées avec du HCl 2N puis rincées avec une solution de borate puis du PBS1x avant d'être incubées avec les anticorps cités ci-dessus.

Pour évaluer l'hypoxie au sein de la rétine après OIR, une injection intra-péritonéale de pimonidazole HCl (Hypoxyprobe™-1 Plus Kit) (50µl d'une solution à 1mg/ml) a été réalisée et les souris ont été sacrifiées 1h30 après injection à P12 pour être analysées. Après une fixation avec du PFA4%-PBS1X, les yeux ont été disséqués et les rétines *in toto* ont été immuno-marquées avec un anticorps monoclonal FITC-Mab1 (Hypoxyprobe™-1 Plus Kit).

Pour les immuno-marquages sur des coupes cryogéniques, les yeux de nouveaux nés à P5 et P7 ont été prélevés, fixés dans du PFA 4%-PBS, rincés en PBS1X, inclus dans l'OCT, congelés et coupés à l'aide d'un cryostat. Les marquages immunofluorescents ont été réalisés sur les coupes cryogéniques comme décrit précédemment avec les anticorps suivants: anti CD31 (clone BMA, clone MEC 13.3 Pharmingen), anti Fzd7 (Sigma, R&D) et anti β -caténine (Sigma).

I. Analyse des rétines de souris

1) Analyse de l'angiogenèse physiologique

Le réseau vasculaire rétinien a été analysé à P5, P7, P11, P15 et P21 après la naissance à l'aide d'un microscope inverse à fluorescence (Axiovision, Zeiss). Les tip cells et les filopodes à P5 et P7 ont été analysés plus précisément à l'aide d'un microscope confocal (Olympus FV 1000) et du logiciel Imaris (Bitplane).

Le pourcentage de vascularisation sur rétine entière, l'expansion radiale du réseau vasculaire primaire (4 champs/rétine), le nombre de points de branchements par champs (8 champs/rétine), le nombre de tip cells pour 100 µm de vaisseaux (10 champs/rétine), le nombre de filopodes par tip cell (8 champs/rétine) et les angles entre les filopodes et l'axe de migration de la tip cell (10 champs/rétine) ont été mesurés et quantifiés avec le logiciel Axiovision software (Zeiss). Pour les mesures de prolifération, le ratio du nombre de cellules BrdU positives et IB4 positives sur le pourcentage de vascularisation a été quantifié avec le logiciel Image J (8 champs/rétine). Pour évaluer la régression des vaisseaux, le nombre de points de branchement IB4 négatifs et collagène IV positifs par champs a été quantifié avec le logiciel Axiovision (Zeiss) (4 champs/rétine).

2) Analyse de l'angiogenèse pathologique après OIR

Le réseau vasculaire rétinien a été analysé à P12, P14 et P17 après la naissance à l'aide d'un microscope inverse à fluorescence (Axiovision, Zeiss).

Le pourcentage de l'aire avasculaire, de l'aire hypoxique et de l'aire de néovascularisation sur rétine entière ont été mesurés et quantifiés avec le logiciel Axiovision software (Zeiss) comme décrit précédemment (Connor et al 2009).

II. Analyse *in vitro*

A. Isolement des cellules endothéliales primaires à partir des poumons de souris

Les poumons ont été prélevés et rincés dans du PBS contenant du CaCl₂ et MgCl₂ (Gibco), coupés en petits morceaux et incubés pendant 45 min à 37 °C dans une solution de PBS Ca²⁺/Mg²⁺ contenant de la collagénase de type I (Sigma). La suspension a été triturée avec une canule, puis filtrée avec un filtre de 70 µm (BD) puis de 30 µm (Miltenyi). Après centrifugation, les cellules sontensemencées en boîte de Pétri avec du milieu DMEM supplémenté en D-Valine et cultivées pendant plusieurs jours. Les cellules sont ensuite trypsinisées et incubées avec les anticorps suivants: anti-CD31 (Pharmingen) et anti-endothéline (Santacruz). La suspension cellulaire est incubée avec des billes couplées avec des IgG anti-rat (Microbeads Miltenyi). Après lavages, les cellules sont séparées par colonne magnétique (MACS MS columns, Miltenyi) selon les recommandations du fournisseur. La pureté des cellules endothéliales a été vérifiée par immunomarquage avec l'anticorps anti-CD31 et par RT-qPCR. Les cellules endothéliales isolées ont été enfin utilisées pour les expériences.

B. Culture cellulaire, transfection et traitements

Les cellules endothéliales murine MS1 (cellules issues des îlots de pancréas) ont été cultivées dans un milieu DMEM (Dabelco) supplémenté avec 5% de SVF (Hyclone). Les cellules endothéliales humaines HUVEC (Human umbilical vein endothelial cells) ont été cultivées dans un milieu EGM-2 (Lonza, CC-3156) supplémenté d'un kit de facteurs de croissance EGM-2 Single Quots (Lonza, CC-4176). Les cellules ont été déprivées dans un milieu DMEM 1% SVF/0.25%BSA avant chaque expérience.

Les fibroblastes humains ont été cultivés dans un milieu DMEM (Dabelco) supplémenté avec 20% de SVF (Hyclone) et de l'ascorbate de sodium (50µg/ml).

Les cellules humaines HEK 293 (lignée dérivée de reins embryonnaires) ont été cultivées dans un milieu DMEM (Dabelco) supplémenté avec 10% de SVF (Hyclone).

Les plasmides ont été transfectés avec l'agent de transfection Lipofectamine (Invitrogen) en suivant les instructions du fournisseur.

Les siRNA ont été transfectés avec l'agent de transfection Interferin (Polyplus) à une concentration finale de 30nM. Les oligonucléotides utilisés ont été construits par Ambion pour m-*fzd7* (NM_008057): sens-GCC AUA UCA CGG CGA GAA Att; anti-sens-UUU CUC GCC GUG AUA UGG Ctg, pour m-*DVL3* (NM_007889): sens-GGA GAA UCU GGA CAA UGA Ctt; anti-sens-GUC AUU GUC CAG AUU CUC Ctg et par Qiagen pour m-*DVL1* (NM_010091): sens-GGG ACG GAA UGG ACA AUG AdTdT; UCA UUG UCC AUU CCG UCC CdGdG, pour m-*DVL2* (NM_007888): sens-GCC UUU GUU ACU CUA UUU AdTdT; anti-sens-UAA AUA GAG UAA CAA AGG CdGdG et pour h-*fzd7* (NM_003507): sens-CUC CAA UCU UGC AAC ACU AdTdT; anti-sens-UAG UGU UGC AAG AUU GGA GdGdG. Les lentivirus ont été transduits à une multiplicité d'infection de 30 (MOI) pour les MS1 et de 10 MOI pour les HUVEC.

L'activateur de la voie β -caténine, le chlorure de lithium (LiCl, Merck), a été utilisé à 20mM *in vitro*. L'inhibiteur de la voie Notch, le DAPT (N-[N-(3,5- Difluorophenacetyl-L-alanyl)]-S-phenylglycine t-Butyl Ester) (Sigma), a été utilisé à 100ng/ml *in vitro*. Pour les essais de migration et de perméabilité, les cellules ont été activées avec du VEGF (Eurobio) à 50ng/ml ou 100ng/ml *in vitro*.

C. Essais de migration et de sprouting en 3D sur des cellules endothéliales

Pour les essais de migration, les HUVEC et MS1 ont été transfectées comme décrit ci-dessus et ensemencées dans des inserts de culture (μ -dish 35mm culture inserts, Ibidi) pour former une monocouche confluente de cellules. Les cellules ont été déprivées avec le milieu approprié et l'insert retiré au début de l'expérience. La migration des cellules a été observée 8h après le début de la migration. Le pourcentage d'aire recouverte par les cellules a été quantifiée avec les logiciels Axiovision et ZEN (Zeiss). Les marquages des fibres de stress des cellules (F-actine) avec la phalloïdine-FITC a été analysé avec un microscope à fluorescence (Axiovision, Zeiss).

Pour les essais de sprouting dans un gel en 3 dimensions, les HUVEC ont été transduites avec les lentivirus control-Ruby et control-GFP ou control-Ruby et shFzd7-GFP. Les cellules sont ensuite incubées avec des billes coatées à la gélatine (Gelatin-coated microcarrier beads, Cytodex 3; Sigma) pendant 5h. Quand les cellules ont bien adhérees aux billes et sont confluentes, un nombre constant de billes coatées avec les HUVEC est inclus dans un gel de fibrine et transvasé dans des puits de culture (μ -slide angiogenesis plate, Labtek). Le gel de fibrine est préparé extemporanément par

dissolution de fibrinogène bovin (2,5mg/mL, Sigma) dans du milieu EBM2 supplémenté en aprotinine (0,05 mg/mL; Sigma). La polymérisation du gel est induite par l'addition de thrombine (1,2 U/mL, Sigma). Après 60min, des fibroblastes humains sont ensemencés au dessus du gel de fibrine et cultivés en milieu EBM2. Le bourgeonnement («sprouting») et la formation de structure tubulaires ont été observés et analysés à l'aide d'un microscope inverse (Axiovision, Zeiss) 48h après. Le nombre de sprouts par bille et le pourcentage de contribution aux tip cells ont ensuite été quantifiés avec le logiciel Axiovision (Zeiss).

D. Test de perméabilité des cellules endothéliales

Pour étudier la perméabilité des cellules, un test de perméabilité a été réalisé à l'aide du FITC-dextran (40kDa, Sigma) et des chambres de culture cellulaire Transwell (0,4µm BD Bioscience). 48h après l'ensemencement, les cellules sont mises en milieu de déprivation 0% SVF, 0.25% BSA pendant une heure. Les cellules sont ensuite activées avec du milieu à 1%SVF/0.25%BSA contenant du FITC-dextran à 0.5mg/ml et du VEGF à 100ng/ml. Les puits contrôle contiennent uniquement du FITC-dextran. Le milieu du puit inférieur est prélevé à différents temps (5, 15, 30 ou 60min). Les échantillons obtenus sont analysés à l'aide du Infinite M200 Pro (Tecan) par lecture de la fluorescence, afin de déterminer l'indice de fluorescence. La longueur d'onde d'excitation est fixée à 485nm et celle d'émission à 525nm. Les indices de fluorescence des échantillons sont alors comparés au contrôle.

E. Test d'activation de la voie canonique

La transactivation de la β -caténine est mesurée à l'aide d'un système de gène rapporteur possédant 8 sites de fixation pour la β -caténine et codant pour une luciférase (Firefly Luciferase). Lorsque la β -caténine est transloquée dans le noyau, elle se fixe sur sa séquence de fixation du gène rapporteur et active ainsi la transcription de la luciférase. Son activité lumineuse est mesurée au Tecan. Dans cette expérience, les cellules HUVEC sont co-transfectées avec le plasmide codant pour le gène rapporteur de la voie β -caténine (Super 8X TOP/Flash, Laboratoire Randal T. Moon), avec un autre plasmide codant pour l'expression de la β -galactosidase qui permettra de normaliser les différentes conditions (contrôle de transfection). Après 48 h, l'activité luciférase est quantifiée en respectant le protocole Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) à l'aide du réactif Luciferase assay Reagent (LAR II, Promega). La mesure de l'activité luciférase est réalisée sur 3 puits par condition à l'aide du Tecan. Pour chaque condition, nous avons calculé le rapport de l'activité Firefly luciférase sur l'activité β -galactosidase. Ce rapport est normalisé par rapport aux puits contrôles. Pour analyser

le rôle de Fzd7 dans l'activation de la voie canonique suite à la fixation d'un ligand Wnt, nous avons procédé de deux façons: d'une part en réalisant des co-cultures et d'autre part en utilisant des surnageants de culture.

-Co-cultures: les cellules HUVEC sont d'abord transfectées avec les siRNA contrôle ou siRNA *fzd7*. 24h après, les cellules CHO sont transfectées avec les plasmides codant pour *Wnt1* ou pour *Wnt5A* (produits au laboratoire) et, en parallèle, les cellules HUVEC sont transfectées avec un plasmide codant pour le rapporteur Super 8X TOP/Flash. 24h après transfection des plasmides les CHO sont mises en co-culture avec les HUVEC. Le lendemain, les cellules sont lysées et l'activité luciférase est quantifiée comme décrite précédemment.

-Surnageant Wnt3A (CM Wnt3a): le surnageant Wnt3A a été obtenu à partir de lignées cellulaires exprimant le ligand Wnt3A (L Wnt3A CRL 2647). Le surnageant a été produit en suivant le protocole de l'American Type Culture Collection (ATCC).

F. Immunomarquages sur cellules

Les cellules ont été fixées avec du PFA2%-PBS1x puis perméabilisées avec une solution de Triton 0,2%-PBS1X. Les cellules ont enfin été incubées avec les anticorps suivants: anti VE-cadhérine (humain, Santa Cruz), anti VE-cadhérine (souris, Pharmingen), anti β -caténine (Sigma), anti β -caténine active (Milipore), anti Myc (Upstate), anti α -tubulin (Sigma) et anti CD31 (souris, BMA).

G. Préparation des protéines et Western blot

Les Western blots ont été réalisés comme décrit précédemment (Descamps et al 2012). Brièvement, les protéines ont été lysées dans un tampon RIPA (NP-40 1 %, déoxycholate de sodium 0,5%, Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) 0,1%, tampon tris pH8 5 mM) supplémenté en inhibiteurs de protéases ajoutés extemporanément (aprotinine 1mM, leupeptine 10 μ g/ml, AEBSF 2 mM, benzamidine 1mM) ainsi qu'un inhibiteur de phosphatases (orthovanadate 1mM). Les protéines ont été séparées par électrophorèse SDS-PAGE dans un gel de polyacrylamide puis transférées sur une membrane PVDF (Milipore) par électro-transfert.

Les protéines ont été révélées avec les anticorps suivants: anti- β -caténine phosphorylée (clone 8E7, Milipore), anti- β -caténine (Sigma), anti- α -tubulin (Sigma), anti VE-cadhérine (Santa Cruz), anti GSK-3 β totale (Euromedex), anti phospho-GSK-3 β (Ser9) (Cell signaling), anti Myc (Millipore), anti-NICD (Notch1 activated intracellular domain, Abcam), anti-EphB4 (Santa Cruz) and anti-ephrin-B2 (Santa Cruz). La révélation a été faite avec le système Odyssey Infrared Imaging System (LI-COR Biosciences).

La quantification des immunoblots a été réalisée avec le logiciel Image J et les valeurs obtenues lors de ces quantifications ont été normalisées à la quantité d' α -tubuline.

H. Immunoprécipitation des protéines

Quarante-huit heures après la transfection des HEK 293, les cellules sont lysées dans 1 ml de tampon RIPA supplémenté en inhibiteurs de protéases ajoutés extemporanément. Afin de décrocher au mieux Fzd7 de la membrane, les échantillons sont aussi soumis à un broyage avec des billes. Après centrifugation, le surnageant est récupéré et 450 μ l de ce surnageant sont mis à incuber avec un anticorps anti-Myc (Euromedex, clone 4A6), un anticorps anti VE-cadhérine (anticorps anti-Cad3, D. Gulino-Debrac, University of Grenoble, France), ou un anticorps anti-phospho Tyr (4G10) sous agitation pendant 3h à 4°C. Parallèlement, 40 μ l de billes couplées à des protéines G (Santa Cruz) sont lavées pendant 1 h dans du PBS1X. Une fois centrifugé, le culot de billes est mis en présence de la solution (échantillon + anticorps) et l'ensemble est mis à incuber toute la nuit, à 4°C, sous agitation. Le lendemain, plusieurs lavages au PBS1X suivis de centrifugations à 2500 tours/min, à 4°C, se succèdent. Le dernier culot est repris dans 80 μ l de tampon d'échantillon à 2x, bouillis à 95°C pendant 5 min, puis centrifugé une dernière fois. Le surnageant récupéré correspond par exemple aux échantillons immunoprécipités avec l'anticorps anti-Myc, c'est-à-dire ayant fixé l'étiquette Myc (et donc Fzd7). Ainsi, 20 μ l de chaque condition sont déposés et soumis à une électrophorèse SDS-PAGE, ainsi que 20 μ l d'échantillons totaux non immunoprécipités. Ces dépôts permettent de vérifier que les cellules expriment bien les constructions transfectées. Chaque condition est révélée par un anticorps anti-VE-cadhérine (Santa Cruz) ou β -caténine (Sigma).

I. Constructions: plasmides et lentivirus

Les constructions des plasmides utilisés pour les immunoprécipitations ont été obtenues au près de différents laboratoires: pcDNA3.1(2)dsRed VE-cadherin (Dr D. Gulino-Debrac, Université de Grenoble, France), pCRD-Fzd7myc-GPI (Dr Jeremy Nathans, Johns Hopkins Université de Baltimore), pmFzd7-myc (Dr M. Moncouquiol, Institut Magendie, Bordeaux, France) et pcDNA3.1(2) Δ CRD mFzd7-myc qui a été produit par notre laboratoire.

Les séquences β -catenin (plasmide pTRIP- β -cat provenant de chez MA Buendia, Institut Pasteur, France), β -catenin deltaNC, β -catenin T41A, MND eGFP mFZ7, TMEW GFP, shRNA FZ7-712 eGFP et MND Ruby ont été clonées dans le vecteur lentiviral pRRLsin-MND-MCS-WPRE par le laboratoire. Les préparations de lentivirus ont été produites par la plateforme de lentivirus de Bordeaux 2.

J. Préparation des ARN et qPCR

Les tissus de souris ou les cellules ont été lysés et homogénéisés dans du TRI-REAGENT™ (Euromedex) et les ARN ont été extraits par une méthode phénol/chloroforme selon le protocole du fournisseur. Les ARN ont ensuite subi un traitement DNase (Qiagen), puis sont dosés à l'aide d'un NanoQuant Plate Infinite M200 Pro (Tecan). Les qPCR ont été réalisées comme décrit précédemment (Descamps et al 2012). Toutes les expériences ont été réalisées en triplicata. Les résultats sont les $\Delta\Delta C_t$, normalisés par rapport à l'expression de la β -actine et calculés selon la méthode décrite par K.J. Livak et al. (Livak & Schmittgen 2001). Les séquences des amorces utilisées en qPCR sont listées ci-dessous (Tableau 8):

Gène	Sens	Séquence 5'-3'
	Anti-sens	
<i>m beta-actine</i>	F B	ATTTCTTTTGACTTGCGGGC GGAGGAGCTGGAAGCAGCC
<i>m fzd7</i>	F B	ATACCGCAGTTTCCCCCTTG GCCCGACTTTACAGTCTTC
<i>m beta-caténine</i>	F B	GTACGCACCATGCAGAATAC TGGAGCAGGAGATTATGCAG
<i>m Axin2</i>	F B	AACCTATGCCCGTTTCTCT CTGGTCACCCAACAAGGAGT
<i>m Lef1</i>	F B	CACTGACAGCAACCTTACCCTGAG CGGCTTTCTTTTGGAAAGTCGG
<i>m cyclinD1</i>	F B	AGTGCGTGCAGAAGGAGATT CACAACTTCTCGGCAGTCAA
<i>m Dll4</i>	F B	TGGCAATGTCTCCACGCCGG TGTTCCGCAAATCTTACCCACAGCA
<i>m Jagged1</i>	F B	AGTGCATGTGTCCCGGTGGC CCGTCCACACAGGTCCCGCTA
<i>m Notch1</i>	F B	ACACGGATGAGTGCGCCAGC ACACGGATGAGTGCGCCAGC
<i>m Notch4</i>	F B	TGCGAACATGGCGGCTCCTG GCGCCGGTGAATCCAGGAAGG
<i>m Hey1</i>	F B	TCCATGTCCCCAACGACATC GCAGTGTGCAGCATTTTCAG
<i>m Hey2</i>	F B	CCAATTCACCGACAACACTACC GCCTGGAGCATCTTCAAATG
<i>m Nrarp</i>	F B	CCGCCTAGCTAACC GCGACG TGGCCGCGTACTTGGCCTTG
<i>m EphrinB2</i>	F B	AAGCCAAAGGTCAAACAGG CACGGCCATAAACCAAAAAC
<i>m EphB4</i>	F B	AATGCCACAGCCTTAGACAG AGAATCCCCTTCCAAGCACC
<i>m MMP2</i>	F	TTCGCTCGTTTCCTTCAACC

	B	ACTGGGCATGATCTGCACAG
m MMP9	F B	ACCACATCGAACTTCGACAC ATACAGCGGGTACATGAGCG
m VEGF-A	F B	CTCCAGGGCTTCATCGTTA CAGAAGGAGAGCAGAAGTCC
m VEGF-C	F B	CTGGCGTGTTCCCTGCTCGC ACCGCAACTGCTCCTCCAGGT
m VEGF-R1	F B	TACGAAAAGTCCGTGTCCTCGC AGCCACCACCAATGTGCTAACC
m VEGF-R2	F B	GCCTACCTCACCTGTTTCCTGTATG TACTTCTGGTTCCTCCAATGGG
m VEGF-R3	F B	TGGCACTGGCGTCATCGCAG CACCTCCCCGGGGTCCATGA
m Norrin	F B	GTGAGGGGCACTGCAGCCAG CAGCGCAGACGCAGAGCCTT
m Fzd4	F B	TTCCTTTGTTTCGGTTTATGTGCC CTCTCAGGACTGGTTCACAGC
m Lrp5	F B	AAGGGTGCTGTGTAAGGAC AGAAGAGAACCTTACGGGACG
m Plvap	F B	GCTGGTACTACCTGCGCTATT CCTGTGAGGCAGATAGTCCA
m Dvl1	F B	TATGTCTTTGGCGACCTGTGC TGCTCTTGCTCCCTTCACTCTG
m Dvl2	F B	GTAGGCGAGACGAAGGTGATTTAC TTGAAGCAAGGTAGGCGGGCATTG
m Dvl3	F B	TTTGGGGTGGTGAAGGAAGAG TCTCCGTGTCATTGTCCAGATTG
h beta-actine	F B	GGAGGAGCTGGAAGCAGCC GCTGTGCTACGTCGCCCTG
h Fzd7	F B	GAAAAGAACTGCTGGGTGGG GCCCCGTACCTTTGACGATTC
h MMP2	F B	GCCCAAGAATAGATGCTGAC GGAGAAGAGCCTGAAGTGTG
h MMP9	F B	ACGTGACCTATGACATCCTG TCCTCCCTTTCCTCCAGAAC

Tableau 8: Liste des amorces utilisées en qPCR

K. Analyse statistique

Les résultats sont exprimés comme les moyennes \pm écarts types ou les moyennes \pm min/max. L'analyse statistique des résultats a été réalisée par une comparaison de moyennes (variables continues entre deux groupes) suivie d'un T-test non paramétrique et non apparié (Man Whitney) avec le logiciel Graphpad PRISM3. Les valeurs inférieures à $p < 0.05$ ont été considérées comme statistiquement significatives.

Résultats

Partie 1: Frizzled7 contrôle la perméabilité vasculaire *via* la voie de signalisation Wnt/canonique et une interaction avec les complexes des jonctions cellulaires endothéliales

I. Contexte scientifique

La fonction première de l'endothélium est de former un réseau vasculaire qui permet d'apporter l'oxygène et les nutriments à tous les tissus de l'organisme dont ils ont besoin pour être fonctionnels. Ce réseau vasculaire est constitué de cellules endothéliales qui sont jointives et assurent un niveau de perméabilité physiologique qui est adapté au passage du flux sanguin *via* leurs complexes de jonctions adhérentes. Ces complexes font intervenir notamment la VE-cadhérine, protéine membranaire, qui permet la liaison avec les protéines caténines (α , β , γ ou p120) (Dejana et al 2009). Dans certaines conditions pathologiques incluant les maladies ischémiques, l'inflammation chronique ou aiguë ou la formation de tumeurs, de nombreux facteurs sont sécrétés et entraînent une augmentation chronique et prolongée de la perméabilité paracellulaire endothéliale qui peut conduire à une altération de l'intégrité vasculaire, induire des fuites de liquides vers le milieu extracellulaire (notamment des hémorragies, des œdèmes) et entraîner des dysfonctions d'organes (Weis 2008).

Les voies de signalisation Wnt/Frizzled, comme décrit précédemment, sont connues pour jouer des rôles multiples et importants dans des processus physiologiques et pathologiques divers (Clevers & Nusse 2012). D'autres part, des données récentes dans le domaine de la biologie vasculaire ont permis de montrer que différents composants de ces voies interviennent dans la régulation de la différenciation, de la prolifération, de la survie, de la polarité et des jonctions des cellules endothéliales (Dejana 2010, Franco et al 2009).

Notre laboratoire a établi le rôle de cette voie Wnt/Frizzled dans la formation et la morphogenèse vasculaire en utilisant un régulateur de cette voie: sFRP1. Il a apporté la preuve que sFRP1 est exprimé dans les petits vaisseaux en formation, joue un rôle majeur dans la prolifération, migration et différenciation des cellules vasculaires et est un facteur pro-angiogénique (Dufourcq et al 2002, Dufourcq et al 2008a, Ezan et al 2004). De plus, les précédents résultats du laboratoire ont montré que plusieurs récepteurs Fzd (Fzd4 et Fzd6) sont présents dans le réseau vasculaire et que les souris délétées pour *fzd4* présentent de larges anomalies vasculaires (Descamps et al 2012). D'autre part, le laboratoire et d'autres équipes ont démontré que Fzd7 est exprimé par les cellules endothéliales et que sa déplétion induit une augmentation de l'adhésion des CE avec une

réorganisation du cytosquelette (Dufourcq et al 2008b). Plusieurs travaux ont démontré le rôle important de ce récepteur dans le développement (Djiane et al 2000), le renouvellement et la différenciation des cellules souches (Melchior et al 2008) et la progression des cancers (King et al 2012), cependant rien n'est connu en ce qui concerne son rôle potentiel dans le développement vasculaire.

II. Objectif de l'étude

Après avoir mis en évidence que Fzd7 est exprimé au niveau des jonctions endothéliales et interagit avec la VE-cadhérine, nous avons étudié le rôle et le mécanisme d'action de Fzd7 dans le contrôle de la perméabilité des cellules endothéliales *in vitro* et *in vivo*. Nous avons ensuite caractérisé le mécanisme par lequel Fzd7 contrôle la perméabilité endothéliale et les jonctions adhérentes *via* une régulation de la β -caténine et de la VE-cadhérine.

III. Stratégie

Pour étudier le rôle spécifique de Fzd7 dans l'endothélium *in vivo*, nous avons généré des souris délétées pour le gène *fzd7* spécifiquement dans les cellules endothéliales (souris *fzd7^{ECKO}*) en utilisant le système Cre-Lox sous le contrôle du promoteur Tie2.

L'impact de cette délétion a été analysé dans 3 conditions:

- Un modèle de perméabilité physiologique sans activateur: test de Miles
- Un modèle de perméabilité induite par le VEGF: test de Miles
- Une modèle de perméabilité en conditions inflammatoires: modèle d'irritation chronique de la peau

In vitro, l'impact de la déplétion de *fzd7* par des stratégies de siRNA a été abordé par des tests fonctionnels de perméabilité paracellulaire et par l'analyse des jonctions adhérentes impliquant la VE-cadhérine et la β -caténine.

Pour étudier les mécanismes moléculaires, les voies d'activations intracellulaires ont été abordées par des expériences de gène rapporteur et l'analyse de l'expression génique et protéique de cibles. Enfin, des expériences de «rescue» pharmacologique ont permis de démontrer le lien entre Fzd7, la voie canonique et le maintien de l'intégrité vasculaire.

IV. Résultats

Dans cette étude, nous avons démontré que Fzd7 est un composant essentiel des jonctions adhérentes dans les cellules endothéliales et interagit avec la VE-cadhérine *via* son domaine intracellulaire. Nous avons mis en évidence que la délétion de *fzd7* dans les CE, entraîne une augmentation de la perméabilité endothéliale en condition physiologique, après activation au VEGF et en conditions inflammatoires. *In vitro*, nos expériences ont montré que la signalisation induite par Fzd7 régule la perméabilité paracellulaire, l'organisation des jonctions adhérentes ainsi que l'expression de la VE-cadhérine et de la β -caténine. En effet, nos résultats indiquent que Fzd7 active la voie de signalisation Wnt canonique (dépendante de la β -caténine) et est capable de contrôler les jonctions cellule-cellule médiées par la VE-cadhérine *via* la régulation des niveaux d'expression de la β -caténine et de la VE-cadhérine.

V. Discussion

Une augmentation importante de la perméabilité induite par des conditions inflammatoires ou ischémiques peut entraîner une altération de la perfusion et ainsi conduire à la formation d'œdèmes et à la compression des tissus (Weis 2008). Ainsi, une meilleure compréhension des mécanismes qui participent à la régulation des jonctions adhérentes des cellules endothéliales est indispensable au développement de nouvelles stratégies thérapeutiques pour réguler spécifiquement l'hyperperméabilité observée dans les pathologies cardiovasculaires, oculaires, les cancers et maladies inflammatoires.

Comme décrit précédemment, des études ont montré le rôle des voies Wnt/Fzd dans la vascularisation au cours du développement ou des pathologies ischémiques (Dejana 2010, Franco et al 2009). Cependant, rien n'a été décrit en ce qui concerne le rôle de Fzd7 dans l'angiogenèse. Dans cette étude, nous avons mis en évidence que Fzd7 est un composant des jonctions adhérentes dans l'endothélium et que la voie Wnt/Fzd et les jonctions adhérentes sont interconnectées pour réguler l'intégrité de l'endothélium. La délétion de Fzd7 altère fortement la perméabilité des CE *in vivo* et *in vitro*, l'organisation des jonctions adhérentes, ainsi que l'expression et l'association aux jonctions de la β -caténine et de la VE-cadhérine. Ce travail a permis de démontrer pour la première fois un lien entre la voie Wnt canonique induite par Fzd7 et l'expression de la β -caténine et de la VE-cadhérine dans la cellule endothéliale.

Notre étude montre que Fzd7 est exprimé au niveau des points de contact cellule-cellule et co-localise avec les complexes β -caténine/VE-cadhérine. Nos expériences d'immunoprécipitation avec différents mutants indiquent que Fzd7 interagit avec la VE-cadhérine *via* son domaine

intracellulaire. Ces résultats sont en accord avec un travail récent qui a montré que Fzd7 interagit avec la protocadhérine axiale PAPC ou la cadhérine atypique Flamingo pour contrôler l'adhésion cellulaire chez le Xénope, suggérant que Fzd7 pourrait participer au maintien des jonctions adhérentes dans l'endothélium (Kraft et al 2012).

Pour étudier le rôle de Fzd7 dans l'angiogenèse, nous avons générées des souris délétées pour *fzd7* spécifiquement dans l'endothélium en utilisant une stratégie Cre-Lox régie par le promoteur Tie2 (souris notées *fzd7^{CKO}*). Nos résultats indiquent que la signalisation de Fzd7 est essentielle à l'intégrité et au contrôle de la perméabilité vasculaire. La délétion de *fzd7* dans les CE entraîne une augmentation de la perméabilité dans différents contextes:

- Perméabilité basale physiologique dans des tissus sains
- Hyperperméabilité aigüe en réponse au VEGF
- Hyperperméabilité chronique qui caractérise les pathologies angiogéniques.

De plus, l'altération de l'intégrité vasculaire corrèle avec une augmentation de la perméabilité paracellulaire observée *in vitro* après la délétion de *fzd7*. Nos résultats démontrent ainsi que la signalisation de Fzd7 joue un rôle clé dans la vascularisation chez l'adulte en contrôlant la perméabilité de l'endothélium.

La perméabilité de l'endothélium est régulée en partie par l'organisation dynamique des complexes jonctionnels VE-cadhérine/ β -caténine. Un changement de la structure et de la composition de ces jonctions adhérentes peut avoir des effets importants sur la perméabilité vasculaire (Dejana & Giampietro 2012). Le rôle de Fzd7 sur la régulation de l'expression des cadhérines a été décrit dans le cancer. La délétion de Fzd7 entraîne ainsi une persistance de l'état mésenchymal corrélée à une diminution d'expression de l'E-cadhérine et de la prolifération (Vincan et al 2007a). En biologie vasculaire, une modification d'expression ou de la fonction de la VE-cadhérine altère sévèrement la morphogenèse vasculaire chez l'embryon et la perméabilité vasculaire chez l'adulte (Corada et al 1999).

Notre travail montre pour la première fois un lien direct entre un récepteur Fzd et les composants des jonctions adhérentes au sein de la CE. La délétion de *fzd7* induit une altération de l'organisation des jonctions et une diminution de l'expression de la VE-cadhérine et β -caténine au niveau jonctionnel. De plus, nous avons démontré que la délétion de *fzd7* modifie la phosphorylation sur des tyrosines de la VE-cadhérine et de la β -caténine qui est associée à la dissociation des jonctions qui n'assurent plus leur fonction de barrière. Au cours de ce travail, nous nous sommes principalement focalisés sur le rôle de la voie Fzd/ β -caténine sur l'organisation des jonctions adhérentes et le contrôle de la perméabilité. Cependant, d'autres protéines de jonctions cellulaires pourraient être régulées par Fzd7. De nombreuses études ont suggéré que les jonctions serrées sont

connectées avec les jonctions adhérentes et régulent leur organisation (Wallez & Huber 2008). Au cours de notre étude, aucune modification de la claudine5 (protéine des jonctions serrées) n'a été observée après délétion de *fzd7*. De manière intéressante, l'inhibition de l'expression de *fzd7* par siRNA entraîne une altération de la distribution de la protéine ZO-1 *in vitro*. Cette protéine est capable de s'associer à différentes protéines des jonctions serrées (claudines, occludines) ou à des molécules d'adhésion, suggérant que la délétion de *fzd7* pourrait également altérer l'organisation de ces jonctions serrées.

Selon le contexte cellulaire et tissulaire, Fzd7 est capable d'orchestrer différents processus *via* l'activation des voies canonique et/ou non canoniques (Medina et al 2000). Dans notre étude, nous mettons en évidence que Fzd7 active la voie Wnt canonique. La déplétion de *fzd7 in vitro* dans les CE induit une diminution de l'activité transcriptionnelle de la β -caténine et de l'expression des gènes cibles de la β -caténine, en condition basale ou après activation avec les ligands Wnt1 et Wnt3A. De plus, l'activation de la voie Wnt canonique par un traitement avec le LiCl ou la surexpression de la β -caténine restaure la perméabilité, prévient la diminution d'expression de la β -caténine et de la VE-cadhérine ainsi que la désorganisation des jonctions adhérentes induites par la délétion de *fzd7*. Ces résultats démontrent que Fzd7 dans l'endothélium participe au contrôle de la perméabilité endothéliale *via* la voie Wnt canonique. La diminution d'expression protéique de la β -caténine pourrait être due à un défaut de signalisation de Fzd7 qui entraînerait une augmentation de l'activité du complexe de dégradation de la β -caténine. De plus, la délétion de *fzd7* entraîne une diminution du transcrit de la β -caténine suggérant que Fzd7 est capable de réguler les différents niveaux d'expression intracellulaire de la β -caténine et affecte à la fois l'activité transcriptionnelle de la β -caténine et sa fonction au niveau des jonctions. Des études génétiques utilisant différents animaux mutés pour Wnt7a, Wnt7b ou la β -caténine ont démontré un rôle central de la voie Wnt canonique dans la vascularisation du système nerveux central mais également chez l'embryon pour la β -caténine (Cattellino et al 2003, Daneman et al 2009, Liebner et al 2008). Même si les mécanismes de régulation de la perméabilité vasculaire n'ont pas été encore entièrement élucidés, nos résultats tendent à prouver que la voie Wnt/Fzd/ β -caténine est nécessaire au contrôle de la perméabilité et au maintien de l'intégrité vasculaire chez l'adulte et dans des vaisseaux sanguins n'appartenant pas au système nerveux central.

En conclusion, l'ensemble de nos données contribue à mieux comprendre la signalisation Wnt/Fzd en démontrant un rôle nouveau du récepteur Fzd7 dans l'endothélium. Cette étude a permis de mettre en évidence que Fzd7 régule la perméabilité paracellulaire *via* la voie Wnt canonique et montre une connexion directe entre la voie canonique et les jonctions adhérentes

dépendantes de la VE-cadhérine. Cette nouvelle voie Wnt/Fzd7 pourrait être la cible de nouvelles stratégies thérapeutiques visant à diminuer spécifiquement l'hyperperméabilité observée dans les pathologies ischémiques, au cours d'une inflammation chronique ou dans les cancers.

Partie 2: Frizzled7 contrôle l'angiogenèse post-natale *via* la voie Wnt/ β -caténine canonique de manière dépendante et indépendante de la voie Dll4/Notch

I. Contexte scientifique

Les voies de signalisation Wnt/Frizzled sont connues pour jouer un rôle important dans de multiples processus physiologiques et pathologiques (Clevers & Nusse 2012). De récents travaux dans le domaine de la biologie vasculaire ont mis en lumière l'importance de nombreux composants de ces voies dans le contrôle de la biologie des cellules endothéliales et notamment dans la régulation de la différenciation des cellules souches, de la prolifération, de la survie, des jonctions cellulaires et de la polarité (Dejana 2010, Franco et al 2009). Différentes stratégies utilisant des animaux mutants pour *frizzled4*, *Lrp5*, *Lef1* et *Norrin* ont été utilisées pour abroger la voie de signalisation Wnt canonique et étudier l'impact sur l'angiogenèse post-natale dans la rétine. La délétion de ces composants des voies Wnt entraîne des altérations similaires du réseau vasculaire, telles qu'une absence de capillaires intra-rétiniens, des défauts d'organisation vasculaire, des anastomoses-artério-veineuses et des hémorragies intraoculaires (Junge et al 2009, Xia et al 2010, Xu et al 2004).

Des interactions génétiques entre les voies de signalisation Wnt/Fzd et Notch ont été décrites au cours du développement embryonnaire (Hayward et al 2008). Plus récemment un lien entre ces deux voies a été suggéré dans le développement vasculaire. La β -caténine active l'expression de Dll4 (Corada et al 2010). D'autre part *Nrarp*, qui inhibe en retour la voie Notch, active au contraire *Lef1* au cours de l'angiogenèse (Phng et al 2009). Bien que les acteurs de la voie Wnt canonique modulent les acteurs de la voie Notch et réciproquement, actuellement, la plupart des mécanismes moléculaires qui relient la signalisation Wnt et Notch sont en aval des récepteurs Fzd. Ainsi les interactions entre les récepteurs Frizzled et la signalisation Notch au cours de l'angiogenèse restent encore inconnues.

Récemment, nous avons démontré que *Fzd7* est exprimé par les cellules endothéliales et contrôle l'intégrité vasculaire *via* l'activation de la voie dépendante de la β -caténine (Ferreira Tojais et al 2014). Ainsi, nous avons émis l'hypothèse que *Fzd7* serait essentiel au développement vasculaire post-natal et pourrait être le lien entre la voie de signalisation de la β -caténine et l'activation de la voie Notch.

II. Objectif de l'étude

L'objectif de cette étude a été d'étudier l'impact de la délétion de *fzd7* sur l'angiogenèse post-natale de la rétine chez la souris et de déterminer si *Fzd7* est le lien manquant entre les voies de signalisation Wnt canonique et Notch au cours de ce processus.

III. Stratégie

Pour cette étude plusieurs lignées de souris transgéniques ont été utilisées:

- la lignée constitutive délétée pour *fzd7* dans les CE sous le promoteur Tie2-Cre
- la lignée inductible délétée pour *fzd7* dans les CE sous le promoteur PDGFb-iCre
- la lignée délétée pour DVL1, partenaire intracellulaire de la voie Wnt canonique

L'impact de la délétion de *fzd7* et de DVL1 sur l'angiogenèse a été évalué dans le modèle du développement vasculaire post-natal dans la rétine chez la souris.

L'étude du phénotype vasculaire a été réalisée par analyse du réseau vasculaire après marquages immunofluorescents, mais également par une analyse de la modification génique.

Afin de déterminer les voies d'activation contrôlées par *fzd7* au cours de l'angiogenèse, des stratégies d'activation ou d'inhibition des voies de signalisation Wnt canonique et Notch par des agents pharmacologiques (LiCl, rDII4, DAPT) ont été menées *in vivo* et *in vitro* pour observer ou non la réversion des phénotypes.

Enfin, des tests fonctionnels *in vitro* ont permis de caractériser le rôle de *Fzd7* dans la sélection des tip/stalk cells et dans la migration cellulaire.

IV. Résultats

A. Expression et localisation du récepteur Frizzled7 dans la rétine chez la souris

L'expression de l'ARNm de *Fzd7* a été étudiée par qPCR dans des rétines de souris contrôles C57Bl6/J à 5, 7, 15 et 21 jours après la naissance (P5, P7; P15 et P21) (Figure 27).

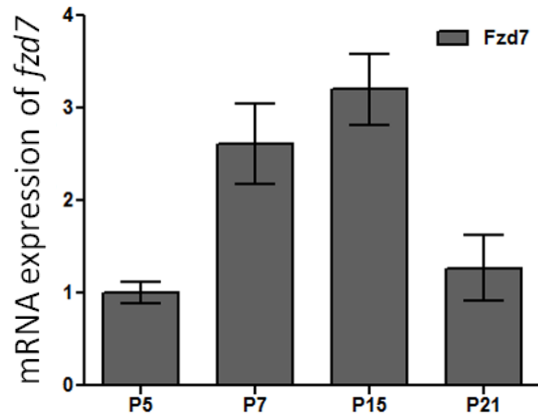


Figure 27: Cinétique d'expression de l'ARNm de Fzd7 par qPCR dans la rétine de souris C57BL6/J à P5, P7, P15 et P21. Expression normalisée par rapport à la β -actine.

Les résultats indiquent que Fzd7 est exprimé dans la rétine au cours de la vascularisation post-natale. L'expression de Fzd7 augmente entre P5 et P15 au fur et à mesure que le réseau vasculaire se forme, atteint un maximum d'expression à P15 lorsque les trois plexus se sont formés, puis diminue à P21 lorsque le réseau vasculaire rétinien est complet, remodelé et mature.

Parallèlement, nous avons étudié l'expression de la protéine Fzd7 dans le réseau vasculaire de la rétine. Pour cela, des co-marquages immunofluorescents de Fzd7 et des vaisseaux sanguins (anticorps CD31) ont été réalisés sur des coupes cryogéniques d'yeux de souris C57BL6/J à P7 (Figure 28).

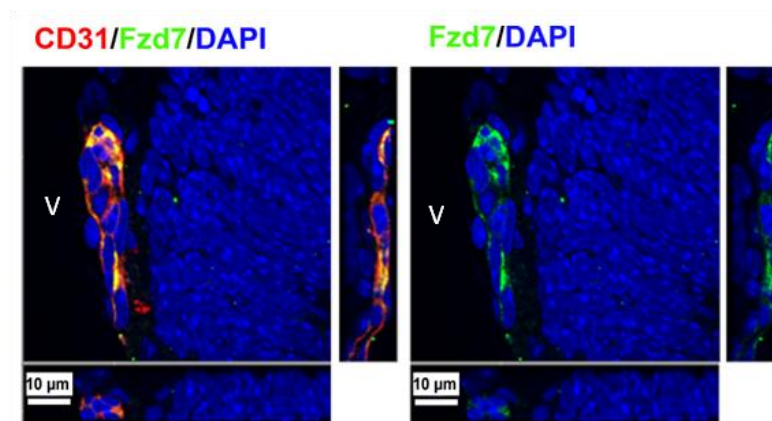


Figure 28: Expression de la protéine Fzd7 dans le réseau vasculaire de rétine de souris C57BL6/J à P7. Fzd7 est exprimé par les cellules endothéliales du réseau vasculaire rétinien à P7. Images obtenues avec un microscope confocal, objectif X63. Co-marquage Fzd7 (vert) et cellules endothéliales (CD31, rouge), noyaux (DAPI, bleu). V: humeur vitrée.

Les images ont été acquises et analysées avec un microscope confocal et montrent que la protéine Fzd7 est exprimée par les cellules endothéliales du réseau vasculaire de la rétine à P7.

Afin d'étudier plus précisément la localisation de la protéine Fzd7 dans le réseau vasculaire rétinien, des co-marquages immunofluorescents de Fzd7 et des vaisseaux sanguins ont été réalisés *in toto* sur des rétines de souris C57Bl6/J à P7.

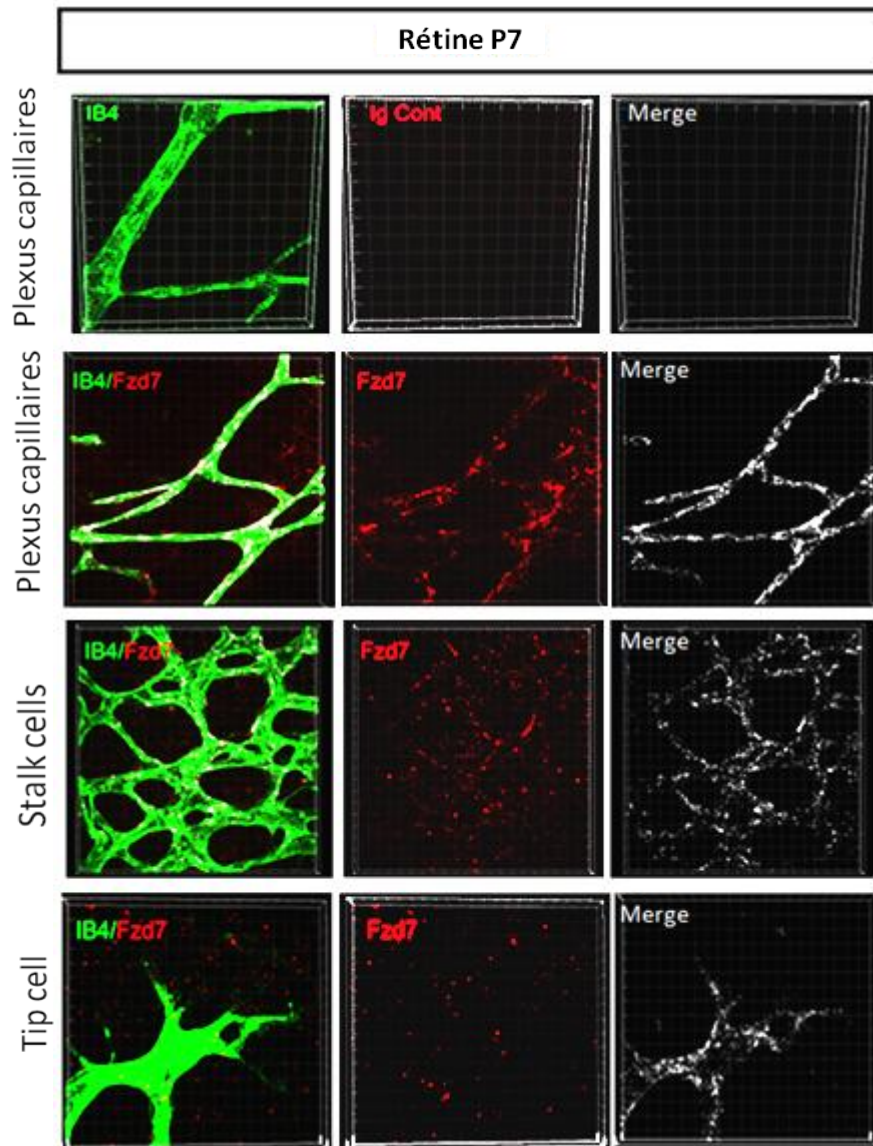


Figure 29: Localisation de la protéine Fzd7 dans le réseau vasculaire de rétine de souris C57BL6/J à P7. Fzd7 est exprimé par le réseau de capillaires et est plus finement exprimé par les stalk cells et les tip cells. Images obtenues avec un microscope confocal. Co-marquage Fzd7 (rouge) et vaisseaux sanguins (Isolectine B4, IB4, vert). Le canal Merge (blanc) est obtenu après une analyse de la colocalisation entre Fzd7 et IB4 par le logiciel Imaris Coloc.

L'analyse des images par microscopie confocale après une reconstruction en 3 dimensions (Logiciel Imaris) montre que Fzd7 est exprimé par le réseau de capillaires mais également par les stalk cells. Cependant, l'expression de Fzd7 n'est pas spécifique du réseau vasculaire, un marquage est aussi observé dans des zones IB4 négatives. Au niveau des tip cell situées au front de bourgeonnement du plexus vasculaire en formation, l'expression de Fzd7 est toujours punctiforme mais plus faible. L'analyse de la colocalisation par microscopie confocale (logiciel Coloc Imaris) montre que Fzd7 est bien exprimé dans les structures IB4 positives (merge) (Figure 29).

En conclusion, l'ensemble de ces résultats prouvent que Fzd7 est exprimé dans la rétine au cours de la vascularisation post-natale de ce tissu et atteint un pic d'expression à P15, c'est-à-dire lorsque les trois plexus vasculaires rétinien sont formés. D'autre part, Fzd7 est exprimé par le réseau vasculaire de la rétine au niveau du réseau de capillaires, mais également dans les tip cells et les stalk cells.

B. Fzd7 contrôle l'angiogenèse post-natale de la rétine chez la souris

Pour analyser le rôle potentiel de Fzd7 dans l'angiogenèse physiologique, le modèle d'étude que nous avons choisi est la vascularisation post-natale de la rétine chez la souris, qui est un modèle validé, largement utilisé et bien décrit.

Afin d'étudier l'impact de la délétion spécifique de *fzd7* dans l'endothélium sur l'angiogenèse, nous avons générés et utilisés deux lignées de souris spécifiquement délétées pour *fzd7* dans les cellules endothéliales: la lignée constitutive Tie2-Cre et la lignée inductible PDGFb-iCre. La validation de ces deux lignées a été détaillée dans la partie Matériel et méthodes.

1) Analyse du phénotype vasculaire rétinien pour la lignée Tie2-Cre

Pour étudier le phénotype vasculaire des souris délétées pour *fzd7* dans les cellules endothéliales sous le contrôle du promoteur Tie2-Cre (souris Tie2-Cre+, *fzd7*^{F/F} notées *fzd7*^{ECKO}) ainsi que les souris contrôles (souris Tie2-Cre-, *fzd7*^{F/F} notées *fzd7*^{ECWT}) issues du même croisement, des marquages du réseau vasculaire ont été effectués *in toto* à l'aide d'un anticorps CD31 sur des rétines de souris à P5 et P7 (Figure 30).

Nos résultats indiquent que les rétines de souris mutantes *fzd7*^{ECKO} à P5 et à P7 présentent une diminution importante du pourcentage de vascularisation du plexus primaire (Figure 30, A et C) ainsi qu'une diminution de l'expansion radiale du réseau vasculaire primaire (distance en μm du nerf optique vers la périphérie du plexus en formation) (Figure 30, B et D) comparées aux rétines de souris *fzd7*^{ECWT}. Ces données indiquent que la délétion de *fzd7* sous le contrôle du promoteur Tie2 entraîne un retard de formation du plexus vasculaire primaire.

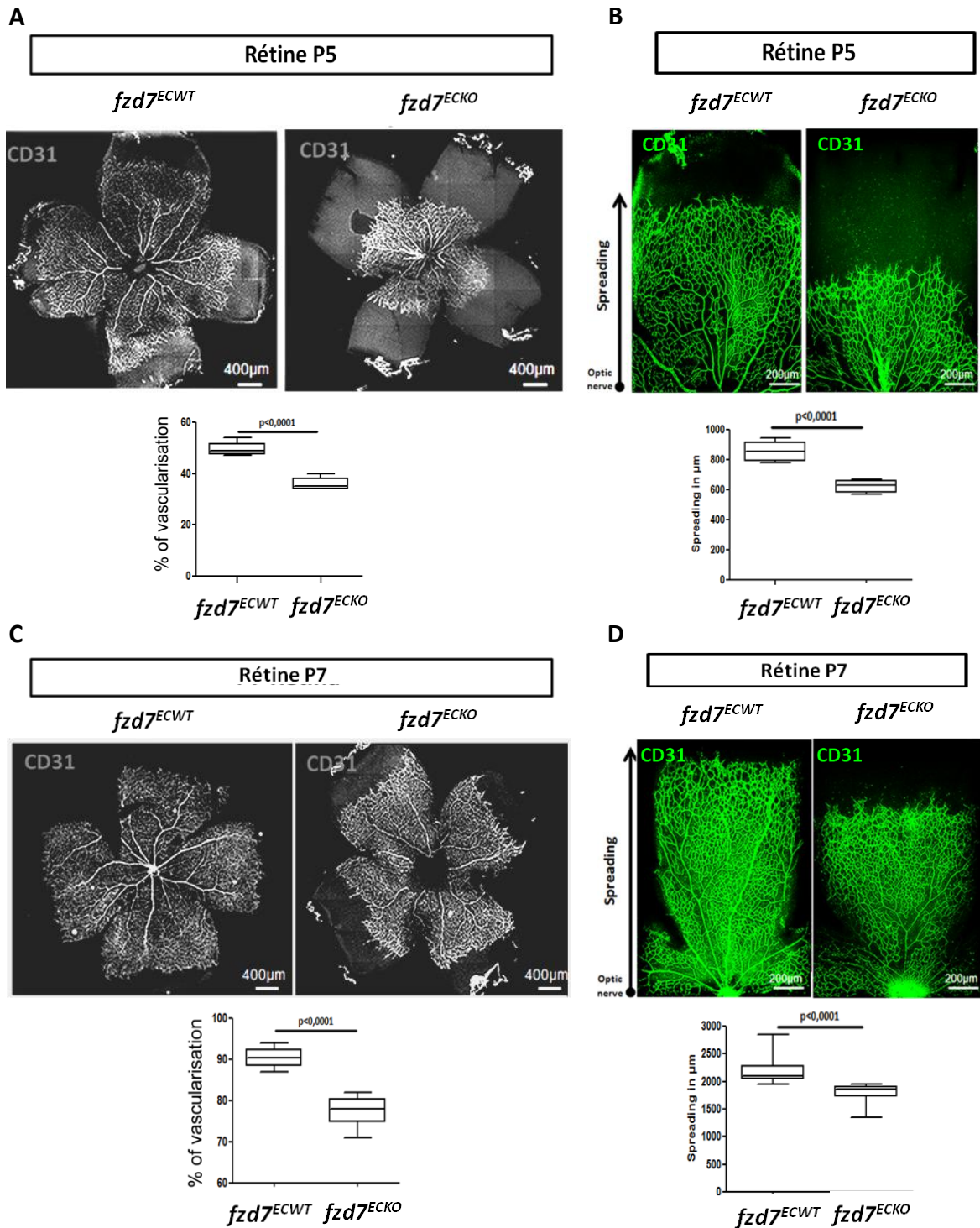


Figure 30: Retard de formation du plexus vasculaire primaire à P5 et P7 dans les souris $fzd7^{ECKO}$ vs $fzd7^{ECWT}$. (A-B) A P5, une diminution du pourcentage de vascularisation (A) et de l'expansion radiale du plexus vasculaire primaire en μm (B) est observée dans les rétines de souris $fzd7^{ECKO}$ vs $fzd7^{ECWT}$. $fzd7^{ECWT}$ $n=6$; $fzd7^{ECKO}$ $n=8$. (C-D) A P7, une diminution du pourcentage de vascularisation (C) et de l'expansion radiale du plexus vasculaire primaire en μm (spreading) (D) est observée dans les rétines de souris $fzd7^{ECKO}$ vs $fzd7^{ECWT}$. $fzd7^{ECWT}$ $n=8$; $fzd7^{ECKO}$ $n=10$. Marquage du réseau vasculaire avec l'anticorps CD31 (gris ou vert). Les images représentatives de la quantification ont été acquises et analysées avec un microscope Zeiss (Axio Observer).

2) Analyse du phénotype vasculaire rétinien pour la lignée PDGFb-iCre

a) Retard de formation du plexus vasculaire primaire et profond dans les rétines de souris $fzd7^{iECKO}$

Les souris transgéniques sous contrôle du promoteur Tie2, induisent une délétion dans les CE mais aussi dans la lignée myéloïde (Kisanuki 2001). Nous avons donc étudié le phénotype vasculaire des souris délétées pour $fzd7$ dans les cellules endothéliales sous le contrôle du promoteur PDGFb-iCre (souris PDGFb-iCre+, $fzd7^{F/F}$ notées $fzd7^{iECKO}$) ainsi que les souris contrôles (souris PDGFb-iCre-, $fzd7^{F/F}$ notées $fzd7^{iECWT}$) issues du même croisement. Les marquages du réseau vasculaire ont été effectués *in toto* à l'aide d'un anticorps CD31 ou de l'Isolectine B4 sur des rétines de souris à P5 et P7 (Figure 31).

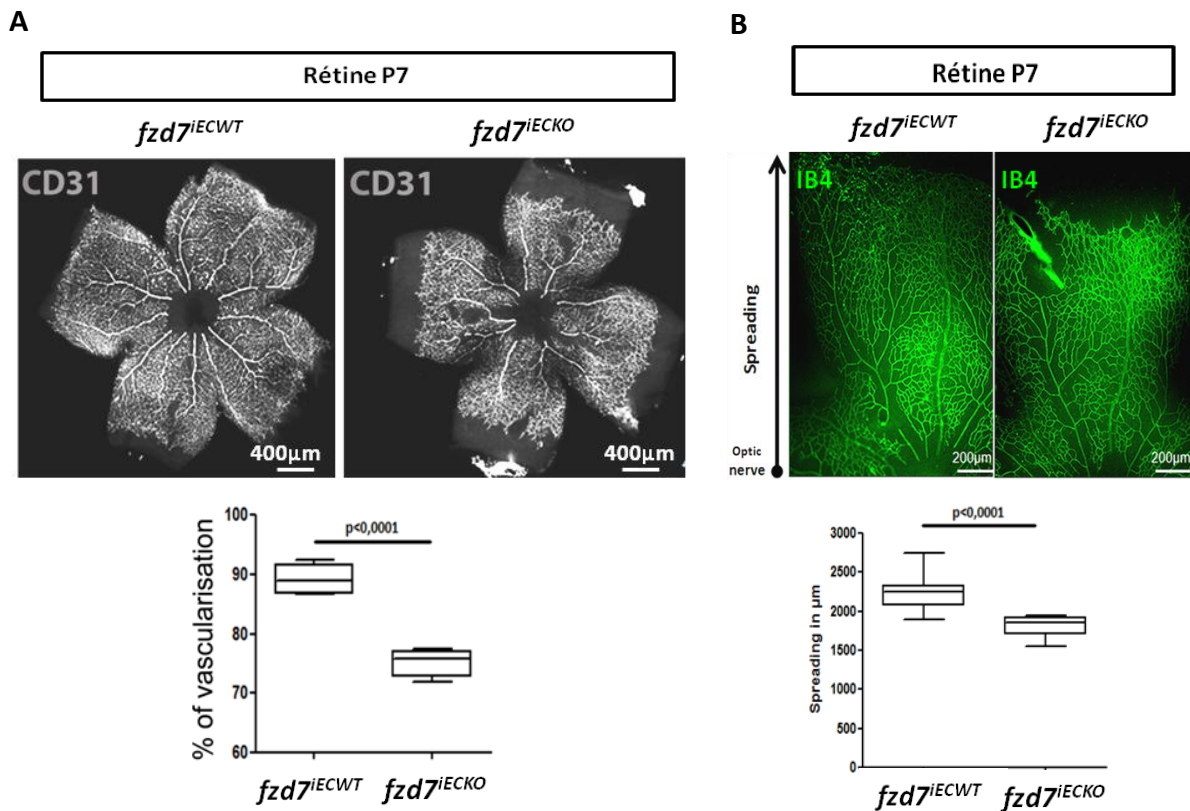


Figure 31: Retard de formation du plexus vasculaire primaire à P7 dans les souris $fzd7^{iECKO}$ vs $fzd7^{iECWT}$. (A-B) A P7, une diminution du pourcentage de vascularisation (A) et de l'expansion radiale du plexus vasculaire primaire en µm (B) est observée dans les rétines de souris $fzd7^{iECKO}$ vs $fzd7^{iECWT}$. $fzd7^{iECWT}$ n=8; $fzd7^{iECKO}$ n=10. Marquage du réseau vasculaire avec l'Isolectine B4 (IB4, gris ou vert). Les images représentatives de la quantification ont été acquises et analysées avec un microscope Zeiss (Axio Observer).

Nos résultats montrent que les rétines de souris mutantes $fzd7^{iECKO}$ à P7 présentent une diminution importante du pourcentage de vascularisation (Figure 31, A) ainsi qu'une diminution de l'expansion radiale du réseau vasculaire primaire (Figure 31, B) comparées aux rétines de souris contrôles $fzd7^{iECWT}$. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus avec la lignée Tie2-Cre et montrent que les deux mutants présentent des phénotypes vasculaires rétiniens totalement similaires. Ces expériences prouvent que Fzd7, exprimé dans les CE, est indispensable à l'angiogenèse post-natale.

Nous avons ensuite poursuivi l'analyse du phénotype vasculaire avec la lignée PDGFb-iCre à des temps plus tardifs afin d'étudier l'impact de la délétion de $fzd7$ sur la formation du plexus vasculaire profond. Des marquages du réseau vasculaire ont été effectués *in toto* à l'aide de l'Isolectine B4 sur des rétines de souris à P11. L'analyse du marquage immunofluorescent a été réalisée à l'aide de l'AxioZoom équipé d'un Apotome (Zeiss) permettant de réaliser des images focales avec un pas de 1 μ m. Cette analyse permet de discriminer les 3 plexus dans le z (Figures 32).

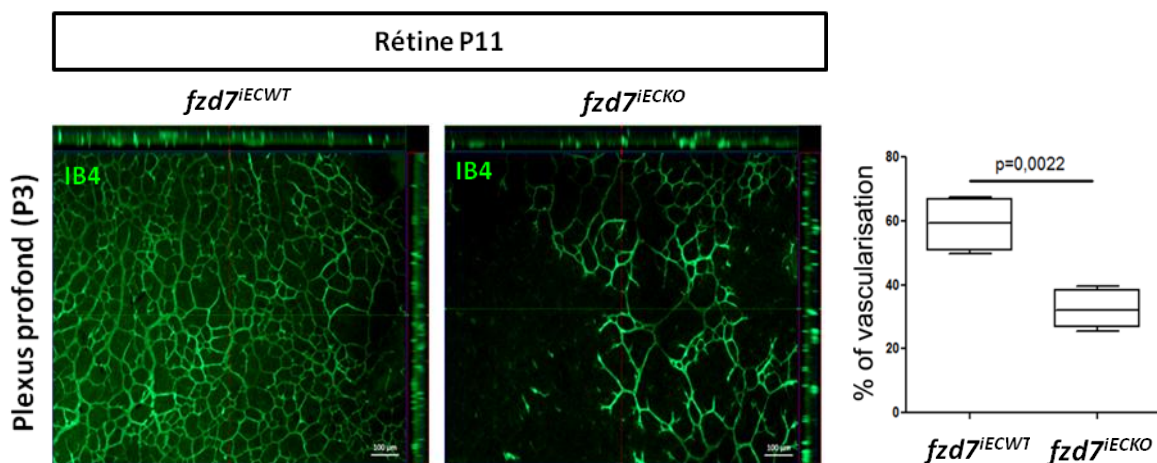


Figure 32: Retard de formation du plexus vasculaire profond à P11 dans les souris $fzd7^{iECKO}$ vs $fzd7^{iECWT}$. A P11, on observe une forte diminution du pourcentage de vascularisation du plexus profond dans les rétines de souris $fzd7^{iECKO}$ vs $fzd7^{iECWT}$. $fzd7^{iECWT}$ n=5; $fzd7^{iECKO}$ n=5. Marquage du réseau vasculaire avec l'Isolectine B4 (IB4, vert) a permis de visualiser le réseau vasculaire. Les images ont été acquises et analysées avec un microscope Zeiss (Axiozoom, Apotome). Le plan x-y représenté sur la figure correspond au plexus profond.

L'analyse des rétines de souris $fzd7^{iECKO}$ vs $fzd7^{iECWT}$ à P11 révèle que la délétion de $fzd7$ dans les CE entraîne également un retard important du plexus vasculaire profond. A P11, on remarque que le plexus profond recouvre les 2/3 de la rétine dans les souris contrôles $fzd7^{iECWT}$ et seulement 1/3 dans

les rétines de souris *fzd7^{IECKO}*. Ainsi, la délétion de *fzd7* induit un retard de la vascularisation de la rétine et touche les plexus vasculaires primaires mais aussi profonds.

Afin de définir si ce retard peut être dû à une altération de formation du réseau ou à une altération du remodelage vasculaire nous avons focalisé notre analyse du phénotype à P7 au niveau du front de migration et au niveau du plexus vasculaire.

b) Altération du phénotype des tip cells dans les rétines de souris *fzd7^{IECKO}* à P7

L'analyse du réseau vasculaire à P7 au niveau du front de bourgeonnement du plexus vasculaire primaire en formation montre la présence de nombreuses tip cells dans les rétines contrôles (Figure 33, A). La délétion de *fzd7* dans les CE entraîne une augmentation importante de près de 50% du nombre tip cells (Figure 33, A-B) et du nombre de filopodes par tip cell (Figure 33, C). De plus, les filopodes dans les rétines *fzd7^{IECKO}* forment des angles plus grands avec l'axe de migration de la tip cell comparé aux souris *fzd7^{IECWT}*. En effet, dans les rétines contrôles la majorité des filopodes (soit 54%) forment un angle compris entre 0° et 20°, alors que les filopodes dans les rétines de souris mutantes ne semblent pas suivre l'axe de migration de la tip cell, mais sont plutôt projetés par la cellule de manière désorganisée (82% des angles sont supérieurs à 20°), montrant ainsi une désorientation de ces prolongements (Figure 33, D). L'ensemble de ces résultats démontre une altération importante du phénotype des tip cells dans les rétines de souris *fzd7^{IECKO}*.

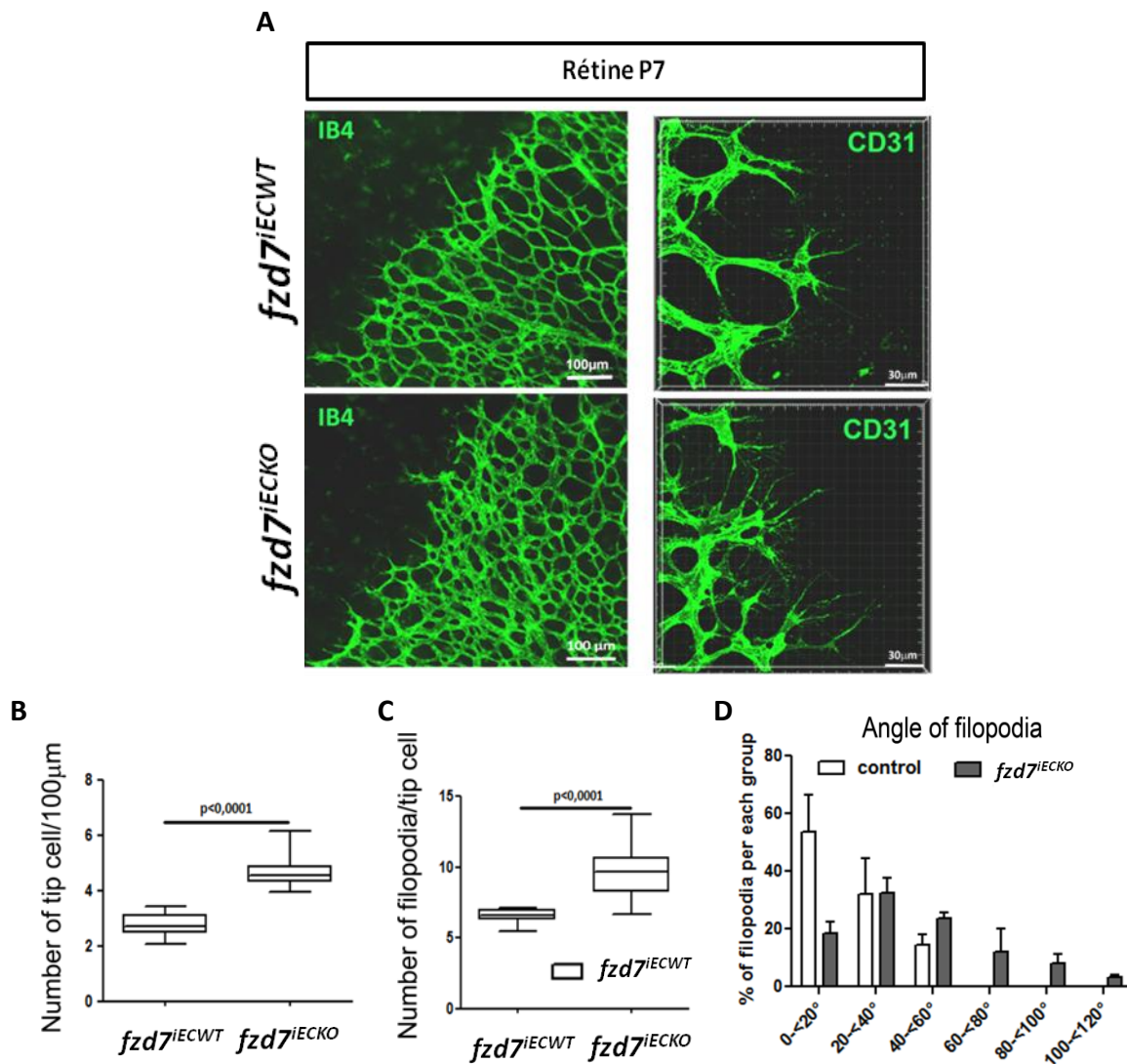


Figure 33: Altération du phénotype des tip cells à P7 dans les souris *fzd7*^{iECKO} vs *fzd7*^{iECWT}. (A) Images représentatives des tip cells et stalks cells au front de migration et de bourgeonnement du plexus vasculaire primaire en formation. (B-C) Une forte augmentation du nombre moyen de tip cells pour 100μm de vaisseaux (*fzd7*^{iECWT} n=8; *fzd7*^{iECKO} n=10) (B) et du nombre moyen de filopodes par tip cell (*fzd7*^{iECWT} n=5; *fzd7*^{iECKO} n=6) (C) est observée dans les rétines de souris *fzd7*^{iECKO} vs *fzd7*^{iECWT}. (D) Dans les rétines contrôles, 54% des angles formés par les filopodes avec l'axe de migration de la tip cell sont compris entre 0 et 20°, tandis que dans les souris *fzd7*^{iECKO} 82% des angles sont supérieurs à 20°. *fzd7*^{iECWT} n=4 (130 filopodes); *fzd7*^{iECKO} n=4 (180 filopodes). Marquage du réseau vasculaire avec l'anticorps CD31 ou l'Isolectine B4 (vert). Les images représentatives de la quantification ont été acquises et analysées avec un microscope Zeiss (Axio Observer) et un microscope confocal Olympus (Bitplane Imaris).

c) Analyse du phénotype des rétines de souris $fzd7^{iECKO}$ au niveau de plexus vasculaire

i. Altération de la prolifération dans les rétines de souris $fzd7^{iECKO}$ à P7

Nous nous sommes ensuite intéressés aux stalk cells et au réseau de capillaires et avons ainsi réalisé des co-marquages avec l'Isolectine B4 et l'anticorps anti BrdU pour évaluer la prolifération au sein du réseau vasculaire à P7 (Figure 34).

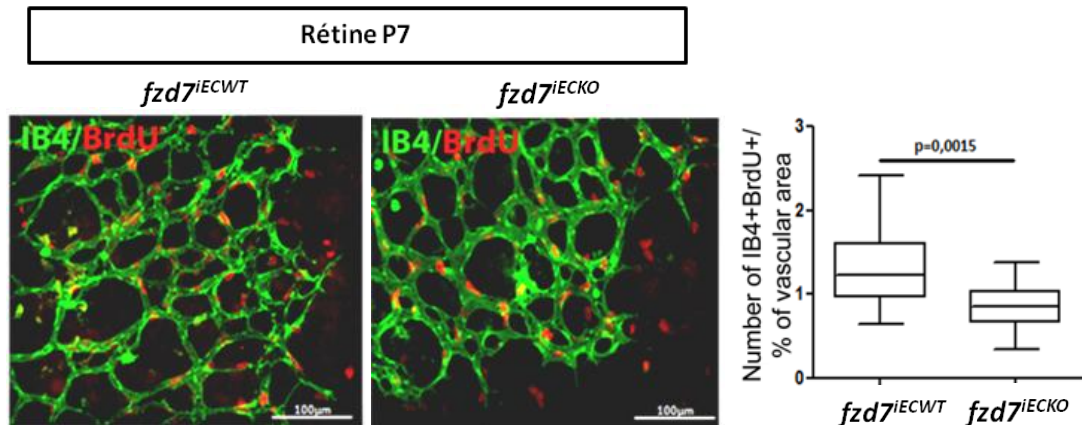


Figure 34: Altération de la prolifération au niveau du plexus formé par les capillaires à P7 dans les souris $fzd7^{iECKO}$ vs $fzd7^{iECWT}$. A P7, on observe une diminution du nombre de cellules IB4+/BrdU+ rapporté au réseau vasculaire dans les rétines de souris $fzd7^{iECKO}$ vs contrôles qui indique une diminution de la prolifération dans la région des stalk cells. $fzd7^{iECWT}$ n=5; $fzd7^{iECKO}$ n=6. Marquage du réseau vasculaire avec l'Isolectine B4 (vert) et des cellules en prolifération avec l'anticorps anti BrdU (rouge). Les images représentatives de la quantification ont été acquises et analysées avec un microscope Zeiss (Axio Observer).

Nos résultats mettent en évidence une diminution significative de 30% de la prolifération des stalk cells dans le réseau de capillaires des rétines de souris mutantes comparé aux souris contrôles.

ii. Absence de modification de la régression dans les rétines de souris $fzd7^{iECKO}$

Pour étudier l'effet de la délétion de $fzd7$ dans les CE sur la régression des vaisseaux sanguins, des co-marquages avec l'Isolectine B4 et l'anticorps anti Collagène IV ont été réalisés sur les rétines des souris $fzd7^{iECKO}$ vs $fzd7^{iECWT}$ (Figure 35). L'analyse de la régression des vaisseaux sanguins à P5 dans les rétines des souris $fzd7^{iECKO}$ vs $fzd7^{iECWT}$ n'a révélée aucune différence significative, démontrant que Fzd7 n'intervient pas dans la phase du remodelage du réseau vasculaire.

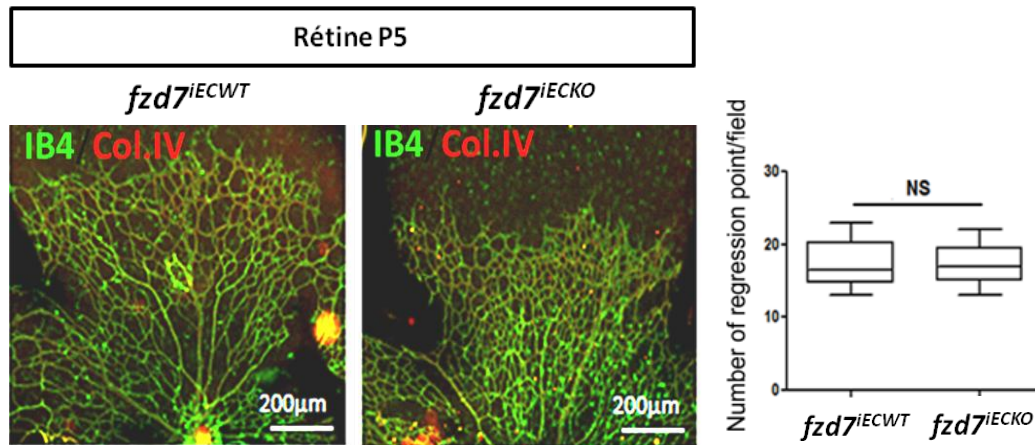


Figure 35: Analyse de la régression vasculaire à P5 dans les souris *fzd7^{iECKO}* vs *fzd7^{iECWT}*. A P5, aucune modification du nombre de points de régression par champs dans les rétines de souris *fzd7^{iECKO}* vs *fzd7^{iECWT}* n'a été observée montrant ainsi l'absence d'altération de la régression du réseau vasculaire *fzd7^{iECWT}* n=5; *fzd7^{iECKO}* n=5. Un co-marquage avec l'Isolecithine B4 (vert) et l'anticorps anti collagène IV (rouge) a permis d'évaluer la régression des vaisseaux. Les images représentatives de la quantification ont été acquises et analysées avec un microscope Zeiss (Axio Observer).

iii. Altération de la densité vasculaire dans les rétines de souris *fzd7^{iECKO}* à P7

Nous nous sommes également intéressés au «branching» du réseau de capillaires et avons ainsi réalisé des marquages avec l'anticorps CD31 pour quantifier la densité vasculaire à P7. Cette analyse a été réalisée de façon indépendante d'une part dans les zones artérielles et d'autre part dans les zones veineuses.

Nos résultats montrent une augmentation significative du branching et donc de la densité vasculaire au niveau des territoires veineux (Figure 36, A), mais pas dans les territoires artériels (Figure 36, B) dans les rétines des souris *fzd7^{iECKO}* vs *fzd7^{iECWT}* à P7.

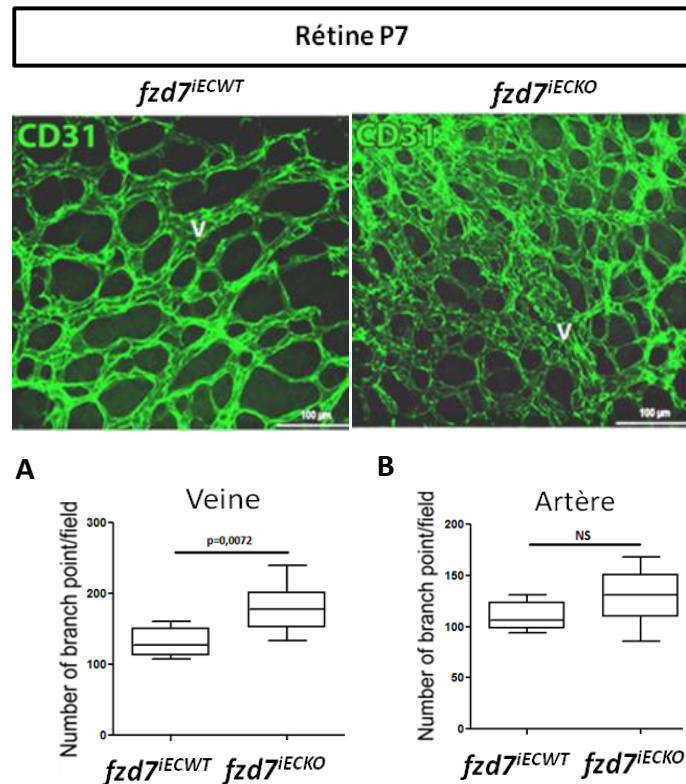


Figure 36: Altération de la densité vasculaire au niveau des territoires veineux à P7 dans les souris *fzd7*^{iECKO} vs *fzd7*^{iECWT}. (A-B) A P7, on observe une augmentation du nombre de points de branchements par champs dans les rétines de souris *fzd7*^{iECKO} vs *fzd7*^{iECWT} qui indique une augmentation de la densité vasculaire dans les territoires veineux (A) mais dans au niveau artériel (B). *fzd7*^{iECWT} n=5; *fzd7*^{iECKO} n=6. Marquage du réseau vasculaire avec l'anticorps CD31 (vert). Les images représentatives de la quantification ont été acquises et analysées avec un microscope Zeiss (Axio Observer). V : veine.

iv. Absence de modification de la maturation dans les rétines de souris *fzd7*^{iECKO}

Enfin, nous avons évalué l'effet de la délétion spécifique de *fzd7* sur la maturation des vaisseaux sanguins. Pour apprécier la maturation des vaisseaux un marquage des cellules musculaires lisses avec l'anticorps anti α SMA a été réalisé *in toto* sur des rétines de souris *fzd7*^{iECKO} vs contrôles *fzd7*^{iECWT} à P15 et P21 (Figure 37). L'analyse des rétines montrent que les gros troncs artériels sont recouverts par les cellules musculaires lisses à P15. Puis à P21. On remarque que le marquage des CML s'étend aux petites ramifications artérielles ainsi qu'aux troncs veineux. Aucune différence dans le recouvrement des vaisseaux par les CML et donc dans la maturation des vaisseaux n'a été observée entre les rétines des souris *fzd7*^{iECKO} vs *fzd7*^{iECWT} à P15 et P21.

En conclusion, l'ensemble de nos données montrent que la délétion de *fzd7* dans les CE entraîne un retard de formation du plexus vasculaire primaire et du plexus profond. Au niveau du front de bourgeonnement du réseau en formation à P7, les souris mutantes *fzd7^{iECKO}* présentent une altération des tip cells avec une augmentation du nombre de tip cells et du nombre de filopodes par tip cell, ainsi qu'une altération de l'orientation des filopodes. De plus, au sein du plexus vasculaire, la délétion de *fzd7* induit une diminution de la prolifération des stalk cells mais ne modifie pas la régression et le remodelage du réseau vasculaire. D'autre part, une augmentation de la densité vasculaire et donc du «branching» est observée au niveau des territoires veineux, mais pas artériels, du plexus rétinien des souris *fzd7^{iECKO}*. Enfin, la délétion de *fzd7* dans les CE n'entraîne aucune altération de la maturation du réseau vasculaire.

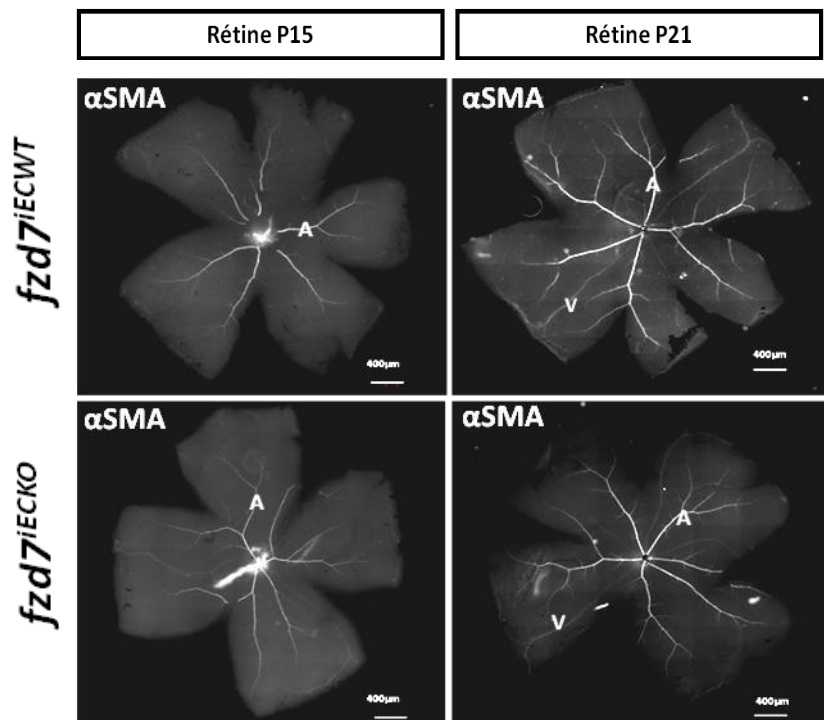


Figure 37: Analyse de la maturation du réseau vasculaire à P15 et P21 dans les souris *fzd7^{iECKO}* vs *fzd7^{iECWT}*. A P15 et P21, on peut observer le recouvrement des gros troncs artériels, des ramifications et des veines par les CML. Aucune altération de la maturation des vaisseaux n'a été observée dans les rétines de souris *fzd7^{iECKO}* vs *fzd7^{iECWT}*. *fzd7^{iECWT}* n=5; *fzd7^{iECKO}* n=5. Marquage des cellules musculaires lisses avec l'anticorps anti- α SMA (blanc). Les images ont été acquises et analysées avec un microscope Zeiss (Axio Observer). A : artère, V : veine.

C. La délétion de DVL1 et la diminution d'expression de DVL1 et 3 miment le phénotype vasculaire observé dans les rétines de souris $fzd7^{ECKO}$

Nous avons démontré précédemment que Fzd7 est capable de recruter les protéines cytoplasmiques DVL1 et DVL3 à la membrane pour activer les voies de signalisation Wnt/Fzd dans les cellules endothéliales (Descamps et al 2012). Ainsi, nous avons analysé par la suite l'effet de la délétion de *DVL1* sur le phénotype vasculaire rétinien. Des marquages avec l'anticorps CD31 sur des rétines à P5 ont permis de mettre en évidence une diminution du pourcentage de vascularisation (Figure 38, A) ainsi qu'une augmentation importante du nombre de tip cells au niveau du front de migration du plexus vasculaire primaire en formation (Figure 38, B) dans les souris *DVL1*^{-/-} comparées aux souris contrôles *DVL1*^{+/+}. Ce phénotype vasculaire bien qu'il soit moins sévère est similaire à celui décrit pour les souris $fzd7^{ECKO}$ et $fzd7^{iECKO}$.

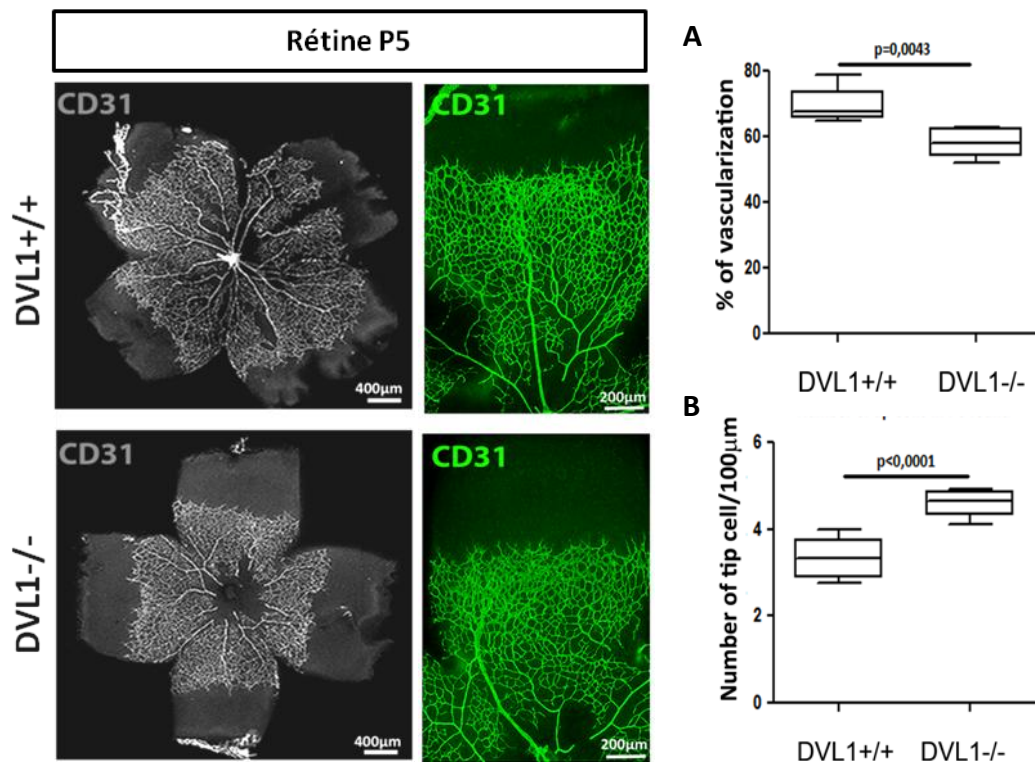


Figure 38: La délétion de *DVL1* entraîne un phénotype vasculaire rétinien moins sévère mais similaire à celui des souris $fzd7^{iECKO}$. (A-B) A P5, une diminution du pourcentage de vascularisation (A) et du nombre de tip cells pour 100µm de vaisseaux (B) est observée dans les rétines de souris *DVL1*^{-/-} vs *DVL1*^{+/+}. *DVL1*^{+/+}, n=6; *DVL1*^{-/-}, n=5. Marquage du réseau vasculaire avec l'anticorps CD31 (gris ou vert). Les images représentatives de la quantification ont été acquises et analysées avec un microscope Zeiss (Axio Observer).

Pour étudier un effet possible de compensation de la délétion de *DVL1* par les autres DVL expliquant ce phénotype vasculaire rétinien plus léger, l'expression des transcrits de DVL2 et 3 a été quantifiée par qPCR dans les rétines de souris DVL1^{-/-} vs DVL1^{+/+}. Nos résultats indiquent que la délétion de DVL1 induit une augmentation d'expression de DVL3 dans les rétines de souris DVL1^{-/-} vs contrôles (Figure 39).

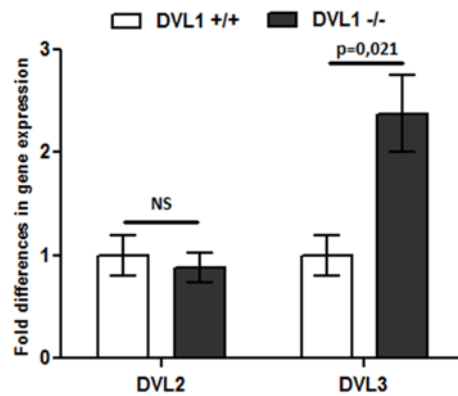


Figure 39: Compensation de la délétion de DVL1 par DVL3 in vivo. Des qPCR réalisées sur des rétines à P7 de souris DVL1^{-/-} vs DVL1^{+/+} montrent une forte augmentation d'expression de DVL3 mais pas de DVL2 dans les mutants DVL1^{-/-}. Les résultats normalisés avec la β -actine sont les moyennes +/- écarts types de n=3 expériences.

Pour diminuer l'expression de DVL3 dans les souris DVL1^{-/-} et DVL1^{+/+}, une stratégie d'injections en intraoculaire de siRNA dirigé contre DVL3 ou de siRNA contrôle a été réalisée à P3 et P5. Nous avons tout d'abord vérifié que la micro-injection de siRNA dans l'œil induisait de façon efficace la diminution de l'expression génique, sans altérer la structure de la rétine (Figure 40, A). Dans un deuxième temps nous avons étudié l'impact de l'injection de siRNA Dvl3 vs siRNA contrôle dans les rétines de souris DVL1^{+/+} et DVL1^{-/-}. Nos résultats indiquent que la diminution d'expression de DVL3 *in vivo*, par les siRNA DVL3, agit en synergie avec la délétion génétique de DVL1 sur le retard de formation du réseau vasculaire primaire (% de vascularisation) (Figure 40, B), sur l'augmentation du nombre de tip cells à P7 (Figure 40, C) et augmente ainsi la sévérité du phénotype des souris DVL1^{-/-}. L'ensemble de ces résultats montre que la délétion de DVL1 et la diminution d'expression de DVL3 mime le phénotype vasculaire observé chez les souris *fzd7^{IECKO}* et suggère que Fzd7 est capable d'activer la signalisation de DVL1/3 pour réguler le développement vasculaire rétinien.

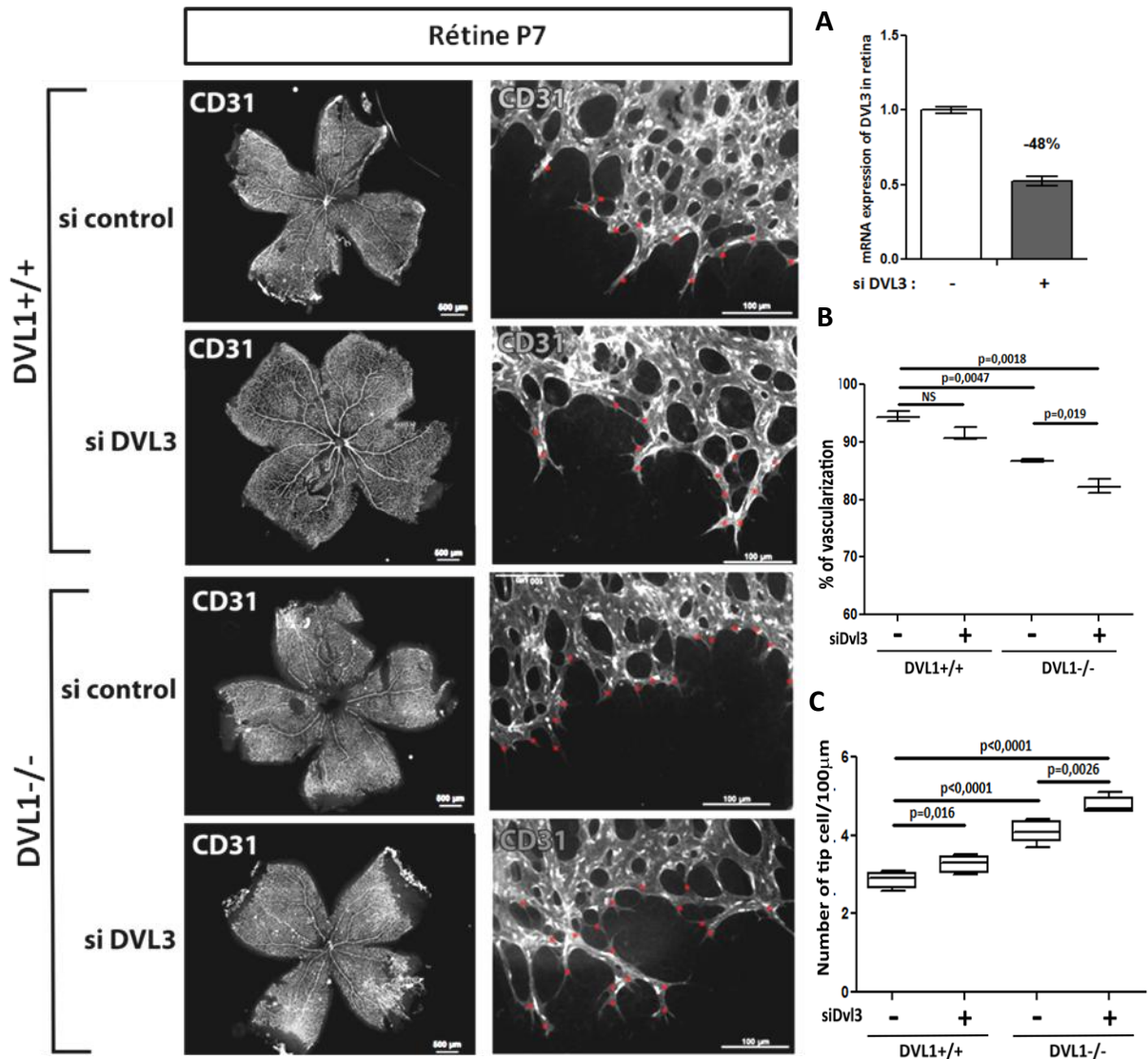


Figure 40: La délétion génétique de DVL1 et la diminution d'expression de DVL3 in vivo mime le phénotype vasculaire rétinien observé dans les rétines de souris *fzd7^{ECKO}*. Injection intraoculaire de siRNA contrôle (si control) ou dirigé contre DVL3 (si DVL3) à P3 et P5 dans les souris DVL1+/+ et DVL1-/-. (A) Des qPCR réalisées sur des rétines de souris C57Bl6/J montrent une diminution de 50% de l'expression de l'ARNm de DVL3 après traitement avec un siRNA DVL3. (B-C) A P7, une diminution plus importante du pourcentage de vascularisation (B) et une augmentation plus forte du nombre de tip cells pour 100µm de vaisseaux (C) est observée dans les rétines de souris DVL1-/- si DVL3 vs DVL1-/- si control. DVL1+/+ si control, n=3; DVL1+/+ si DVL3, n=3; DVL1-/- si control, n=3; DVL1-/- si DVL3, n=3. Marquage du réseau vasculaire avec l'anticorps CD31 (gris). Les images représentatives de la quantification ont été acquises et analysées avec un microscope Zeiss (Axio Observer). Les étoiles rouges représentent les tip cells.

D. La délétion de *fzd7* dans les CE et de DVL1/3 induit une diminution des voies de signalisation Wnt canonique et Notch

Nous avons ensuite cherché à déterminer quelle(s) voie(s) de signalisation en aval de Fzd7 pouvait(en)t être activée(s) ou régulée(s) par ce récepteur, être impliquée(s) dans la régulation de la vascularisation post-natale de la rétine chez la souris et expliquer le phénotype vasculaire rétinien observé dans les mutants *fzd7^{ECKO}* et *fzd7^{iECKO}* et *DVL1^{-/-}*.

1) La délétion de *fzd7* dans les CE et de DVL1/3 entraîne une diminution de la voie Wnt canonique

Au cours de notre précédente étude, nous avons mis en évidence que Fzd7 est capable d'activer la voie de signalisation Wnt canonique (Ferreira Tojais et al 2014). Ainsi, nous avons tout d'abord étudié par qPCR l'impact de la délétion de *fzd7* dans les CE sur l'expression des transcrits de la β -caténine et de deux gènes cibles de la voie (Axin2 et Lef1) dans les rétines de souris *fzd7^{ECKO}* vs contrôles à P7 (Figure 41, A), mais également dans les CE isolées à partir des poumons des ces souris mutantes et contrôles (Figure 41, B).

Nos données indiquent que la délétion de *fzd7* induit une forte diminution d'expression des transcrits de la β -caténine et des gènes cibles Axin2 et Lef1 dans les rétines et les CE, indiquant une dérégulation importante de la voie Wnt canonique.

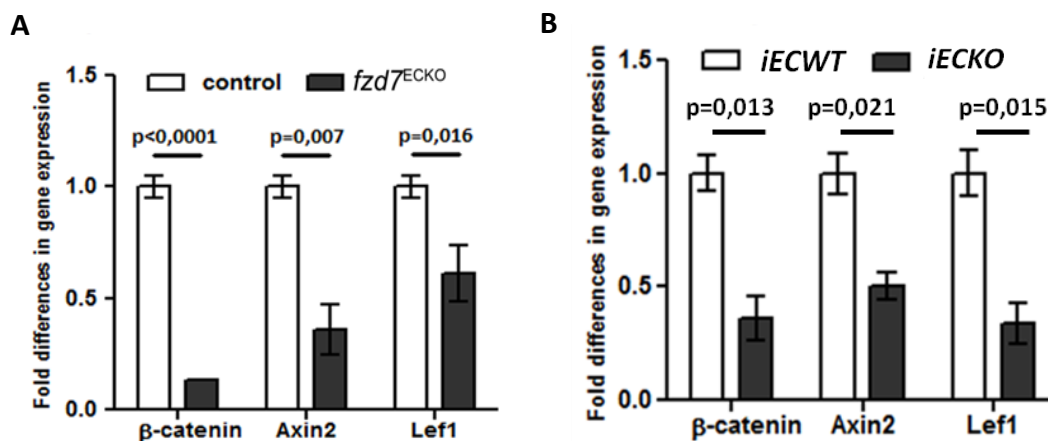


Figure 41: La délétion de *fzd7* dans les CE diminue la voie de signalisation Wnt canonique. (A-B) Des qPCR réalisées sur des rétines à P7 (A) et des CE isolées à partir des poumons (B) de souris *fzd7^{iECKO}* vs *fzd7^{iECWT}* montrent une forte diminution d'expression de la β -caténine et des gènes cibles Axin2 et Lef1. Les résultats normalisés avec la β -actine sont les moyennes +/- écarts types de n=3-6 expériences.

Des expériences similaires de qPCR ont été effectuées sur des rétines de souris DVL1+/+ vs DVL1-/- à P7 et sur des cellules endothéliales murines (MS1) traitées avec des siRNA contrôles ou dirigés contre DVL1, DVL2 ou DVL3.

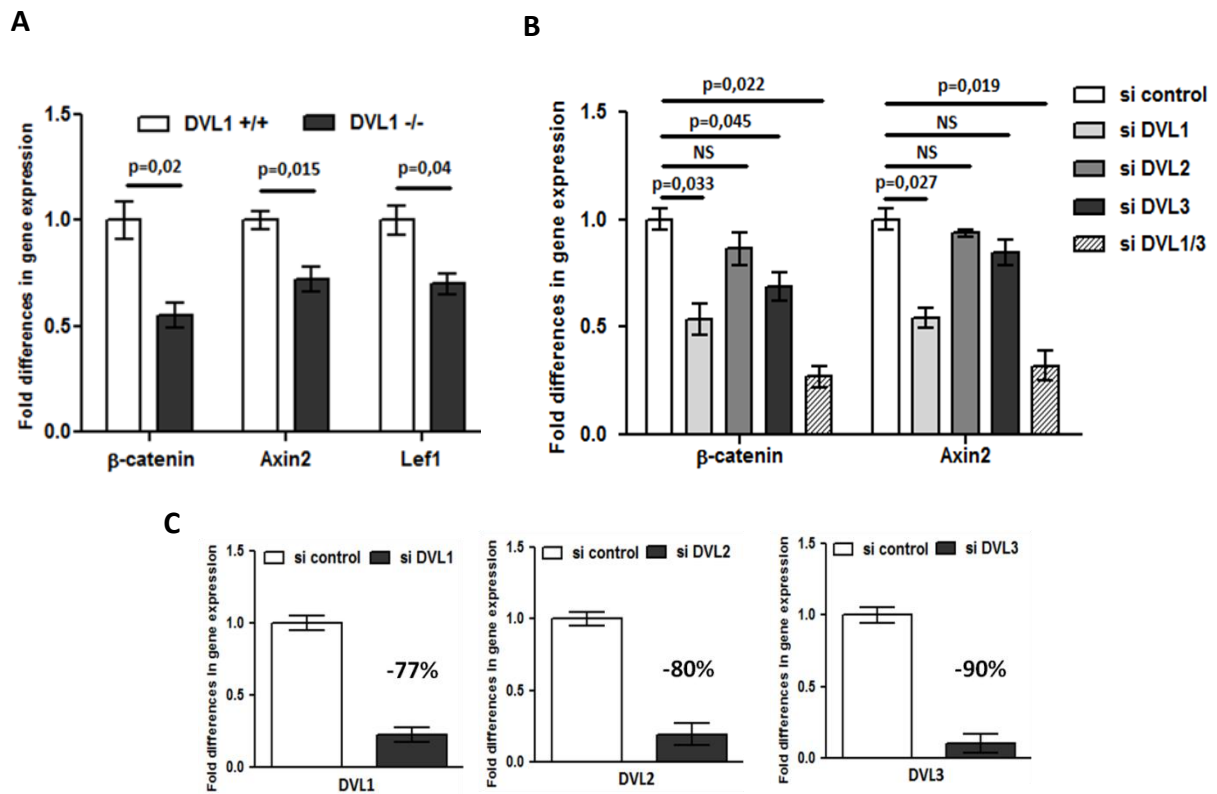


Figure 42: La délétion de DVL1 ou la diminution d'expression de DVL1 et 3 diminuent la voie de signalisation canonique. (A-B) Des qPCR réalisées sur des rétines de souris DVL1+/+ et DVL1-/- à P7 (A) et des MS1 traitées avec des si control, si DVL1, si DVL2, si DVL3 ou si DVL1 et 3 (B) montrent que la délétion de DVL1 ou de DVL1 et 3 entraînent une forte diminution d'expression de la β -caténine et des gènes cibles Axin2 et Lef1. (C) Vérification par qPCR de l'efficacité des si DVL1, si DVL2 et si DVL3 sur des MS1 traitées avec les différents siRNA et comparées aux cellules traitées avec un si control. Les résultats normalisés avec la β -actine sont les moyennes +/- écarts types de n=3-4 expériences.

Nos résultats montrent que la délétion de DVL1 *in vivo* (Figure 42, A) et la diminution d'expression de DVL1 et/ou 3 *in vitro* (Figure 42, B) induisent une forte diminution d'expression des transcrits de la β -caténine et des gènes cibles Axin2 et Lef1, indiquant une dérégulation importante de la voie Wnt canonique. On remarque que les si DVL1 et 3 *in vitro* ont un effet synergique, alors que le si DVL2 n'a aucun effet sur cette voie de signalisation. L'efficacité des siRNA dirigés contre DVL1, 2 et 3 a été vérifiée et montre une diminution significative de 80 à 90 % des ARNm de DVL1, 2 et 3 dans les cellules traitées par ces siRNA et comparées aux cellules traitées par un siRNA contrôle (Figure 42, C).

2) La délétion de *fzd7* dans les CE et de DVL1/3 entraîne une diminution de la voie Notch

D'autre part, le phénotype vasculaire observé dans les rétines de souris *fzd7^{iECKO}* touche de manière importante le nombre de tip cells et de filopodes au front du plexus vasculaire en formation. Dans la littérature, la voie de signalisation Notch a été décrite comme jouant un rôle clé au cours de l'induction, de la sélection des tip cells et de la balance tip/stalk cells (Hellstrom et al 2007).

Ainsi, nous avons analysé par qPCR l'expression des transcrits des ligands (*Dll4*, *Jagged1*), des récepteurs (*Notch1* et *4*) et des gènes cibles de la voie (*Hey2* et *Nrarp*) dans les rétines de souris *fzd7^{iECKO}* vs *fzd7^{iECWT}* à P7 (Figure 43, A), ainsi que dans les CE isolées à partir des poumons de ces mêmes souris (Figure 43, B). Enfin, nous avons analysé l'expression protéique du domaine intracellulaire activé du récepteur Notch1 (N1ICD), marqueur de l'activation de la voie Notch, sur des lysats de poumons de souris mutantes et contrôles (Figure 43, C).

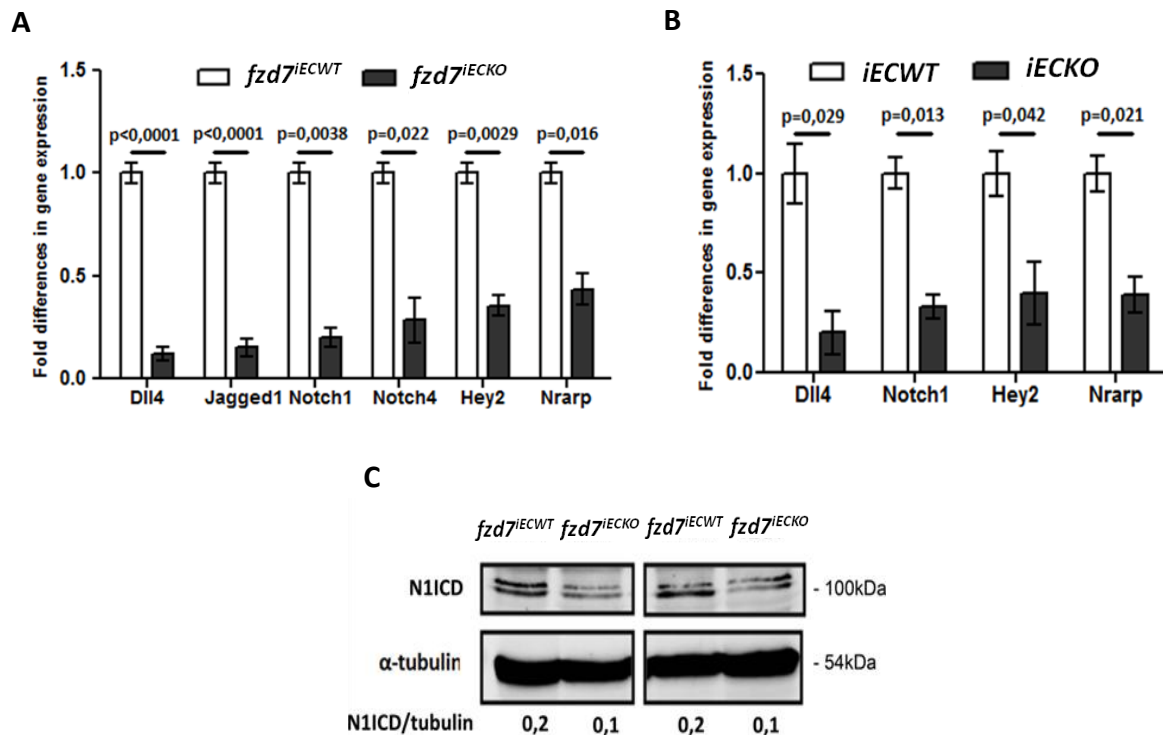


Figure 44: La délétion de *fzd7* dans les CE diminue la voie de signalisation Notch. (A-B) Des qPCR réalisées sur des rétines à P7 (A) et des CE isolées à partir des poumons (B) de souris *fzd7^{iECKO}* vs *fzd7^{iECWT}* montrent une forte diminution d'expression des ligands (*Dll4* et *Jagged1*), des récepteurs (*Notch1* et *4*) et des gènes cibles de la voie (*Hey2*, *Nrarp*). Les résultats normalisés avec la β -actine sont les moyennes +/- écarts types de n=3-6 expériences. (C) WB réalisé sur des lysats de poumons de souris *fzd7^{iECKO}* vs *fzd7^{iECWT}* à P7 montrant une forte diminution d'expression de N1ICD (Notch1 activated intracellular domain) dans les souris mutantes.

Nos données indiquent une forte diminution d'expression des transcrits des ligands, des récepteurs et des gènes cibles de la voie Notch ainsi qu'une diminution d'expression protéique de N1ICD, marqueur d'activation de cette même voie, dans les souris mutantes $fzd7^{iECKO}$ comparées aux souris contrôles $fzd7^{iECWT}$, montrant que Fzd7 est capable de réguler positivement la voie Dll4/Notch.

Des expériences similaires de qPCR ont été effectuées sur des rétines de souris DVL1+/+ vs DVL1-/- à P7 et sur des cellules endothéliales murines (MS1) traitées avec des siRNA contrôles ou dirigés contre DVL1, DVL2 ou DVL3 (Figure 44).

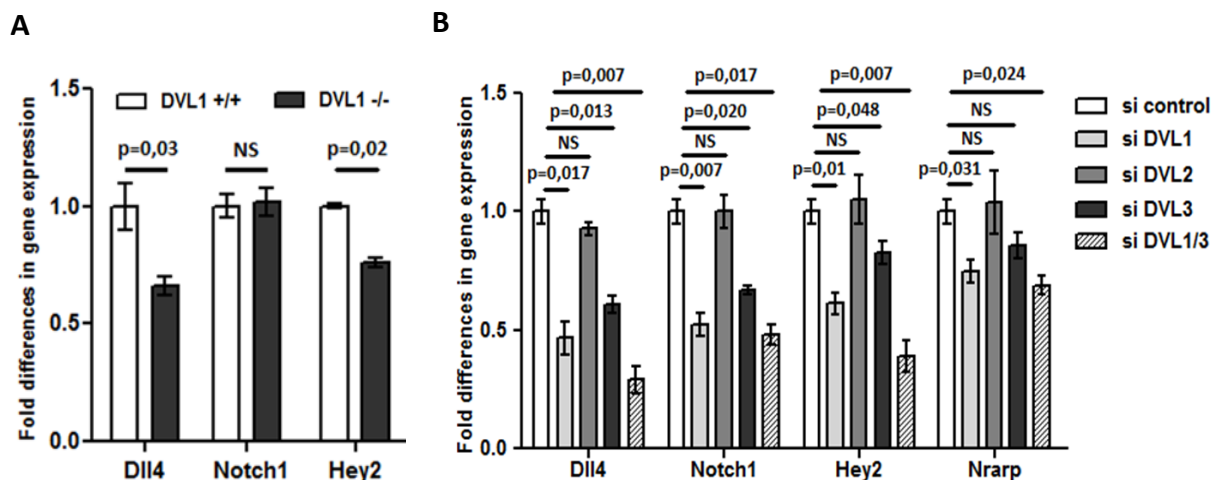


Figure 44: La délétion de DVL1 ou la diminution d'expression de DVL1 et 3 diminuent la voie de signalisation Notch. (A-B) Des qPCR réalisées sur des rétines de souris DVL1+/+ et DVL1-/- à P7 (A) et des MS1 traitées avec des si control, si DVL1, si DVL2, si DVL3 ou si DVL1 et 3 (B) montrent que la délétion de DVL1 ou la déplétion de DVL1 et 3 entraînent une forte diminution d'expression de Dll4, de Notch1 et des gènes cibles Hey2 et Nrarp. Les résultats normalisés avec la β -actine sont les moyennes +/- écarts types de n=3-4 expériences.

Nos résultats montrent que la délétion de DVL1 *in vivo* (Figure 44, A) induit une forte diminution d'expression des transcrits de Dll4, et du gène cible Hey2. *In vitro*, les siRNA DVL1 ou DVL3 induisent une diminution de Dll4, Notch1, Hey2 et Nrarp indiquant une dérégulation importante de la voie Notch. De manière intéressante, les siRNA DVL1 et 3 *in vitro* ont un effet synergique, alors que le siRNA DVL2 n'a aucun effet sur cette voie de signalisation (Figure 44, B).

L'ensemble de ces données montre que la délétion de Fzd7 et de DVL1/3 entraîne une altération des voies Wnt canonique et Notch, suggérant que Fzd7 *via* l'activation de DVL1/3 contrôle l'expression des gènes de ces deux voies pour réguler l'angiogenèse post-natale de la rétine.

De plus, il a été démontré que la voie Notch (Kim et al 2008c, Marcelo et al 2013) et plus récemment la β -caténine (Corada et al 2013) participent à la différenciation artério-veineuse et oriente la cellule endothéliale vers un phénotype artérielle *via* la régulation des Ephrines. Nous avons donc analysé par qPCR et WB l'expression du marqueur artériel EphrinB2 et du marqueur veineux EphB4 dans les rétines de souris $fzd7^{iECKO}$ vs $fzd7^{iECWT}$ à P7. Nos données montrent une augmentation significative de l'expression de l'ARNm de l'EphrinB2 et une diminution significative de l'ARNm de l'EphB4 (Figure 45, A). Parallèlement, les expressions protéiques de l'EphrinB2 et de l'EphB4 sont significativement modifiées (Figure 45, B), mettant en évidence que la délétion de $fzd7$ dans les CE entraîne une altération de l'expression de ces marqueurs artério-veineux.

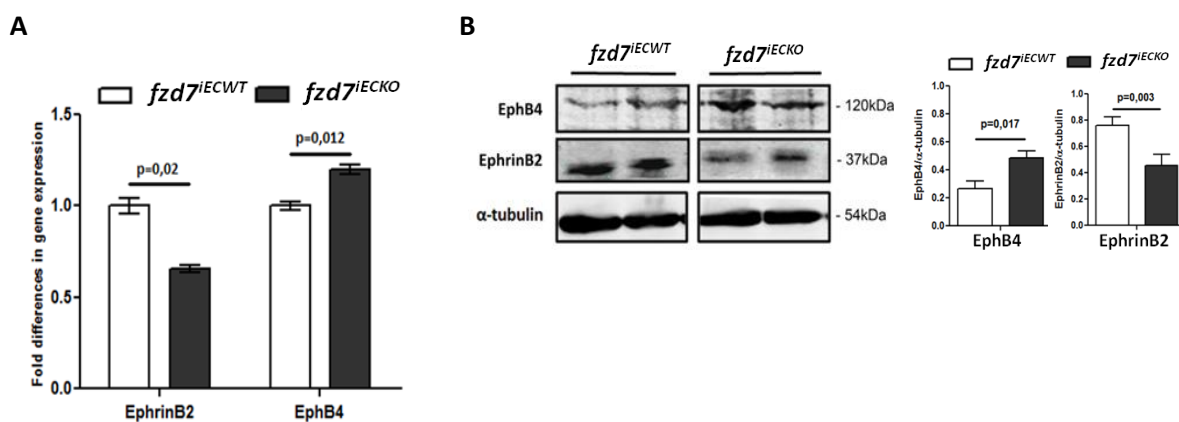


Figure 45: La délétion de $fzd7$ dans les CE modifie l'expression des Ephrines. Des qPCR (A) et WB (B) réalisés sur des rétines de souris $fzd7^{iECKO}$ vs $fzd7^{iECWT}$ à P7 montrent une diminution importante de l'expression de l'EphrinB2 et une augmentation modérée de l'EphB4. Les résultats normalisés avec la β -actine ou l' α -tubuline sont les moyennes +/- écarts types de n=3-4 expériences.

3) Autres de voies de signalisation investiguées non altérées

a) Voie du VEGF

L'autre grande de voie de signalisation qui a été décrite et qui joue un rôle fondamentale au cours de l'angiogenèse post-natale de la rétine et notamment dans la sélection des tip cells est la voie de signalisation du VEGF (Gerhardt et al 2003). Nous avons ainsi analysé par qPCR l'expression des ligands VEGF-A et VEGF-C ainsi que des récepteurs VEGFR1, VEGFR2 et VEGFR3 sur des rétines de souris $fzd7^{iECKO}$ vs $fzd7^{iECWT}$ à P7 (Figure 46).

Aucune différence significative d'expression du VEGF-A et VEGF-C et des récepteurs VEGFR1, 2 et 3 n'a été observé dans les rétines de souris mutantes, montrant que la délétion de $fzd7$ dans les CE n'entraîne pas d'altération de la voie de signalisation du VEGF.

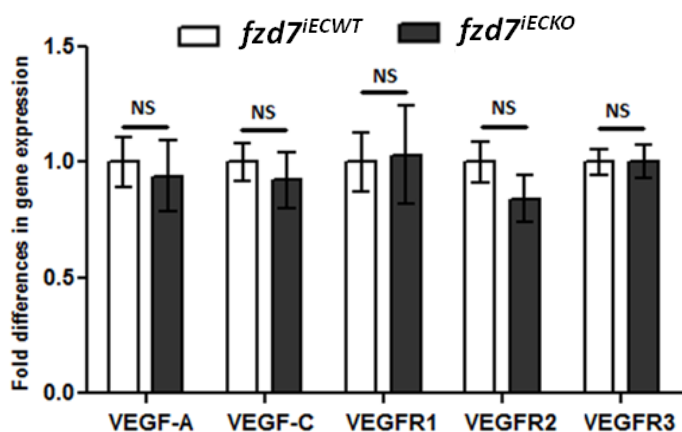


Figure 46: La délétion de *fzd7* dans les CE ne modifie pas la voie de signalisation du VEGF. Des qPCR réalisées sur des rétines de souris *fzd7^{iECKO}* vs *fzd7^{iECWT}* à P7 ne montrent aucune modification significative d'expression des ligands (VEGF-A et C), des récepteurs (VEGFR1, 2 et 3). Les résultats normalisés avec la β -actine sont les moyennes +/- écarts types de n=4 expériences.

b) Voie Norrin/Fzd4/Lrp5

Enfin, l'équipe de Nathans a montré que le récepteur Fzd4 via la fixation du ligand Norrin et l'activation du corécepteur Lrp5 est capable d'activer la voie dépendante de la β -caténine et de réguler l'angiogenèse post-natale dans la rétine chez la souris (Ye et al 2009, Zhou et al 2014). Bien que les phénotypes vasculaires rétiniens des mutants *fzd4^{iECKO}* et *fzd7^{iECKO}* soient très différents et ne semblent pas toucher les mêmes processus angiogéniques, nous avons voulu vérifier par qPCR que la délétion de *fzd7* dans les CE n'entraîne pas d'altération de cette voie bien décrite faisant intervenir Fzd4 (Figure 47).

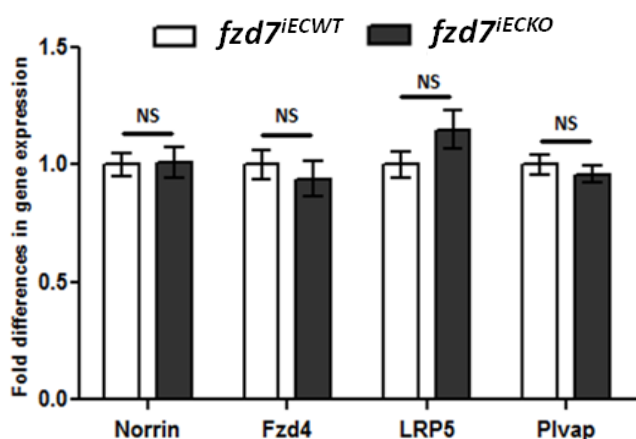


Figure 47: La délétion de *fzd7* dans les CE ne modifie pas la voie de signalisation Norrin/Fzd4. Des qPCR réalisées sur des rétines de souris *fzd7^{iECKO}* vs *fzd7^{iECWT}* à P7 ne montrent aucune modification significative d'expression de la Norrin, du récepteur Fzd4, du corécepteur Lrp5 et du gène cible *Plvap*. Les résultats normalisés avec la β -actine sont les moyennes +/- écarts types de n=4 expériences.

L'analyse par qPCR de l'expression de la Norrin, du récepteur Fzd4, du corécepteur Lrp5 et du gène cible *Plvap* dans les rétines de souris *fzd7^{iECKO}* vs *fzd7^{iECWT}* à P7 n'a révélée aucune différence significative, indiquant que la délétion de Fzd7 ne modifie pas la voie Norrin/Fzd4 et que le phénotype vasculaire des mutants est indépendant de cette voie de signalisation.

E. L'activation de la voie Wnt canonique reverse totalement le phénotype vasculaire des souris *fzd7^{iECKO}* tandis que l'activation de la voie Notch ne le restaure que partiellement

Afin de déterminer si la signalisation de Fzd7 active de manière prépondérante la voie Wnt canonique au cours du développement post-natal vasculaire de la rétine, un traitement en intra-péritonéal avec un activateur de la voie canonique, le LiCl, a été réalisé pour potentiellement réverser le phénotype vasculaire rétinien induit par la délétion de *fzd7* dans les CE.

L'analyse des rétines de souris traitées avec du LiCl (ou du PBS) montrent que le LiCl n'a aucun effet significatif sur le phénotype vasculaire des souris contrôles *fzd7^{iECWT}* mais réverse totalement le retard de formation du réseau vasculaire (% de vascularisation) (Figure 48, A), l'altération du nombre de tip cells (augmentation du nombre de tip cells) (Figure 48, B), ainsi que la diminution de la prolifération des stalk cells observés dans les souris *fzd7^{iECKO}* à P7 (Figure 48, C).

De plus, pour étudier si le phénotype vasculaire des rétines de souris *fzd7^{iECKO}* est également lié à un défaut d'activation de la voie Notch, nous avons analysé l'impact de l'injection intraoculaire de la protéine recombinante Dll4 (activateur de la voie Notch) sur le phénotype des souris *fzd7^{iECKO}* vs *fzd7^{iECWT}* à P7.

Nos résultats indiquent que le Dll4 réverse l'altération du nombre de tip cells observée dans les rétines de mutants *fzd7^{iECKO}* avec le retour d'un nombre normal de tip cells (Figure 49, B). Cependant, les rétines de souris mutantes *fzd7^{iECKO}* traitées avec le Dll4 présentent toujours un retard de formation du plexus vasculaire primaire avec une diminution persistante de l'expansion radiale de ce réseau (Figure 49, A).

Ces données prouvent que Dll4 ne restaure que partiellement le phénotype vasculaire observé chez les souris mutantes *fzd7^{iECKO}*. Ainsi, le fait que l'activation de la voie Wnt canonique réverse totalement le phénotype induit par la délétion de *fzd7* dans les CE alors que l'activation de la voie Notch ne restaure que le phénotype tip/stalk cells, suggère que la voie Fzd7/ β -caténine contrôle l'angiogenèse post-natale physiologique de la rétine en amont de la voie Dll4/Notch, mais également par un mécanisme indépendant de cette voie Notch.

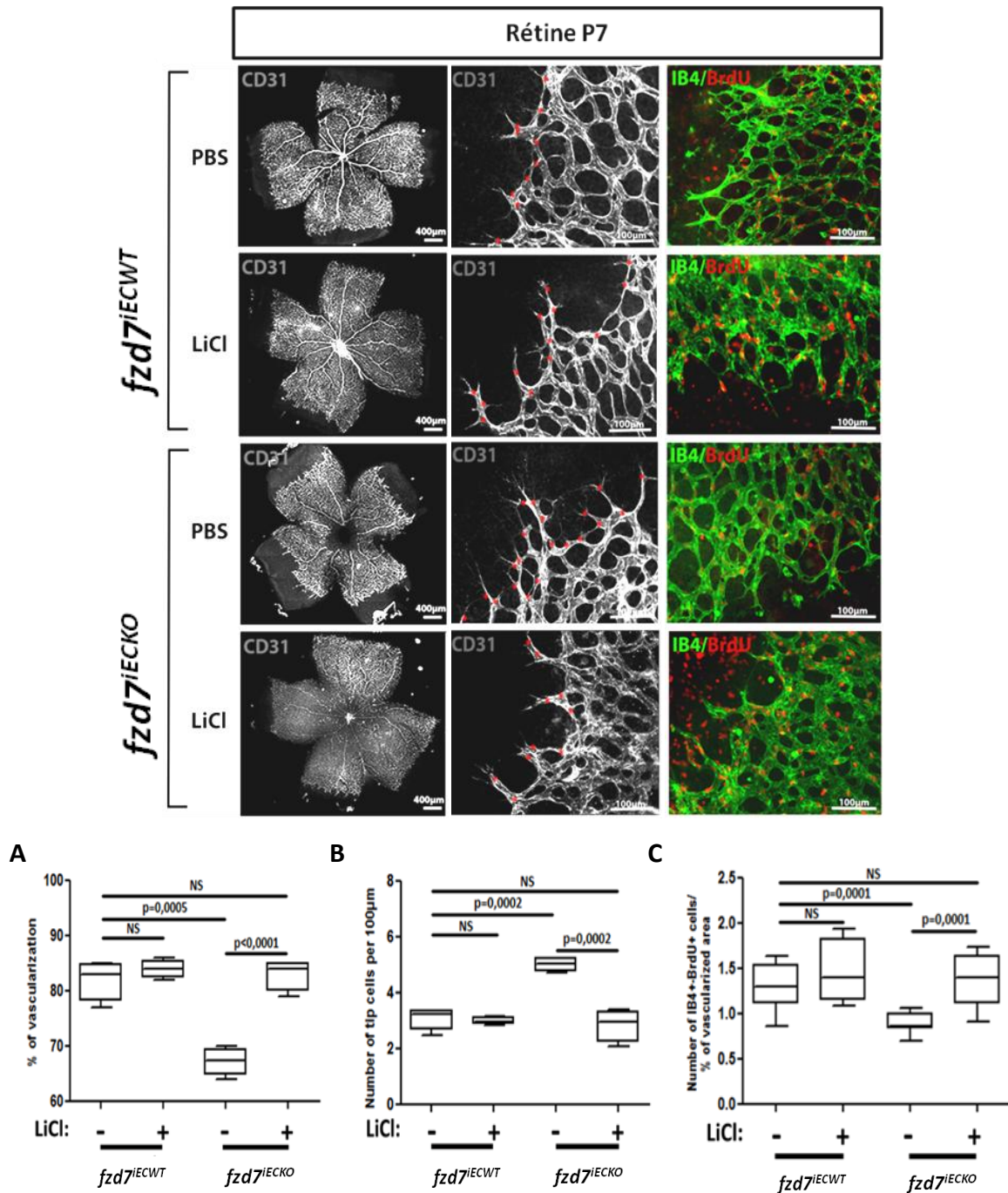


Figure 48: L'activation de la voie Wnt canonique reverse totalement le phénotype vasculaire des rétines de souris *fzd7^{IECKO}*. Injection intra-péritonéale de LiCl, un activateur de la voie Wnt canonique, à P5 et P6 dans les souris *fzd7^{IECKO}* et *fzd7^{IECWT}*. A P7, on observe une réversion de la diminution du % de vascularisation (A), de l'augmentation du nombre de tip cells pour 100µm de vaisseaux (B) et de la diminution de la prolifération (C) dans les rétines de souris *fzd7^{IECKO}* traitées avec le LiCl. LiCl. *fzd7^{IECWT}* PBS n=5; *fzd7^{IECWT}* LiCl n=5; *fzd7^{IECKO}* PBS n=5; *fzd7^{IECKO}* LiCl n=5. Marquage du réseau vasculaire avec l'anticorps CD31 (gris) ou l'Isolectine B4 (vert) et des cellules en prolifération avec l'anticorps anti-BrdU (rouge). Les images représentatives de la quantification ont été acquises et analysées avec un microscope Zeiss (Axio Observer). Les étoiles rouges indiquent les tip cells.

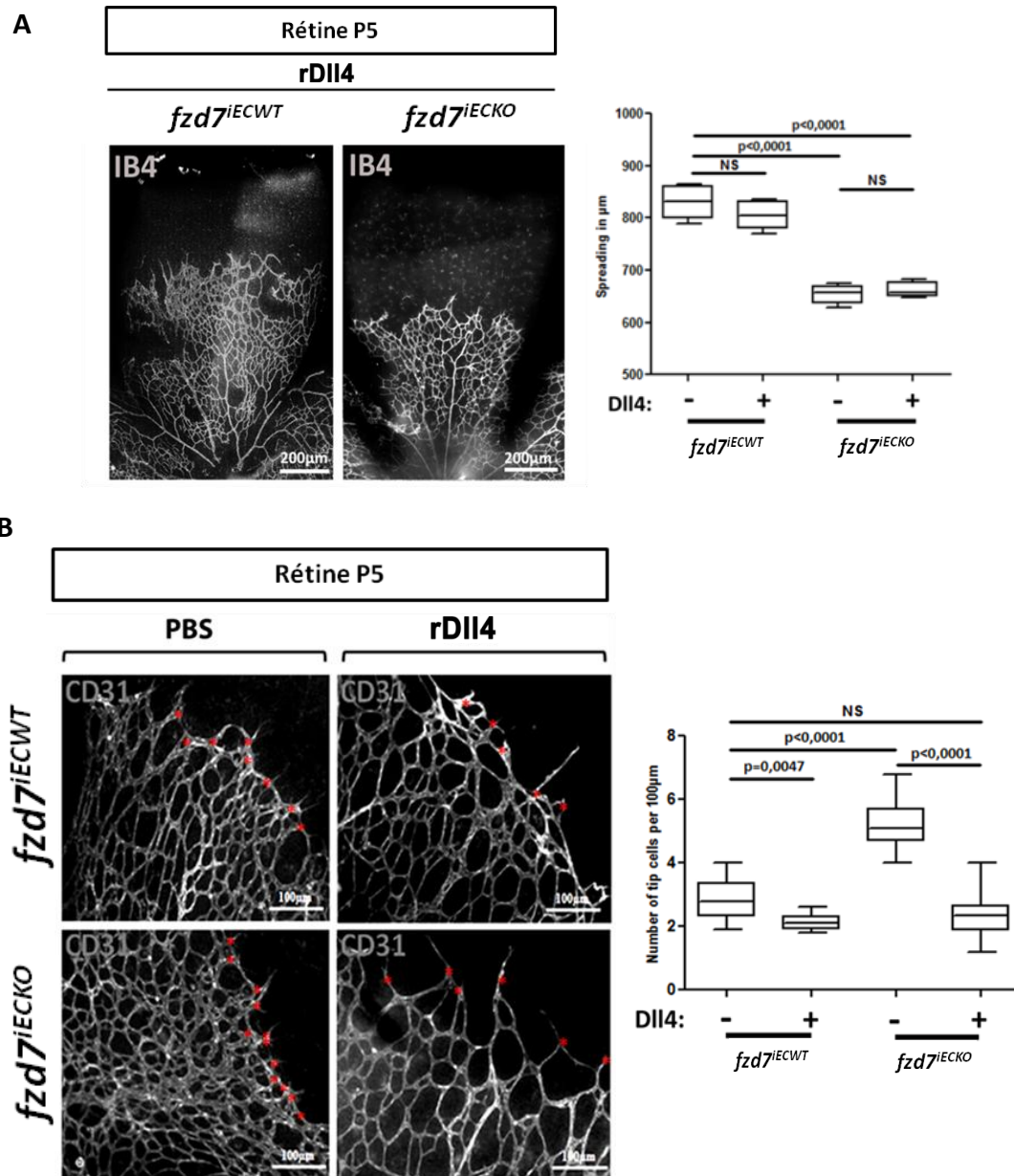


Figure 49: L'activation de la voie Notch ne restaure que partiellement le phenotype vasculaire des rétines de souris *fzd7^{iECKO}*. Injection intraoculaire de rDII4, un activateur de la voie Notch, à P3 et 5 dans les souris *fzd7^{iECKO}* et *fzd7^{iECWT}*. **(A)** A P7, on observe toujours une diminution de l'expansion radiale en μm du réseau vasculaire primaire (spreading) dans les rétines de souris *fzd7^{iECKO}* traitées avec le rDII4. Le rDII4 ne restaure pas le retard de formation du réseau vasculaire observé dans les mutants *fzd7^{iECKO}*. **(B)** En revanche, on observe une réversion de l'augmentation du nombre de tip cells pour 100 μm de vaisseaux dans les souris *fzd7^{iECKO}* traitées avec le DII4 recombinant. *fzd7^{iECWT}* PBS n=5; *fzd7^{iECWT}* rDII4 n=5; *fzd7^{iECKO}* PBS n=5; *fzd7^{iECKO}* rDII4 n=5. Marquage du réseau vasculaire avec l'anticorps CD31 ou l'Isolectine B4 (gris). Les images représentatives de la quantification ont été acquises et analysées avec un microscope Zeiss (Axio Observer). Les étoiles rouges indiquent les tip cells.

F. Fzd7 contrôle la voie Notch *via* l'activité transcriptionnelle de la β -caténine

Pour aller plus loin dans le mécanisme moléculaire, nous avons étudié si la signalisation Fzd7/ β -caténine peut contrôler la voie Notch au cours de l'angiogenèse post-natale. Nous avons tout d'abord analysé l'effet du LiCl sur l'expression des transcrits des membres de la voie Notch par des expériences de qPCR réalisées sur des rétines à P7 de souris *fzd7^{IECKO}* vs *fzd7^{IECWT}* traitées ou non avec du LiCl. Nos résultats montrent qu'un traitement avec le LiCl chez les souris contrôles et mutantes induit l'augmentation d'expression des transcrits de la β -caténine et de Lef1 confirmant que le LiCl permet d'activer la voie canonique (Figure 50, A). De plus, l'analyse d'expression des partenaires de la voie Notch indique que le LiCl entraîne une augmentation d'expression de l'ARNm des ligands Dll4, Jagged1, du récepteur Notch1 et du gène cible Hey2 dans les rétines de souris *fzd7^{IECWT}* comparées au même souris non traitées (Figure 50, B). Ainsi, l'activation de la voie canonique par le LiCl dans les rétines de souris *fzd7^{IECKO}* restaure totalement l'expression des membres de la voie Notch et donc la signalisation Notch.

Des expériences similaires ont été réalisées *in vitro* sur des MS1. Le traitement avec le LiCl empêche l'altération de la voie Notch induite par la diminution d'expression de *fzd7* par une stratégie d'ARN interférence. Ces données prouvent que le LiCl permet de reverser totalement la diminution d'expression des membres des voies canonique et Notch induite par la délétion de *fzd7* dans les CE (Figure 50, C).

Plusieurs voies de signalisation telle que la β -caténine convergent pour contrôler le promoteur de Dll4 (Corrada et al., 2013). Ainsi, nous avons ensuite étudié si Fzd7 est capable de contrôler l'expression des partenaires de la voie Notch *via* l'activité transcriptionnelle de la β -caténine. *In vitro*, des expériences avec des lentivirus codant pour une forme dominant-négatif (lenti DN β -cat) ou constitutivement active de la β -caténine (lenti activ β -cat) ont été menées sur des CE (MS1) déplétées ou non pour *fzd7*. Comme attendu, la forme active de la β -caténine augmente fortement l'expression de l'ARNm du gène cible Axin2 mais également de Dll4 et de Hey2 (Figure 50, D). De manière intéressante, la diminution d'expression de ces gènes liée à la déplétion de *fzd7* est totalement réversée par la forme active de la β -caténine, tandis que la forme dominant-négatif de la β -caténine ne permet pas de restaurer l'expression de ces gènes Axin2, Dll4 et Hey2 (Figure 50, E).

L'ensemble de ces résultats démontre que Fzd7, *via* l'activité transcriptionnelle de la β -caténine, contrôle l'expression de Dll4 et de Hey2, gène cible de la voie Notch.

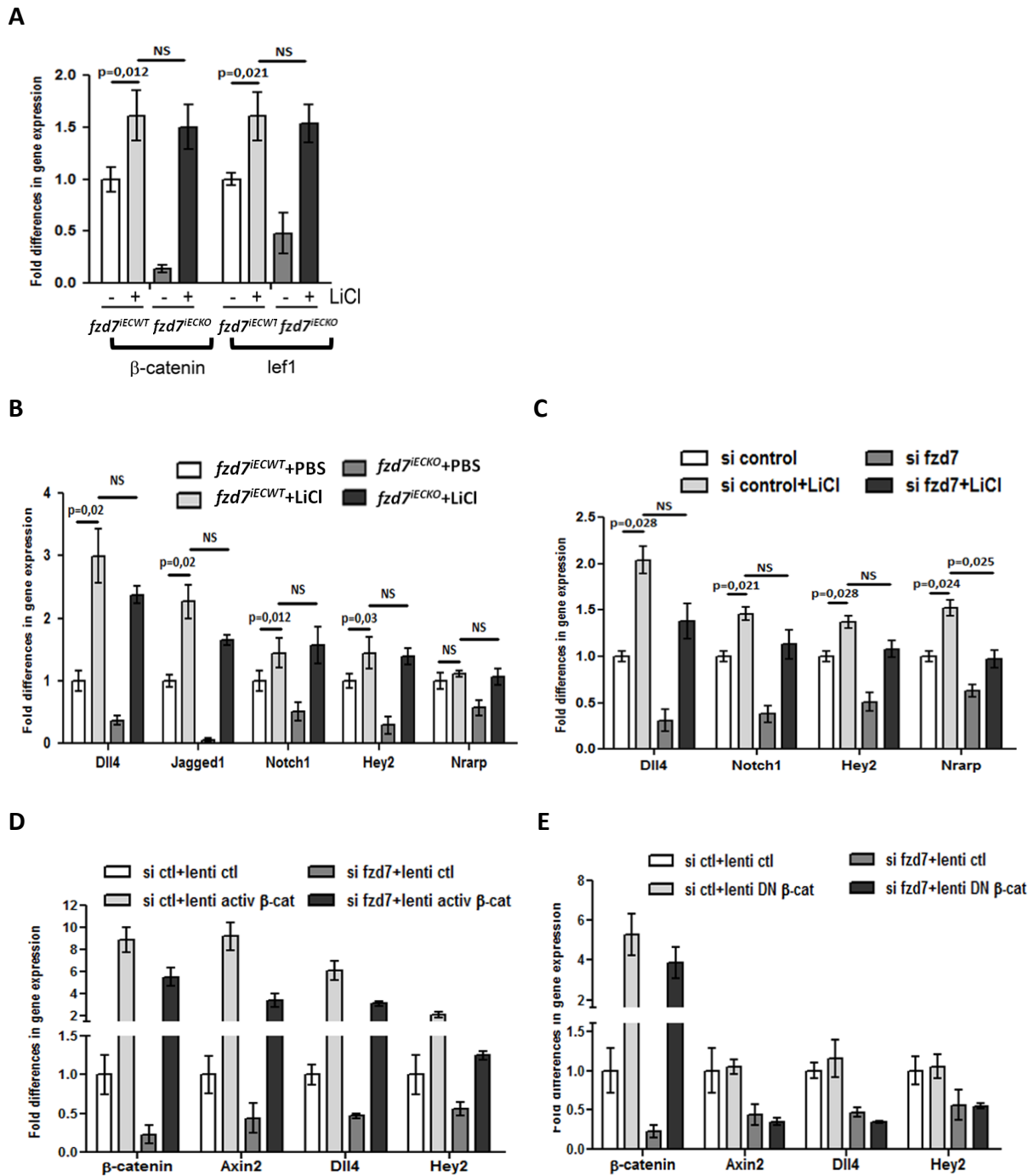


Figure 50: Fzd7 contrôle la voie Notch via l'activité transcriptionnelle de la βcaténine. (A-E) qPCR réalisées sur des rétines de souris $fzd7^{IECKO}$ vs $fzd7^{IECWT}$ à P7 traitées ou non avec le LiCl (A-B) ou sur des MS1 traitées avec un siRNAfzd7 ou contrôle, un lentivirus codant pour la forme active de la β-caténine (lenti activ β-cat) ou le dominant négatif (lenti DN β-cat) ou avec le LiCl (C-E). Un traitement avec le LiCl restaure, in vivo l'expression de la β-caténine et de Lef1 (A) dans les rétines des mutants $fzd7^{IECKO}$ comparées aux contrôles et in vivo (B) et in vitro (C) l'expression des membres de la voie Notch: DII4, Notch1 et Hey2. La diminution d'expression de la β-caténine, Axin2, DII4 et Hey2 induite par la délétion de fzd7 in vitro est totalement réversée par la forme active de la β-caténine (D) mais pas par la forme dominant négatif (E). Les résultats normalisés avec la β-actine sont les moyennes +/- écarts types de n=3-4 expériences.

G. La délétion de Fzd7 affecte la sélection des tip cells

Nous avons par la suite voulu déterminer si le phénotype vasculaire rétinien observé dans rétines de souris *fzd7^{IECKO}* était dû à une altération de la sélection tip/stalk cells. Nous avons pour cela analysé le comportement des CE déléetées pour *fzd7* dans un modèle de sprouting en 3D *in vitro*.

Des HUVEC transduites avec un lentivirus-GFP (vert) contrôle ou un lentivirus-Ruby (rouge) contrôle ont été mélangées en proportion équivalente (1:1) avant d'être mis en adhésion sur des billes coatées puis incluses dans un gel de fibrine. Les HUVEC forment alors des «sprouts» dans le gel de fibrine en 3D. Dans des conditions contrôles, le pourcentage de CE détectées en position de tip cell est environ de 50% pour les HUVEC fluoresçant en vert et de 50% pour les HUVEC fluoresçant en rouge (Figure 51, A). L'impact de la déplétion de *fzd7* sur le comportement des CE a été étudié après transduction des HUVEC avec un lentivirus *shRNAfzd7* permettant l'expression du *shRNAfzd7* et de la GFP (vert). Dans cette expérience, les HUVEC transduites avec le *shRNAfzd7* (GFP+) ou un lentivirus contrôle (Ruby +) ont été mélangées en proportion équivalente (1:1), puis cultivées dans le gel 3D. Nos résultats montrent que les cellules déplétées pour *fzd7* (GFP+) ont plus de chance de se retrouver en position de tip cells (63%) comparées aux CE contrôles (Ruby+) (37%) (Figure 51, B). Ces données supportent l'hypothèse que la signalisation de Fzd7 contrôle l'induction des stalk cells et inhibe la sélection des tip cells. L'efficacité du lentivirus *shRNAfzd7* a été vérifiée et montre une diminution significative de 79 % de l'ARNm de *fzd7* dans les cellules traitées par ce lentivirus et comparées aux cellules traitées par un lentivirus contrôle (Figure 51, C).

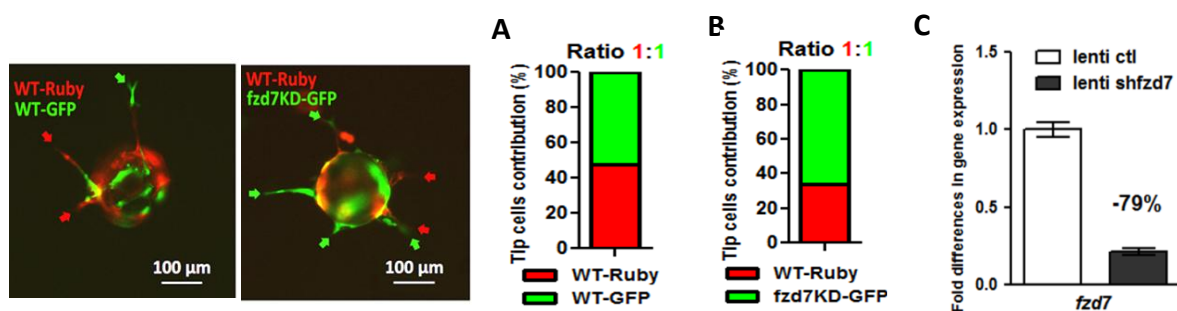


Figure 51: La délétion de *fzd7* affecte la sélection des tip cells. Essai de sprouting en 3D des HUVEC. Images représentatives après 48h des HUVEC-adhérées sur des billes coatées et incluse dans un gel de fibrine. Les HUVEC ont été transduites avec un lentivirus contrôle-Ruby (WT-Ruby; flèches rouges) et un lentivirus contrôle-GFP (WT-GFP; flèches vertes) (A) ou *shRNAfzd7* (*fzd7KD-GFP*; flèches vertes) (B) et ont été mélangées en proportion équivalente (1:1) pour l'essai de sprouting. Pourcentage de contribution des cellules à devenir tip cell: WT-Ruby/WT-GFP: n=15 billes; WT-Ruby/*fzd7KD-GFP*: n=20 billes. Les résultats sont les moyennes de n=3 expériences indépendantes. (C) Vérification par qPCR de l'efficacité du lentivirus *shRNAfzd7* sur des HUVEC traitées avec ce lentivirus et comparées aux cellules traitées avec un lentivirus contrôle. Les résultats normalisés avec la β -actine sont les moyennes +/- écarts types de n=3 expériences.

H. Fzd7 contrôle la migration des CE *via* la voie Wnt-canonique mais indépendamment de la voie Notch

Enfin, nous avons souhaité analyser si Fzd7 est essentiel à la migration des CE. Nous avons évalué le rôle de Fzd7 dans un modèle de migration dans une chambre Ibidi après perte ou gain de fonction. L'efficacité du siRNA dirigé contre *fzd7* a été vérifiée et montre une diminution significative de 75 % de l'ARNm de *fzd7* dans les cellules traitées par le siRNA et comparées aux cellules traitées par un siRNA contrôle (Figure 52, A). De plus, l'efficacité du lentivirus *fzd7* a été vérifiée et montre une augmentation significative de 100 % de l'ARNm de *fzd7* dans les cellules traitées par ce lentivirus et comparées aux cellules traitées par un lentivirus contrôle (Figure 52, A). La perte de fonction de *fzd7* par une stratégie d'ARN interférence montre une forte diminution *in vitro* de la migration des HUVEC (Figure 52, B et C). A l'inverse la surexpression de *fzd7* augmente significativement la migration des CE (Figure 52, D). De manière intéressante, la surexpression de la β -caténine dans les CE par transduction avec un lentivirus ou l'activation avec le LiCl permet de reverser la diminution de la migration induite par la délétion de *fzd7*. Ces données prouvent que Fzd7 contrôle la migration des CE *via* la voie dépendante de la β -caténine (Figure 52, C).

De plus, comme les mutants *fzd7*^{iECKO} traité avec le rDll4 présentent toujours un retard de formation du plexus vasculaire *in vivo*, nous avons émis l'hypothèse que Fzd7 pourrait réguler la migration des CE indépendamment de la voie Notch. Pour tester cette hypothèse, la migration des CE a été analysée après surexpression de *fzd7* ou de la β -caténine (transduction avec des lentivirus) et un traitement avec un inhibiteur de la voie Notch, le DAPT. Nos résultats montrent le blocage de la voie Notch par le DAPT ne modifie pas la migration des CE en condition contrôle, tandis que la surexpression de *fzd7* ou de la β -caténine augmente cette migration. De manière intéressante, le blocage de la voie Notch par le DAPT ne réverse pas l'augmentation de la migration induite par la surexpression de *fzd7* ou de la β -caténine. Ces résultats démontrent que la signalisation de Notch n'est pas essentielle à la migration des CE induite par Fzd7 (Figure 52, D).

Ainsi, l'ensemble de ces données suggèrent que Fzd7 régule la migration des CE *via* l'activation de la β -caténine et ce indépendamment de la signalisation de Notch.

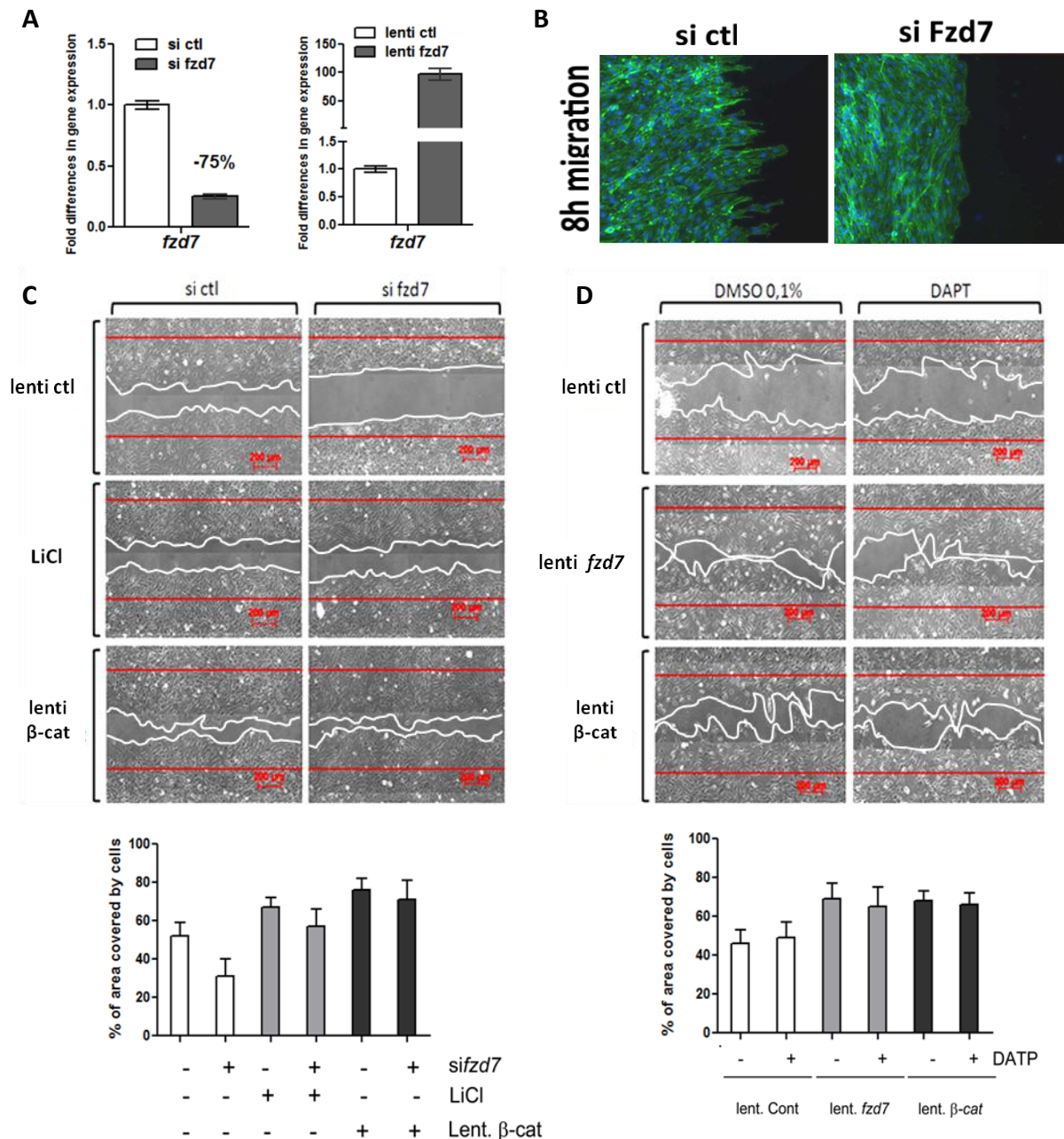


Figure 52: Fzd7 contrôle la migration des CE via la voie Wnt-canonique mais indépendamment de la voie Notch. (A) Vérification par qPCR de l'efficacité du siRNA fzd7 et du lentivirus fzd7 sur des HUVEC traitées avec le siRNA ou le lentivirus et comparées aux cellules traitées avec un siRNA contrôle ou un lentivirus contrôle. Les résultats normalisés avec la β-actine sont les moyennes +/- écarts types de n=3 expériences. (B) Images représentatives d'HUVEC traitées avec des siRNA fzd7 ou siRNA contrôle après 8h de migration. HUVEC marquées avec la F-actine (vert) et DAPI (bleu). (C) La délétion de fzd7 (si fzd7) entraîne une diminution de la migration des CE qui est réversée par la surexpression de la β-caténine (lenti β-cat) ou l'activation de la voie canonique avec le LiCl. (D) La surexpression de fzd7 (lenti fzd7) ou de la β-caténine (lenti β-cat) induit une augmentation de la migration des CE qui n'est pas réversée par le blocage de la voie Notch par le DAPT. Les résultats sont les moyennes +/- écarts types de n=2 expériences représentatives.

Nous avons ensuite émis l’hypothèse que la signalisation de Fzd7 pourrait induire l’expression de gènes impliqués dans la migration des cellules endothéliales et connus pour être régulés par la voie Wnt canonique (Wu et al 2007). Parmi les gènes candidats, nos résultats indiquent que l’expression de l’ARNm de MMP2 et MMP9 est significativement diminuée *in vitro* dans les HUVEC traitées avec des siRNA dirigés contre *fzd7* comparé aux cellules contrôles (Figure 53, B). De plus, les rétines de souris *fzd7^{iECKO}* à P7 présentent une diminution de l’expression des transcrits de MMP2 et 9 comparées aux souris contrôles *fzd7^{iECWT}* (Figure 53, A). Cette diminution d’expression de MMP2 et 9 induite par la délétion de *fzd7* est totalement réversée par un traitement avec le LiCl, *in vivo* dans les rétines de souris *fzd7^{iECKO}* et *fzd7^{iECWT}* (Figure 53, A) et *in vitro*, dans les HUVEC (Figure 53, B). Ces données démontrent que Fzd7, *via* l’activation de la β -caténine dans les CE, contrôle l’expression de MMP2 et 9 au cours de l’angiogenèse post-natale de la rétine.

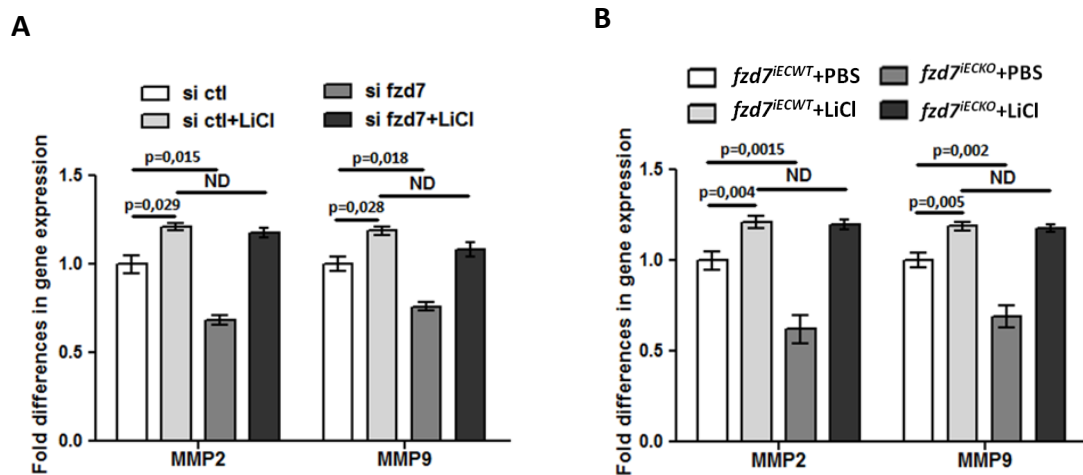


Figure 53: Fzd7 via l’activation de la β -caténine dans les CE contrôle l’expression de MMP2 et 9 *in vitro* et *in vivo*. (A-B) Des qPCR réalisées sur des HUVEC traitées avec un siRNA *fzd7* ou contrôle et le LiCl (A) et sur des rétines de souris *fzd7^{iECKO}* vs *fzd7^{iECWT}* à P7 traitées ou non avec le LiCl (B) montrent une diminution d’expression des transcrits de MMP2 et MMP9 induite par la délétion de *fzd7* et réversée par la réactivation de la voie canonique par le LiCl. Les résultats normalisés avec la β -actine sont les moyennes +/- écarts types de n=4 expériences.

V. Discussion

Au cours de cette étude, nous avons identifié une nouvelle voie de signalisation essentielle à l'angiogenèse. Nous avons mis en évidence le rôle crucial de la voie Fzd7/DVL/ β -caténine au cours de l'angiogenèse développementale et avons caractérisé un lien entre les voies de signalisation Fzd/ β -caténine et Notch.

La délétion constitutive ou conditionnelle de *fzd7* dans les CE indique que ce dernier est essentiel à une angiogenèse post-natale. La délétion de *fzd7* dans les lignées Tie2 et PDGFb-i montrent le même phénotype au cours de l'angiogenèse de la rétine, avec un retard important de la croissance vasculaire, une diminution de la prolifération des stalk cells et une augmentation de la densité vasculaire dans les territoires veineux. Au niveau du front de migration et de bourgeonnement du plexus vasculaire en formation, la délétion de *fzd7* induit un phénotype altéré des tip cells avec une augmentation du nombre de tip cells et une altération de l'orientation des filopodes.

Les protéines DVL jouent le rôle de plaque tournante au sein des voies Wnt/Fzd et font le lien entre les récepteurs Fzd, les ligands Wnt et les voies de signalisation en aval (Schwarz-Romond et al 2007, Wong et al 2003). Trois isoformes de DVL sont exprimés par les CE (Semënov & Snyder 1997, Sussman et al 1994, Yang et al 1996). Précédemment, nous avons démontré que Fzd7 est capable de recruter DVL1 et DVL3 à la membrane des CE suggérant une activation de la voie Wnt/Fzd (Descamps et al 2012). De manière intéressante, les souris délétées pour DVL1 présentent un phénotype vasculaire identique à celui observé chez les souris *fzd7^{iECKO}*, bien que moins sévère, dû à un effet de compensation de surexpression de DVL3. La déplétion de DVL3 dans la rétine de souris délétées pour DVL1 potentialise et augmente le phénotype vasculaire des souris DVL1^{-/-}.

Selon le contexte cellulaire, Fzd7 est capable d'activer la voie de signalisation canonique ou les voies non canoniques en recrutant les protéines DVL (Medina et al 2000). Dans cette étude, nous avons démontré que la délétion de *fzd7* dans les CE ou de DVL1/3 entraîne une altération importante dans la rétine des gènes cibles bien connus de la voie canonique, Axin2 et Lef1, suggérant que Fzd7 *via* DVL1/3 active la voie canonique pour contrôler l'angiogenèse.

Afin de vérifier cette hypothèse, des expériences de «rescue» pharmacologique ont été réalisées *in vivo* et *in vitro*. L'activation pharmacologique de la voie Wnt canonique par le LiCl reverse totalement le phénotype vasculaire observé dans les rétines de souris *fzd7^{iECKO}*, à savoir le nombre de tip cells, la prolifération des stalk cells ainsi que l'altération de l'expression des gènes cibles de la voie canonique. Ainsi, Fzd7 exprimé dans les CE contrôle la croissance du réseau vasculaire rétinien, le

«sprouting» et la prolifération des CE, majoritairement *via* une activation autonome de la voie canonique.

Dans la littérature, différentes études ont montré l'implication des voies Wnt canonique et non canoniques au cours de l'angiogenèse. En effet, Stefater et al. ont récemment proposé un rôle direct des voies Wnt non canoniques dans la régulation du branchement du réseau vasculaire profond de la rétine. Dans le plexus profond, les cellules myéloïdes expriment les récepteurs Fzd7 et Fzd8 et produisent des ligands Wnt qui peuvent se lier aux récepteurs Fzd de manière autocrine pour induire la sécrétion de Flt-1 par ces cellules myéloïdes résidentes et réguler l'angiogenèse rétinienne induite par le VEGF (Stefater et al 2011). Fzd4 a été l'objet de nombreuses investigations en raison de son rôle majeur dans la formation du plexus vasculaire rétinien, impliquant le complexe Tetraspanin-12, LRP5/6, et la Norrin comme ligand. L'analyse des souris mutantes pour *fzd4*, *Norrin*, *Lrp5* et *Tspan12* montre un phénotype rétinien similaire avec la présence d'un plexus vasculaire primaire incomplet, l'absence des plexus vasculaires profonds ainsi qu'un défaut de régression du réseau hyaloïde (Junge et al 2009, Xia et al 2010, Xu et al 2004). Au niveau cellulaire, le complexe Fzd4, Lrp5 et Tspan12 est activé suite à la fixation du ligand Norrin et active la voie canonique (Junge et al 2009, Xu et al 2004). Lorsque nous comparons les paramètres morphologiques, il apparaît que les souris *fzd7^{IECKO}* ne présentent pas le même phénotype vasculaire que celui des souris mutées pour *fzd4*, même si ces deux récepteurs sont capables d'activer la voie canonique. Cette différence de phénotype pourrait être due à une cinétique d'expression différente de Fzd4 et Fzd7 au cours de l'angiogenèse post-natale de la rétine. L'expression de Fzd7 augmente entre P5 et P15 et il est exprimé dans le plexus vasculaire, les tip et stalk cells, supportant l'hypothèse que Fzd7 est important dans l'induction de la formation de nouveaux vaisseaux. De plus, Nathans et al. ont récemment démontré que la délétion de la β -caténine dans les CE n'induit pas exactement le même phénotype vasculaire que celui observé pour les mutants *fzd4* et *Lrp5*, suggérant qu'un autre récepteur Fzd pourrait activer la voie Wnt canonique dans les CE (Zhou et al 2014). Enfin, Fzd4 peut également contrôler l'angiogenèse *via* une voie Wnt non canonique (Descamps et al 2012). En effet, nous avons récemment mis en évidence que la voie PCP est nécessaire au remodelage et à la stabilisation des vaisseaux au cours de l'angiogenèse post-natale de la rétine (Sewduth et al 2014).

Notre étude permet ainsi de mieux comprendre l'implication du système Wnt/Fzd dans la biologie vasculaire et démontre que Fzd7 est exprimé par les CE et contrôle la voie de signalisation Wnt canonique pour réguler la sélection des tip cells, le phénotype tip/stalk cells ainsi que la croissance vasculaire, mais n'intervient pas dans la régression, le remodelage et la maturation des vaisseaux sanguins.

Le «sprouting» angiogénique est régulé par la balance finement modulée entre tip/stalk cells. Cette balance est très dynamique (Jakobsson et al 2010) et est médiée par l'expression et l'interaction du récepteur Notch1 et de ses ligands Dll4 et Jagged1 (Carmeliet et al 2009, Gerhardt et al 2003). Des études menées chez la souris ont permis de mettre en évidence que l'expression de Dll4 dans les tip cells permet d'activer les récepteurs Notch des stalk cells adjacentes pour empêcher ces cellules d'adopter un phénotype de tip cell et maintenir une organisation hiérarchisée des CE au cours du «sprouting». En revanche, Jagged1 est exprimé par les stalk cells et semble important pour maintenir le phénotype stalk (Benedito et al 2009). Ainsi l'inhibition génétique (mutants Dll4+/-) ou pharmacologique de la voie Notch *in vivo* s'accompagne d'un excès du nombre de tip cells et d'une sélection anarchique des tip cells (Hellstrom et al 2007).

De façon très intéressante, un lien entre les voies Wnt/ β -caténine et Notch a été démontré au cours du développement embryonnaire (Hayward et al 2008). En biologie vasculaire, il a été récemment mis en évidence que la β -caténine active l'expression de Dll4 et de Notch1 et que la perte de fonction de la β -caténine conduit à des altérations de la vascularisation chez l'embryon, due à un excès de «sprouting» et du «branching» et à une diminution de la voie Notch (Corada et al 2010). Dans notre étude, nous montrons que *in vitro*, la déplétion de *fzd7* dans les CE entraîne une altération de la sélection des tip cells suggérant que Fzd7 participe à la balance tip/stalk cells au cours de la formation des vaisseaux. *In vivo*, la délétion de *fzd7* dans les CE ou la délétion de DVL1 induit une augmentation importante du nombre de tip cells et de filopodes. Ces phénotypes vasculaires sont associés à une forte diminution d'expression de Dll4 et Jagged1 ainsi que les marqueurs de l'activation de la voie Notch suggérant que Fzd7 permettrait de réguler la voie Notch et de coordonner ainsi les rôles opposés des ligands Dll4 et Jagged1 au cours du «sprouting» angiogénique. Cette régulation de la voie Notch par Fzd7 est dépendante de la voie Wnt canonique. En effet, l'activation pharmacologique de la voie Wnt canonique par le LiCl ou de la voie Notch par le rDll4 reverse le phénotype altéré des tip cells observé dans les rétines de souris *fzd7^{IECKO}* ainsi que l'altération de l'expression des acteurs de la voie Notch. De plus, dans les CE en culture, Fzd7 régule l'expression des transcrits de Dll4 et des gènes cibles de la voie Notch *via* l'activité transcriptionnelle de la β -caténine.

L'ensemble de ces données démontre que la voie Fzd7/DVL/ β -caténine active en amont la voie Dll4/Notch et permet d'identifier Fzd7 comme le lien manquant entre les voies canonique et Notch dans le contrôle de la sélection des tip cells et la balance tip/stalk cells.

Il a été démontré que la voie Notch joue un rôle crucial au cours de la différenciation artérioveineuse et ceci en amont de la signalisation du couple EphB4/EphrinB2. En effet, l'inhibition de la voie Notch entraîne une diminution de l'expression de marqueurs artériels tels que EphrinB2 ou

CXCR4 (Marcelo et al 2013). De manière intéressante, la surexpression de la β -caténine induit des altérations de la morphologie vasculaire comparables à celles observées lors de la surexpression de Dll4, à savoir une forte induction des CE vers le phénotype artériel et une perte de l'identité veineuse (Corada et al 2010). Enfin, il a été récemment démontré à l'aide d'un modèle *in vitro* de différenciation de cellules souches que l'expression des marqueurs artériels par les CE est induite par un effet convergent et synergique de la β -caténine et de la voie Notch (Yamamizu et al 2010). Nos résultats montrent que la déplétion de *fzd7* *in vivo* et *in vitro* altère fortement l'expression de EphB4 et EphrinB2 et, est associé *in vivo*, à une augmentation du branching des vaisseaux sanguins au niveau des territoires veineux de la rétine. Ces résultats renforcent les données précédentes démontrant le rôle important de Fzd7 dans l'activation des voies Wnt canonique et Notch.

Cependant, le lien entre la voie Wnt canonique et la voie Notch semble être plus complexe. L'activation de la voie Dll4/Notch peut exercer une boucle de rétrocontrôle négatif et activer au contraire la voie Wnt canonique dans les stalk cells. En effet, l'activation de la voie Dll4/Notch induit l'expression de Nrarp qui inhibe d'une part la voie Notch et augmente d'autre part l'expression de Lef1 dans les stalk cells. Nrarp régule ainsi la prolifération des stalk cells *via* l'activation de Lef1 et la diminution de la signalisation du récepteur VEGFR2 (Phng et al 2009). La prolifération contribue à la croissance du tube endothélial nouvellement formé. Alors que les tip cells prolifèrent rarement, les stalk cells sont au contraire fortement proliférantes et participent à l'extension du bourgeon endothélial. La délétion de *fzd7* dans les CE diminue la prolifération au sein du plexus vasculaire avec une forte diminution d'expression des gènes cibles de la voie Wnt canonique, Lef1 et Axin qui sont impliquées dans la prolifération cellulaire (Phng et al 2009). De plus, si la délétion de *fzd7* ne modifie pas l'expression de l'ARNm des ligands VEGF et de leurs récepteurs, elle diminue fortement l'activité de Notch, révélée par une diminution d'expression de NICD, et l'expression de l'ARNm de Nrarp et Hey1/2. Enfin, l'activation de la voie Wnt canonique par le LiCl permet de réverser l'état de prolifération des CE observé dans les rétines de souris *fzd7^{IECKO}*. Ainsi, ces résultats suggèrent que Fzd7 est capable de réguler la prolifération des CE *via* un effet direct sur l'expression de la β -caténine et de Lef1 et un effet indirect *via* l'inhibition de la voie Notch.

Enfin, au cours des premières étapes de l'angiogenèse, l'activation des CE induit de nombreux événements dont la dégradation de la matrice extracellulaire environnante pour permettre la migration des CE du vaisseau en formation. Les protéines Wnt jouent un rôle dans la migration des CE (Cheng et al 2008). D'autre part, il a été démontré que Fzd7 est capable de réguler la migration cellulaire au cours du développement ou dans les cancers (De Calisto et al 2005, Ueno et

al 2009). Dans notre étude, nous montrons que Fzd7 contrôle la migration des CE. *In vivo*, le retard de formation du plexus vasculaire induit par la délétion de *fzd7* dans les CE est réversé par l'activation de la voie canonique par le LiCl. Cependant, l'injection de rDll4 *in vivo* ne modifie pas le retard de migration. Nous avons donc émis l'hypothèse que Fzd7 pouvait contrôler la migration des CE de façon indépendante de la voie Notch. Les expériences de gain et de perte de fonction de Fzd7 *in vitro* montrent que Fzd7 contrôle la migration des CE. L'activation de la voie canonique par le LiCl ou la surexpression de la β -caténine permet de réverser la diminution de la migration induite par la délétion de *fzd7*. En revanche, l'inhibition de la voie Notch par le DAPT n'a aucun effet sur l'augmentation de la migration des CE induite par la surexpression de Fzd7 démontrant que la voie Notch n'est pas nécessaire à la migration induite par Fzd7. Ces résultats sont en accord avec les résultats obtenus *in vivo* montrant que l'activation de la voie Wnt canonique mais pas Notch reverse totalement le retard vasculaire.

Enfin, la voie de signalisation Wnt canonique régule l'expression de nombreux composants de la matrice extracellulaire tels que la fibronectine ou les protéines de dégradation de la matrice, les MMP (Brabletz et al 1999, Wu et al 2007) impliquées dans la migration cellulaire. L'analyse de l'expression de gènes cibles montre que la délétion de *fzd7* dans les CE *in vivo* et *in vitro* induit une diminution d'expression de l'ARNm de MMP2 et MMP9 qui est réversée par un traitement au LiCl.

Cette étude a permis d'identifier un nouvel acteur contrôlant l'angiogenèse. L'ensemble de nos données démontre que Fzd7 agit de manière prédominante *via* la voie β -caténine pour réguler l'angiogenèse post-natale de la rétine. De plus, la voie de signalisation Fzd7/DVL/ β -caténine régule la balance de la voie Notch indispensable à la formation des vaisseaux sanguins. Notre étude permet de mieux comprendre la voie de signalisation de Fzd7 dans la biologie vasculaire et complète nos données récentes qui ont démontré que Fzd7 *via* l'activation de la voie Wnt canonique est essentiel au contrôle de l'intégrité vasculaire chez l'adulte.

Partie 3: Etude du rôle de Frizzled7 au cours de l'angiogenèse pathologique dans un modèle murin de rétinopathie induite par l'oxygène (OIR)

I. Contexte scientifique

La formation pathologique de nouveaux vaisseaux sanguins à partir du réseau vasculaire de la rétine est impliquée dans de nombreuses pathologies humaines. Parmi elles, deux pathologies oculaires, à savoir la rétinopathie du prématuré (RP) et la rétinopathie diabétique proliférante (RDP), sont caractérisées par la prolifération anormale de vaisseaux et sont respectivement les premières causes de cécité chez le prématuré et chez l'adulte.

La RP est initialement caractérisée par un retard du développement physiologique vasculaire rétinien observé chez les nouveau-nés prématurés et sous oxygénothérapie (phase de vaso-oblitération). A l'arrêt du traitement par l'oxygène, le réseau vasculaire immature et incomplet est responsable d'une mauvaise perfusion de la rétine qui se traduit par une hypoxie relative tissulaire. Cette hypoxie stimule alors la prolifération et favorise la croissance de nouveaux vaisseaux au sein du vitré (phase de vasoprolifération) (Hartnett & Penn 2012).

Dans la RD, l'hyperglycémie chronique induit progressivement des altérations des micro-vaisseaux de la rétine et entraîne ainsi une diminution de la couverture murale des vaisseaux avec une perte des péricytes et l'apparition de zones non perfusées au sein de la rétine. En réponse à cette ischémie, une augmentation pathologique de la prolifération des vaisseaux sanguins, ainsi qu'une augmentation de la vasoperméabilité sont observées (Cheung et al 2010).

A coté de la chirurgie de l'œil utilisée en routine, les thérapies visant à contrer les effets du VEGF développées ces dernières années ont montré des résultats convaincants dans le traitement de ces pathologies oculaires. Cependant, afin de mieux contrôler et de cibler spécifiquement l'angiogenèse pathologique dans ces maladies, il apparait nécessaire de mettre en place des stratégies thérapeutiques alternatives. Pour cela, il est essentiel de découvrir de nouvelles voies de signalisation impliquées dans la croissance pathologique des vaisseaux sanguins et ainsi de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles.

Parmi ces nouvelles voies de signalisation, les voies Wnt/Fzd semblent être des candidats de choix pour de nouvelles stratégies thérapeutiques innovantes. En effet, des pathologies oculaires humaines (vitréorétinopathie exsudative familiale et maladie de Norrie) ont été reliées à des mutations des gènes codant pour la *Norrin*, *fzd4* et *Lrp5* (Nikopoulos et al 2010, Toomes et al 2004). De plus, il a été récemment proposé que l'activation des voies Wnt participe à la stabilité des

vaisseaux en conditions pathologiques et augmente la revascularisation de la rétine dans le modèle OIR (Chen et al 2011). Enfin, l'expression de la β -caténine est augmentée dans un modèle de rétinopathie diabétique chez le rat et il a été mis en évidence que l'inhibition de Lrp6 par l'utilisation d'un anticorps bloquant permet d'inhiber la voie Wnt canonique, l'hyperperméabilité ainsi que l'inflammation dans la rétine (Chen et al 2009, Lee et al 2012).

D'autre part, la voie de signalisation Notch a été décrite comme étant un régulateur important de nombreuses étapes de l'angiogenèse pathologique (Lobov et al 2007, Phng et al 2009). Récemment, Lovob et al. ont démontré que l'inhibition de la voie Dll4/Notch diminue l'occlusion vasculaire oculaire dans un modèle OIR (Lobov et al 2011).

Au cours de nos précédentes études, nous avons mis en évidence que Fzd7 contrôle l'angiogenèse post-natale de la rétine *via* la voie Wnt/canonique, et ce, de manière dépendante et indépendante de la voie Notch. En revanche, le rôle de Fzd7 au cours de l'angiogenèse pathologique observée au cours des rétinopathies n'a pas encore été investigué.

II. Objectif de l'étude

L'objectif de ce travail est d'explorer le rôle d'un nouvel acteur moléculaire, le récepteur Fzd7, et sa voie de signalisation au cours de la rétinopathie ischémique.

Notre hypothèse est que Fzd7 pourrait orchestrer les différentes phases de la rétinopathie ischémique (vaso-oblitération: VO et/ou néovascularisation: NV) *via* l'activation des voies de signalisation Wnt/ β -caténine et Notch. Ce travail nous permettra dans un deuxième temps de définir si Fzd7 peut être ciblé de manière spécifique pour traiter l'angiogenèse aberrante dans la rétinopathie proliférante et à quelle phase (VO ou NV) cette stratégie pourrait être la plus efficace.

III. Stratégie

Pour étudier le rôle de Fzd7 dans les différentes phases de la rétinopathie ischémique, nous avons choisi une approche utilisant des souris transgéniques délétées pour *fzd7* dans l'endothélium sous le contrôle du promoteur Tie2 Cre (souris notées *fzd7^{ECKO}*) ou du promoteur inducible PDGFb-iCre (souris notées *fzd7^{iECKO}*) dont le phénotype vasculaire rétinien au cours du développement physiologique a déjà été décrit dans notre précédente étude.

Le modèle de rétinopathie ischémique que nous avons utilisé pour ce projet est un modèle de rétinopathie induite par l'oxygène chez la souris appelé OIR (oxygen-induced retinopathy) (Smith et al 1994).

Ce modèle reproduit les phases observées au cours de la rétinopathie du prématuré (RP), à savoir une phase 1 de vaso-oblitération suivie d'une phase 2 de néovascularisation. A l'heure actuelle, même si aucun modèle chez l'animal ne permet de reproduire à l'identique la pathologie humaine, le modèle OIR (oxygen-induced retinopathy) est le modèle chez la souris le plus utilisé pour étudier les rétinopathies proliférantes et plus particulièrement la rétinopathie du prématuré.

Les nouveau-nés sont maintenus à atmosphère ambiante (~21% d'O₂) avec leurs mères de la naissance à 7 jours après la naissance (de P0 à P7). Puis, de P7 à P12, les souris sont placées dans un caisson fermé hermétiquement et exposées à un pourcentage d'O₂ de 75% qui entraîne la perte des vaisseaux sanguins rétiniens immatures essentiellement autour des troncs artériels par un processus de vaso-oblitération et d'apoptose de CE et ralentit le développement normal du réseau vasculaire, formant ainsi une zone centrale avasculaire (Phase 1). A P12, les souris sont replacées à atmosphère ambiante. La zone centrale avasculaire rétinienne devient alors hypoxique réactivant ainsi la croissance normale du réseau vasculaire mais également la formation pathologique extra-rétinienne de nouveaux vaisseaux sanguins qui atteint son maximum à P17 (Phase 2). Ces nouveaux vaisseaux pathologiques se forment à l'extérieur de la rétine, dans la cavité avasculaire du vitré pour former des structures vasculaires de petites tailles et désorganisées appelés «tuft» ou vaisseaux en grappes, puis régressent à partir de P17 jusqu'à P25.

Au cours de ces deux phases, plusieurs paramètres peuvent être mesurés et analysés: le % de l'aire avasculaire, le % de l'aire hypoxique, le % de l'aire néovascularisée (aire des «tufts»), la prolifération dans les «tufts» ou encore la régression des néovaisseaux (Connor et al 2009) (Figure 54).

Nous utiliserons le modèle inductible (Pdgfb-iCre) pour induire la délétion de *fzd7* soit avant la phase 1 de vaso-oblitération ou avant la phase 2 de vaso-prolifération. Ces expériences permettront de caractériser spécifiquement le rôle de Fzd7 dans la 2^{ème} phase de néovascularisation.

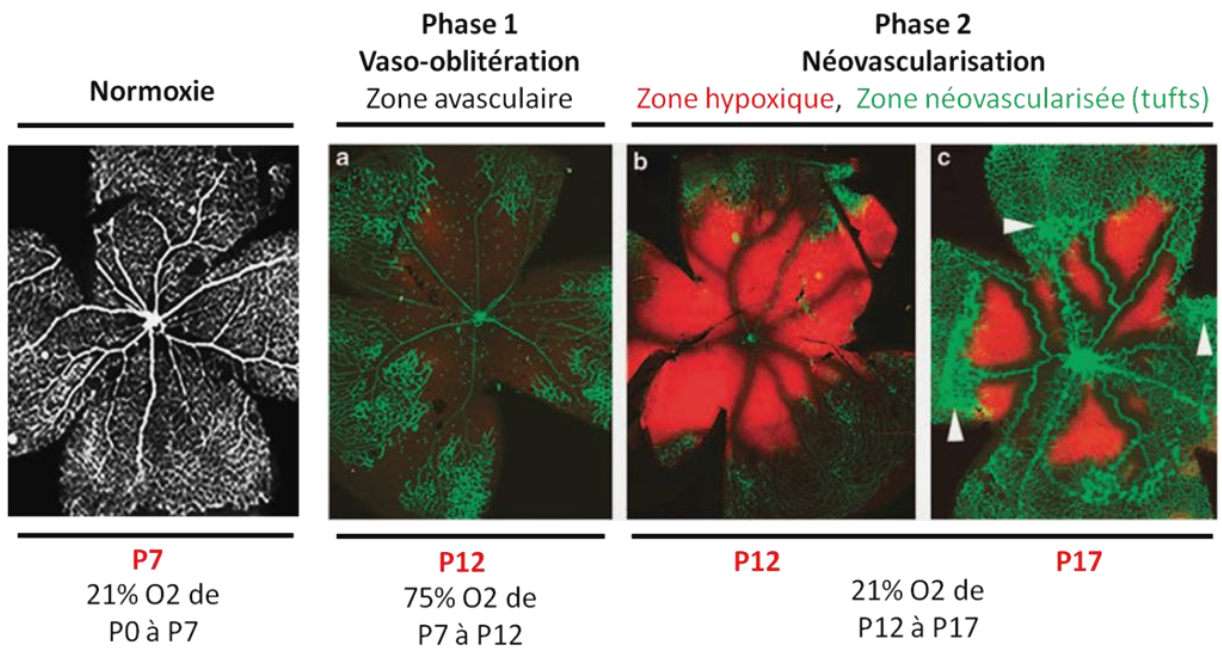
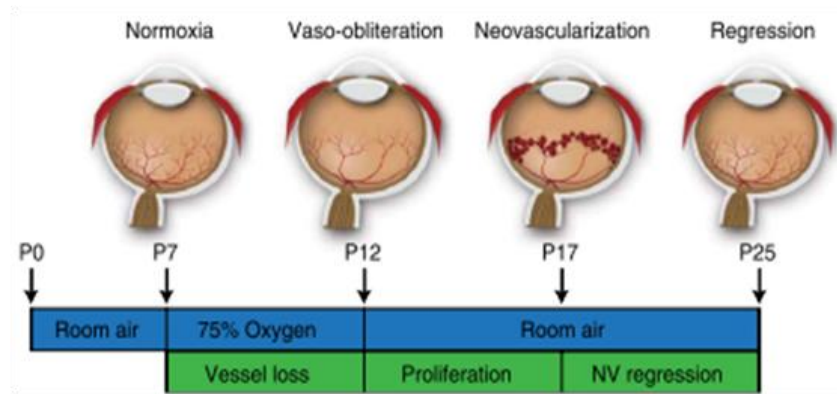


Figure 54: Modèle de rétinopathie induite par l'oxygène (OIR) chez la souris. Adapté de (Connor et al 2009, Scott & Fruttiger 2010). Les flèches blanches indiquent les «tufts».

VI. Résultats

Pour analyser le rôle potentiel de Fzd7 dans l'angiogenèse pathologique, le modèle d'étude que nous avons choisi est le modèle murin de rétinopathie induite par l'oxygène (OIR) qui a été décrit ci-dessus.

Afin d'étudier l'impact de la délétion spécifique de *fzd7* dans l'endothélium sur les différentes phases de la rétinopathie ischémique, nous avons utilisés deux lignées de souris spécifiquement délétées pour *fzd7* dans les CE: la lignée constitutive Tie2-Cre et la lignée inductible PDGFb-iCre.

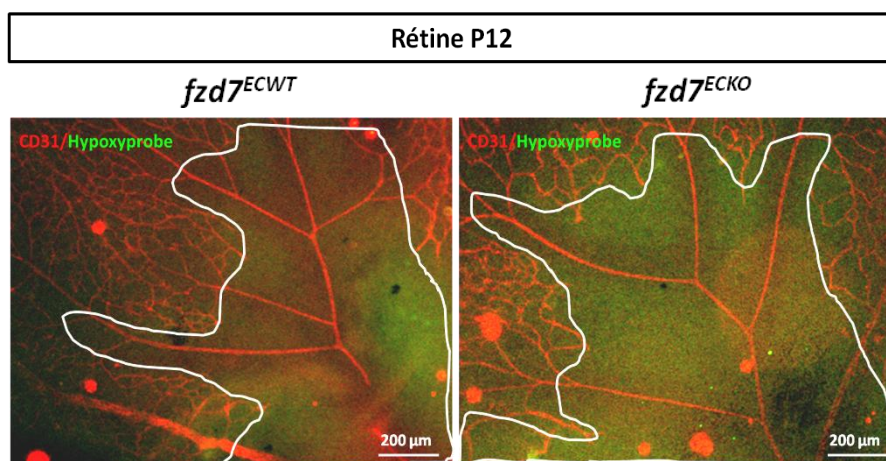
A. Effets de la délétion de *fzd7* dans les CE sur l'angiogenèse pathologique dans le modèle d'OIR pour la lignée Tie2-Cre

1) Impact de la délétion de *fzd7* sur la vaso-oblitération à P12

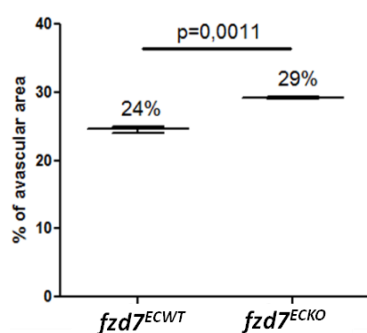
Pour étudier le rôle de Fzd7 sur la phase 1 de vaso-oblitération, des marquages du réseau vasculaire ont été effectués *in toto* à l'aide d'un anticorps CD31 sur des rétines de souris contrôles *fzd7^{ECWT}* et *fzd7^{ECKO}* à P12 après 5 jours passés dans une atmosphère à 75% d'O₂. Pour évaluer l'hypoxie au sein du réseau rétinien, des marquages avec l'anticorps anti-hypoxyprobe ont également été effectués sur ces mêmes rétines à P12 (Figure 55, A).

Nos résultats préliminaires indiquent que les rétines de souris mutantes *fzd7^{ECKO}* à P12 présentent une augmentation de 5% de la zone avasculaire située au centre de la rétine (Figure 55, B) ainsi qu'une augmentation de 8% de la zone hypoxique (Figure 55, C), qui suit la zone avasculaire, comparées aux rétines de souris *fzd7^{ECWT}*. Ces données suggèrent que la délétion de *fzd7* sous le contrôle du promoteur Tie2 pourrait augmenter la sensibilité du tissu rétinien à l'hypoxie et/ou augmenter la vaso-oblitération au cours de la première phase du modèle OIR.

A



B



C

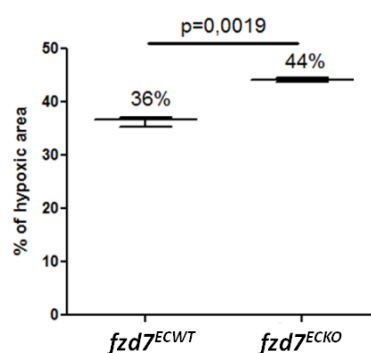


Figure 55: Augmentation du pourcentage des zones avasculaires et hypoxiques dans les souris *fzd7*^{ECKO} vs *fzd7*^{ECWT} à P12. (A) Images représentatives de rétines à P12. Les souris sont placées dans une atmosphère à 75% d'O₂ entre P7 et P12 puis sacrifiées 1h30 après injection d'hypoxyprobe. Une augmentation du % de la zone avasculaire (zone délimitée en blanc) (B) et de la zone hypoxique (C) est observée dans les rétines de souris *fzd7*^{ECKO} vs *fzd7*^{ECWT}. *fzd7*^{ECWT} n=3; *fzd7*^{ECKO} n=2. Marquage du réseau vasculaire avec l'anticorps CD31 (rouge) et des zones d'hypoxie avec l'anticorps FITC-Mab1 (vert). Les images ont été acquises et analysées avec un microscope Zeiss (Axiovision).

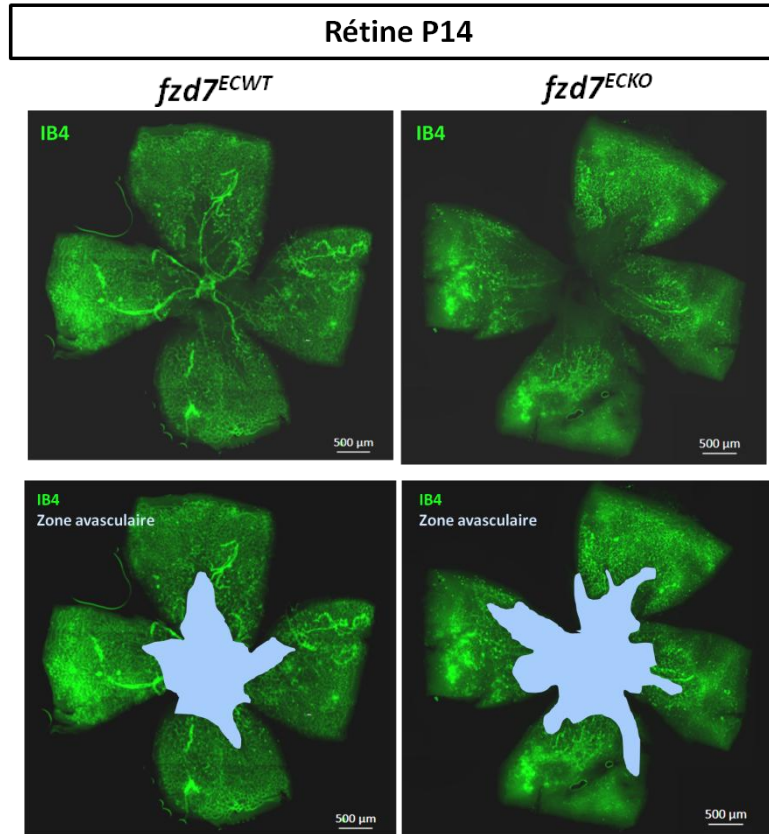
2) Impact de la délétion de *fzd7* sur la réponse vasculaire à P14 et P17

Nous avons ensuite étudié l'impact de la délétion de *fzd7* sur la réponse vasculaire après 5 jours passés dans une atmosphère à 75% d'O₂ et 2 jours (P14) ou 5 jours (P17) à atmosphère ambiante. Le réseau vasculaire des rétines de souris contrôles et *fzd7*^{ECKO} ont été analysées après marquages *in toto* à l'aide de l'Isolectine B4 (Figure 56, A).

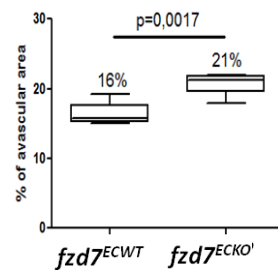
A P14, nos résultats montrent que les rétines de souris mutantes *fzd7*^{ECKO} présentent une augmentation de 5% de la zone avasculaire située au centre de la rétine (Figure 56, B) et au contraire une diminution significative de 3% de la zone néovascularisée (Figure 56, C) comparées aux rétines

de souris contrôles $fzd7^{ECWT}$. Ces données indiquent que la délétion de $fzd7$ sous le contrôle du promoteur Tie2 pourrait diminuer la néovascularisation et à l'inverse augmenter la zone avasculaire dans le modèle OIR.

A



B



C

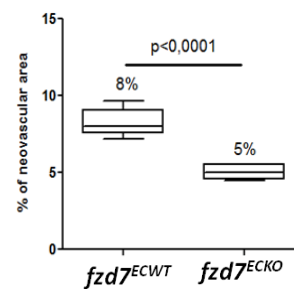


Figure 56: Augmentation du pourcentage de la zone avasculaire et diminution de la zone néovascularisée dans les souris $fzd7^{ECKO}$ vs $fzd7^{ECWT}$ à P14. (A) Images représentatives de rétines à P14. Les souris sont placées dans une atmosphère à 75% d'O₂ entre P7 et P12 puis sacrifiées à P14. Une augmentation du % de la zone avasculaire (zone bleue) (B) et une diminution de la zone de néovascularisation (C) est observée dans les rétines de souris $fzd7^{ECKO}$ vs $fzd7^{ECWT}$. $fzd7^{ECWT}$ n=6; $fzd7^{ECKO}$ n=5. Marquage du réseau vasculaire avec l'isolectine B4 (vert). Les images ont été acquises et analysées avec un microscope Zeiss (Axiovision).

A P17, des expériences similaires de marquages du réseau vasculaire avec l'Isolectine B4 ont été réalisées sur des rétines de souris contrôles $fzd7^{ECWT}$ et mutantes $fzd7^{ECKO}$, c'est-à-dire lorsque la néovascularisation atteint son maximum, soit après 5 jours passés dans une atmosphère à 75% d'O₂ et 5 jours à atmosphère ambiante (Figure 57, A).

Nos résultats à P17 confirment nos données obtenues à P14 et montrent également une augmentation de 5% de la zone avasculaire (Figure 57, B) et au contraire une diminution significative de 6% de la zone néovascularisée (Figure 57, C) comparées aux rétines de souris $fzd7^{ECWT}$. Ces données confirment que la délétion constitutive de $fzd7$ sous le contrôle du promoteur Tie2 entraîne une diminution de la néovascularisation et une augmentation de la zone avasculaire et touche ainsi les 2 phases de l'OIR.

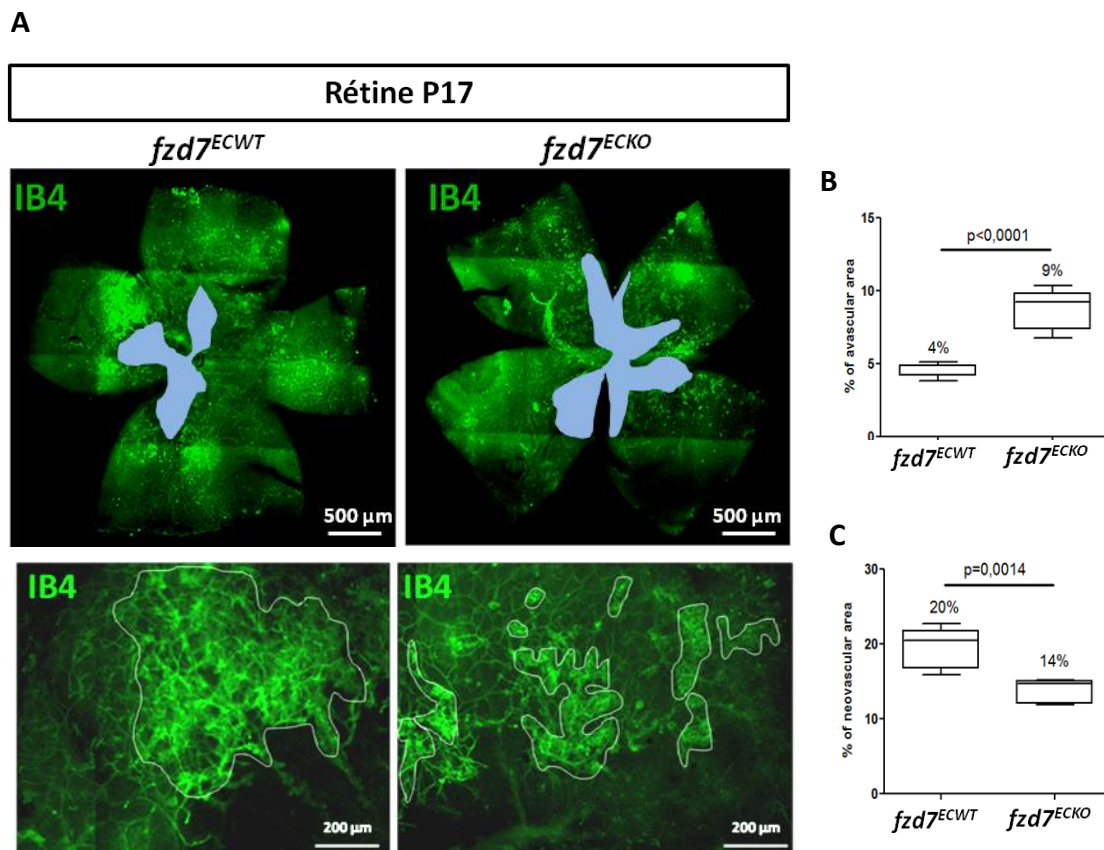


Figure 57: Augmentation du pourcentage de la zone avasculaire et diminution de la zone néovascularisée dans les souris $fzd7^{ECKO}$ vs $fzd7^{ECWT}$ à P17. (A) Images représentatives de rétines à P17. Les souris sont placées dans une atmosphère à 75% d'O₂ entre P7 et P12 puis sacrifiées à P17. Une augmentation du % de la zone avasculaire (zone bleue) (B) et une diminution de la zone de néovascularisation (zone délimitée en blanc) (C) est observée dans les rétines de souris $fzd7^{ECKO}$ vs $fzd7^{ECWT}$. $fzd7^{ECWT}$ n=7; $fzd7^{ECKO}$ n=6. Marquage du réseau vasculaire avec l'Isolectine B4 (vert). Les images ont été acquises et analysées avec un microscope Zeiss (Axiovision).

Nous avons ensuite voulu caractériser de façon plus précise l'impact de cette délétion sur l'architecture et la morphologie du réseau vasculaire induit par l'hypoxie. A partir de P12 et jusqu'à P17, l'hypoxie au sein de la rétine active la révascularisation de la rétine.

Pour réaliser cette étude, les marquages immunofluorescents ont été analysés par microscopie à champs large avec un Apotome (Zeiss). Cette analyse permet de réaliser des coupes optiques, des plans focaux dans le z, de voir la complexité du réseau vasculaire en 3D, d'individualiser et analyser les différents plexus. A P14 et P17, on observe la reprise de la croissance normale du réseau vasculaire rétinien avec la formation des plexus 1, 2 et 3 (Figure 58 A et B). De manière intéressante, nous observons également une néovascularisation pathologique avec la formation de «tufts» dans le vitré à partir du plexus vasculaire primaire. Ces «tufts» sont des vaisseaux plus larges et présentent une morphologie anormale. A P14, ceux sont des structures en 3D en forme de grappes ou de boules (Figure 58, A), tandis qu'à P17 les «tufts» forment un réseau vasculaire anarchique plus développé (Figure 58, B).

La formation de ce réseau complexe nécessite la prolifération des cellules endothéliales. Afin d'étudier cette prolifération, les souris ont été injectées avec du BrdU 3h avant le sacrifice. Un double marquage IB4/BrdU a été réalisé à différents temps (P14 et P17) sur des rétines de souris contrôles. L'analyse des marquages montre qu'au cours de la revascularisation, la prolifération touche différents plans de la rétine. On observe ainsi une prolifération des CE au sein des plexus 1, 2 et 3 entre P12 et P17 mais également au niveau des «tufts», ainsi que la prolifération de cellules de la rétine autres que les CE montrant ainsi la complexité de ce modèle OIR (Figure 58 A et B).

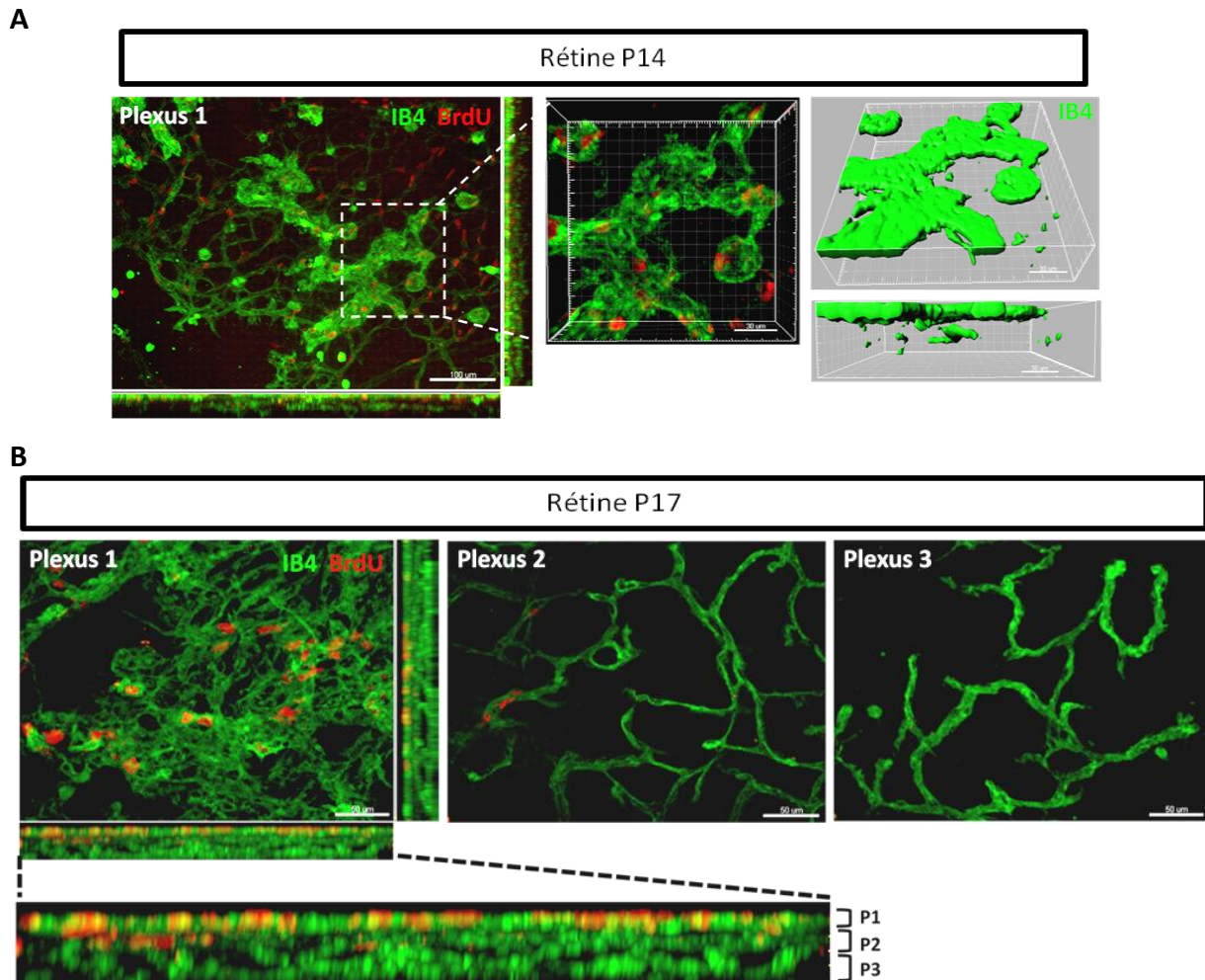


Figure 58: Cinétique de formation des «tufts» dans des rétines de souris contrôles. (A) Image représentative des «tufts» (vaisseaux nouvellement formés en grappes) de rétines à P14 au cours de la phase de néovascularisation. Agrandissement de la zone d'un «tuft», reconstruction 3D et surfacage du réseau vasculaire. **(B)** Image représentative des «tufts» de rétines à P17. Un «crop» des différents plans focaux permet de séparer et de visualiser les 3 plexus parallèles. Marquage du réseau vasculaire avec l'Isolectine B4 (vert) et des cellules en prolifération avec l'anticorps anti BrdU (rouge). Les images ont été acquises avec un microscope Zeiss (Apotome, Axiozoom, Zen), la reconstruction 3D, le surfacage et le «crop» ont été réalisés avec le logiciel Imaris Bitplane.

Dans un deuxième temps nous avons voulu caractériser l'impact de la délétion de *fzd7* sur ce processus pathologique de vasoprolifération. Des co-marquages du réseau vasculaire avec l'Isolectine B4 et des cellules en prolifération avec l'anticorps anti-BrdU ont été réalisés sur des rétines de souris *fzd7*^{ECWT} et *fzd7*^{ECKO} à P14 et P17. Comme nous l'observons dans la figure 59, à P14, la délétion de *fzd7* semble diminuer la prolifération cellulaire. Cependant, au vu de la complexité des images, une évaluation de la prolifération dans les différents plans de chaque plexus vasculaire, et plus particulièrement au niveau des «tufts», est en cours de quantification. Ces expériences nous

permettrons de déterminer si la délétion de *fzd7* altère la morphologie des néovaisseaux et surtout entraîne une altération de la prolifération au sein des «tufts», ce qui pourrait expliquer la diminution de la néovascularisation pathologique dans les rétines de souris mutantes (Figure 59).

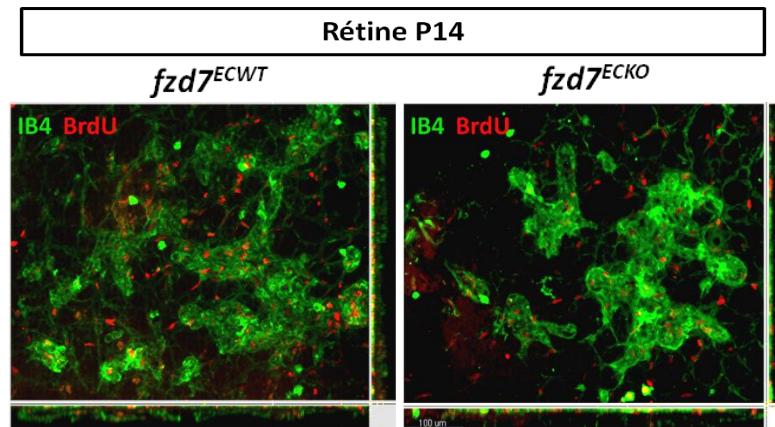


Figure 59: Prolifération au niveau des «tufts» néo-formés dans les rétines de souris *fzd7*^{ECKO} vs *fzd7*^{ECWT} à P14. Images représentatives des «tufts» (vaisseaux nouvellement formés en grappes) de rétines à P14 au cours de la phase de néovascularisation. Les souris sont placées dans une atmosphère à 75% d'O₂ entre P7 et P12 puis sacrifiées à P14. Marquage du réseau vasculaire avec l'Isolectine B4 (vert) et des cellules en prolifération avec l'anticorps anti BrdU (rouge). Les images ont été acquises avec un microscope Zeiss (Axiozoom, Zen).

3) Altération des voies de signalisation Wnt canonique et Notch dans les rétines de souris *fzd7*^{ECKO} au cours de la néovascularisation

Au cours de notre précédent travail, nous avons mis en évidence que Fzd7 est capable de contrôler l'angiogenèse physiologique *via* les voies Wnt canonique et Notch. Nous avons démontré que la délétion de *fzd7* *in vitro* et *in vivo* entraîne une diminution de ces deux voies de signalisation.

Ainsi, nous avons étudié par qPCR l'impact de la délétion de *fzd7* dans les CE sur les voies de signalisation Wnt canonique et Notch au cours de la phase de néovascularisation. Nous avons analysé l'expression des transcrits de la β -caténine et de deux gènes cibles de la voie canonique (Axin2 et Lef1), ainsi que l'expression des partenaires de la voie Notch (Dll4, Notch1, Hey2 et Nrarp) dans les rétines de souris *fzd7*^{ECKO} vs *fzd7*^{ECWT} à P14 (Figure 60, A et C) et à P17 (Figure 60, B et D).

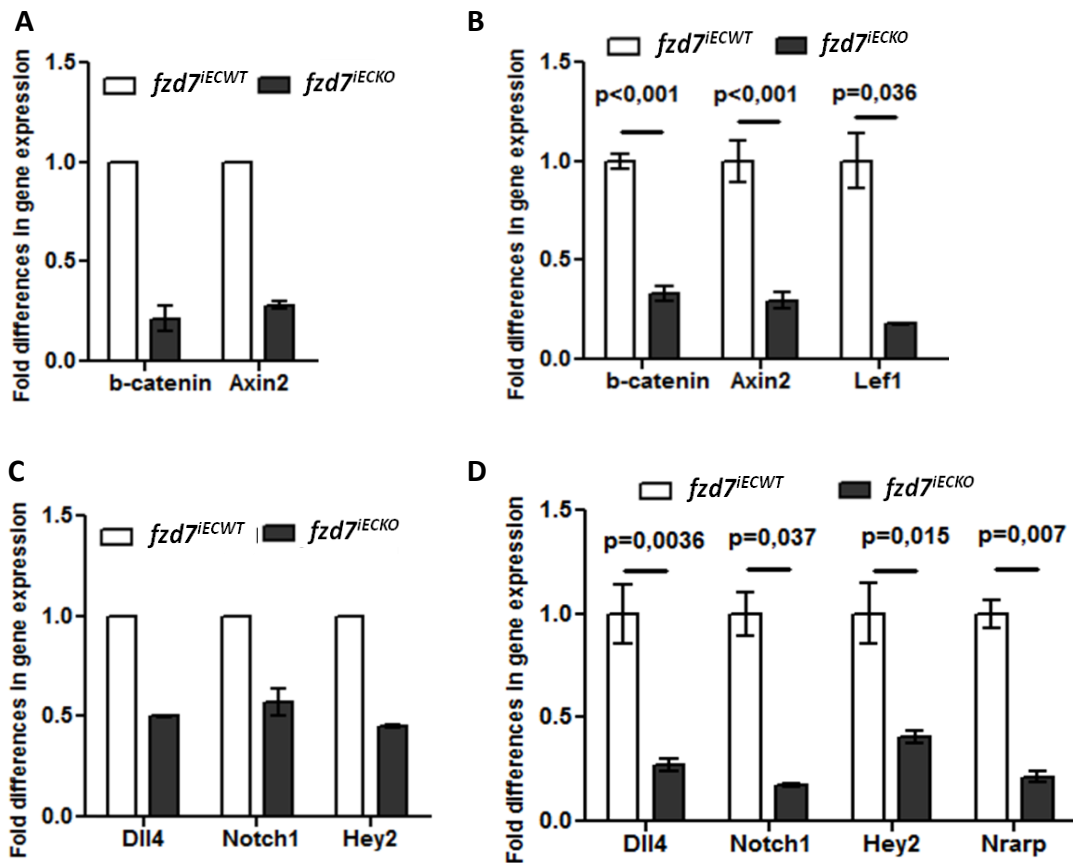


Figure 60: Altération des voies de signalisation Wnt canonique et Notch dans les rétines de souris *fzd7^{ECKO}* vs contrôles *fzd7^{ECWT}* à P14 et P17 au cours de la phase de néovascularisation. (A-D) Des qPCR réalisées sur des rétines de souris *fzd7^{ECKO}* vs *fzd7^{ECWT}* montrent une forte diminution d'expression de la β -caténine et des gènes cibles Axin2 et Lef1 à P14 (A) et P17 (B), ainsi qu'une forte diminution d'expression du ligand Dll4, du récepteur Notch1 et des gènes cibles (Hey2, Nrarp) à P14 (C) et P17 (D). Les résultats normalisés avec la β -actine sont les moyennes +/- écarts types de n=1-3 expériences.

Nos données préliminaires indiquent que la délétion de *fzd7* dans les CE induit une forte diminution d'expression des transcrits de la β -caténine et des gènes cibles de la voie canonique Axin2 et Lef1, ainsi qu'une diminution de l'expression du ligand Dll4, du récepteur Notch1 et des gènes cibles de la voie Notch (Hey2 et Nrarp). Ces premiers résultats montrent une dérégulation des voies Wnt canonique et Notch dans les rétines de souris mutantes à P14 et P17, suggérant que Fzd7 pourrait réguler l'angiogenèse pathologique *via* ces deux voies de signalisation.

B. Effets de la délétion de *fzd7* dans les CE sur l'angiogenèse pathologique dans le modèle d'OIR pour la lignée PDGFb-iCre

Afin de caractériser le rôle de *fzd7* sur les différentes phases décrites au cours du modèle OIR et plus particulièrement sur la phase de néovascularisation, nous avons utilisé la lignée inductible PDGFb-iCre. L'utilisation de ce modèle transgénique permet d'activer spécifiquement la délétion de *fzd7* avant la 1^{ère} ou la 2^{ème} phase de l'OIR. Ainsi, deux protocoles de délétion de *fzd7* dans les CE ont été mis en place:

- délétion de *fzd7* avant la phase 1 par injection de tamoxifène à P1, P2 et P3, puis analyse de l'impact de cette délétion sur la phase 1 à P12 ou sur les phases 1 et 2 à P14 et P17
- délétion de *fzd7* après la phase 1, mais avant la phase 2, par injection de tamoxifène à P12 et P13, puis analyse de l'impact de cette délétion sur la phase 2 à P14 et P17.

1) Impact de la délétion de *fzd7* sur la vaso-oblitération à P12

Ce premier protocole, réalisé avec la lignée de souris inductible PDGFb-iCre, permet d'induire la délétion de *fzd7* spécifiquement dans les CE dès le 3^{ème} jour post-natal et donc avant la phase 1 du modèle OIR. Ainsi, pour étudier l'effet de la délétion de *fzd7* sur la phase de vaso-oblitération, des marquages du réseau vasculaire ont été effectués *in toto* à l'aide d'un anticorps CD31 sur des rétines de souris contrôles *fzd7^{iECWT}* et *fzd7^{iECKO}* à P12. La délétion de *fzd7* ayant été induite par 3 injections de tamoxifène à P1, P2 et P3.

Nos résultats montrent une augmentation de 9% de la zone avasculaire dans les rétines de souris mutantes comparées aux rétines de souris *fzd7^{iECWT}*. Nos données préliminaires à P12, avec cette lignée, sont en accord avec nos données obtenues avec la lignée Tie2-Cre. Ces résultats suggèrent que la délétion de *fzd7* dans les CE avant l'induction de l'OIR entraîne une augmentation de la vaso-oblitération au cours de la première phase de ce modèle, comme pour la lignée Tie2-Cre (Figure 61).

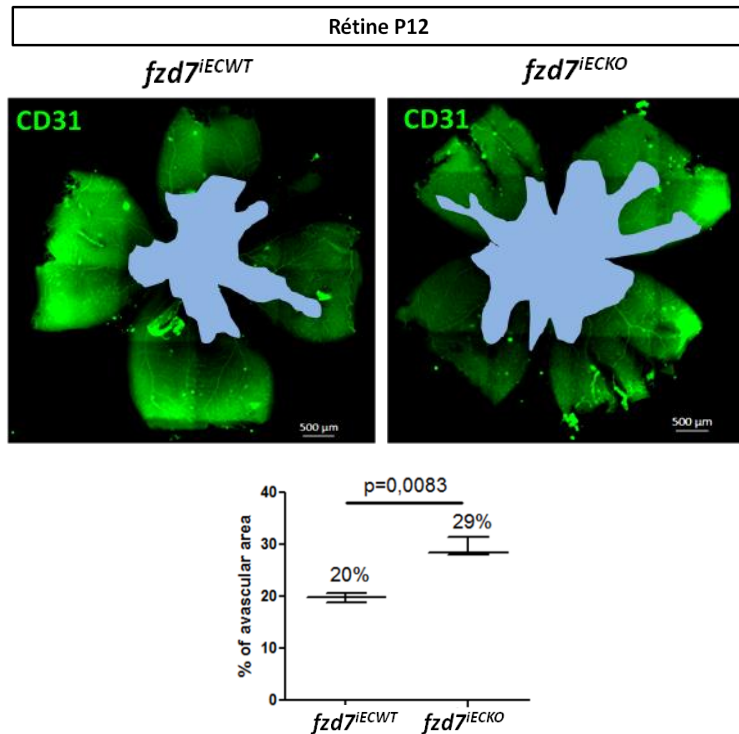


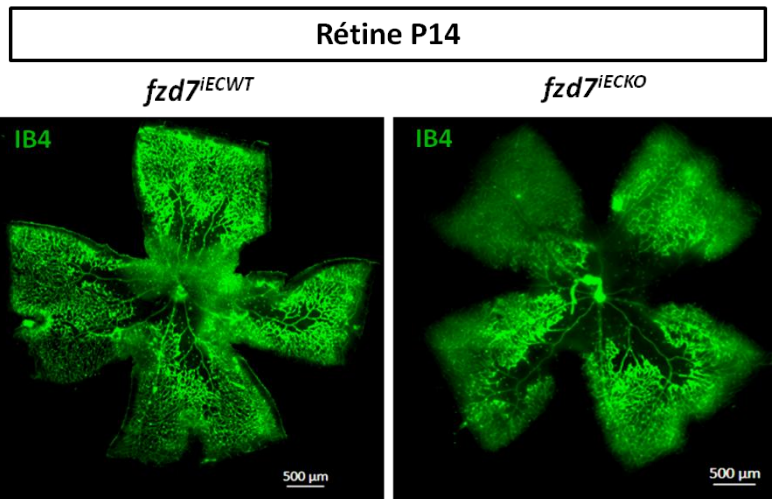
Figure 61: Augmentation du pourcentage de la zone avasculaire dans les souris *fzd7*^{iECKO} vs *fzd7*^{iECWT} à P12. Images représentatives de rétines à P12. Les souris sont placées dans une atmosphère à 75% d'O₂ entre P7 et P12 puis sacrifiées à P12. Une augmentation du % de la zone avasculaire (zone bleue) est observée dans les rétines de souris *fzd7*^{iECKO} vs *fzd7*^{iECWT}. *fzd7*^{iECWT} n=2; *fzd7*^{iECKO} n=3. Marquage du réseau vasculaire avec l'anticorps CD31 (vert). Les images ont été acquises et analysées avec un microscope Zeiss (Axiovision).

2) Impact de la délétion de *fzd7* sur la réponse vasculaire à P14 et P17

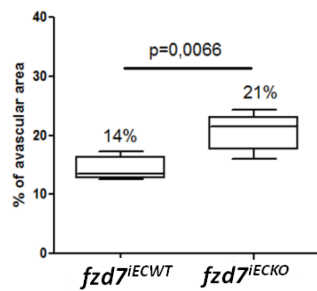
Pour étudier l'impact de *fzd7* sur les 2 phases de l'OIR et confirmer nos précédents résultats obtenus avec la lignée Tie2-Cre, des marquages du réseau vasculaire ont été effectués *in toto* à l'aide de l'Isolectine B4 sur des rétines de souris *fzd7*^{iECWT} et *fzd7*^{iECKO} à P14 (Figure 62, A). La délétion de *fzd7* ayant été induite par 3 injections de tamoxifène à P1, P2 et P3.

Nos résultats montrent une augmentation de 7% de la zone avasculaire (Figure 62, B) et au contraire une diminution de 4% de la zone néovascularisée (Figure 62, C) dans les rétines de souris *fzd7*^{iECKO} comparées aux rétines de souris *fzd7*^{iECWT}. Nos résultats à P14, avec cette lignée, sont en accord avec nos données obtenues avec la lignée Tie2-Cre. Ces données suggèrent que la délétion de *fzd7* dans les CE entraîne une diminution la néovascularisation et une persistance de l'augmentation de la zone avasculaire dans le modèle OIR comme pour la lignée Tie2-Cre, montrant le rôle de Fzd7 sur les deux phases de l'OIR.

A



B



C

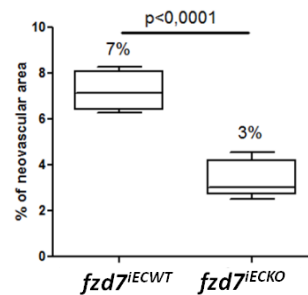


Figure 62: Augmentation du pourcentage de la zone avasculaire et diminution de la zone néovascularisée dans les souris *fzd7*^{iECKO} vs *fzd7*^{iECWT} à P14. (A) Images représentatives de rétines à P14. Les souris sont placées dans une atmosphère à 75% d'O₂ entre P7 et P12 puis sacrifiées à P14. Une augmentation du % de la zone avasculaire (B) et une diminution de la zone de néovascularisation (C) sont observées dans les rétines de souris *fzd7*^{iECKO} vs *fzd7*^{iECWT}. *fzd7*^{iECWT} n=4; *fzd7*^{iECKO} n=7. Marquage du réseau vasculaire avec l'Isolectine B4 (vert). Les images ont été acquises et analysées avec un microscope Zeiss (Axiovision).

3) Impact de la délétion de *fzd7* spécifiquement sur la néovascularisation

Enfin, des expériences sont en cours afin de définir le rôle de *fzd7* spécifiquement au cours de la 2^{ème} phase. Pour cela les souris sont traitées par du tamoxifène après leur sortie du caisson à oxygène, à P12 et P13. Le phénotype vasculaire à P14 et P17 ainsi que l'expression génique seront alors évalués comme précédemment. Ces expériences permettront d'analyser spécifiquement le rôle de *fzd7* dans la formation du réseau vasculaire et la formation «des tufts» au cours de la phase de vasoprolifération.

VII. Discussion

Au cours de nos précédents travaux, nous avons démontré que Fzd7 contrôle l'angiogenèse post-natale de la rétine *via* la voie Wnt/canonique et ce de manière dépendante et indépendante de la voie Notch. Ainsi, l'objectif de ce travail est de déterminer si Fzd7, *via* la régulation de ces deux voies de signalisation, participerait à l'angiogenèse pathologique et *in fine* pourrait être une nouvelle cible pour bloquer la néovascularisation dans les rétinopathies ischémiques.

Chez l'homme, plusieurs pathologies oculaires ont été reliées à une angiogenèse pathologique telles que la rétinopathie du prématuré et la rétinopathie proliférante du diabétique. Les rétinopathies sont à l'origine de nombreux troubles de la vision et sont les premières causes de cécité chez le prématuré et chez l'adulte. L'incidence de ces pathologies est en constante augmentation et est la conséquence des progrès médicaux en matière de prise en charge des grands prématurés pour la RP et de l'augmentation du diabète de type II chez l'adulte pour la RD.

Ainsi, il est fondamental de définir et de distinguer quelles voies de signalisation et mécanismes moléculaires sont impliqués dans la formation physiologique de vaisseaux sanguins et dans la croissance de vaisseaux pathologiques, afin d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques qui permettraient de mettre au point de nouvelles thérapies plus efficaces, plus spécifiques, entraînant moins d'effets indésirables et ayant pour objectif d'inhiber l'angiogenèse pathologique.

Ces dernières années, les voies de signalisation Wnt/Fzd ont émergé comme étant des candidats potentiels pour de nouvelles stratégies thérapeutiques. En effet, des mutations de gènes membres de ces voies ont été identifiées comme étant à l'origine d'une pathologie oculaire chez l'homme: la vitréorétinopathie exsudative familiale (Nikopoulos et al 2010, Toomes et al 2004).

L'ensemble de nos données préliminaires montre pour la première fois le rôle potentiel d'un nouveau membre des voies Wnt/Fzd, le récepteur Fzd7, dans le contrôle de la néovascularisation observée au cours des rétinopathies *via* potentiellement la régulation des voies de signalisation β -caténine canonique et/ou Dll4/Notch.

Pour étudier le rôle de Fzd7 dans l'angiogenèse pathologique, nous avons utilisé le modèle murin de rétinopathie induite par l'oxygène (OIR) qui mime la rétinopathie observée chez le prématuré et avons analysé l'impact de la délétion constitutive ou induite de *fzd7* dans les CE sur les deux phases décrites au cours de ce modèle, la vaso-oblitération et la néovascularisation.

Les résultats préliminaires de notre étude suggèrent que Fzd7 intervient dans les deux phases du modèle OIR. En effet, nos données montrent que la délétion de *fzd7* dans les cellules endothéliales entraîne une augmentation de la vaso-oblitération (Phase 1) qui se traduit par une augmentation des

zones avasculaires et hypoxiques à P12 et une persistance de l'augmentation de la zone avasculaire à P14 et P17 comparée aux souris contrôles.

Le phénotype observé au cours de la phase de vaso-oblitération dans les rétines de souris mutantes suggère que la délétion de *fzd7* pourrait augmenter la sensibilité du tissu rétinien à l'hyperoxie. Au cours de cette phase d'hyperoxie, une régression du réseau vasculaire superficiel au centre de la rétine et une apoptose des cellules endothéliales induisant l'apparition d'une large zone avasculaire sont observées. Aussi, nous pouvons émettre l'hypothèse que la délétion de *fzd7* pourrait entraîner une augmentation du remodelage et de la régression des vaisseaux sanguins en réponse à l'hyperoxie. Pour tester cela, des co-marquages avec l'Isolectine B4 et l'anticorps anti-collagène IV devront être réalisés sur des rétines de souris mutantes et contrôles afin de quantifier la régression vasculaire.

De manière intéressante, nos données semblent montrer également que les mutants *fzd7^{ECKO}* et *fzd7^{IECKO}* présentent une diminution de la néovascularisation pathologique à P14 et P17. En effet, l'hypoxie relative créée par le retour des souris à atmosphère normoxique réactive la croissance du réseau vasculaire au sein de la zone avasculaire, située au centre de la rétine, et induit également la formation de vaisseaux anarchiques et pathologiques dans le vitré (Chen et al 2012, Hartnett & Penn 2012). Les souris mutées pour *fzd7* présentent une zone avasculaire augmentée par rapport aux souris contrôles, suggérant que la délétion de *fzd7* diminue la repousse normale du réseau vasculaire. Ces données sont en accord avec nos résultats précédents montrant que Fzd7 participe à la formation de néovaisseaux.

Cependant, l'effet observé sur cette phase de vaso-prolifération peut être consécutif à la délétion constitutive de *fzd7* (promoteur Tie2) ou à une délétion précoce de *fzd7* (promoteur Pdgfb-i, induction par le tamoxifène à P1). Afin de nous affranchir de l'effet propre de Fzd7 sur l'angiogenèse physiologique, cette étude doit être complétée par l'analyse du phénotype des rétines de souris délétées pour *fzd7* avant la 2^{ème} phase de l'OIR. Actuellement, des expériences sont menées sur des souris *fzd7^{IECKO}* et *fzd7^{IECWT}* pour lesquelles la délétion de *fzd7* sera induite par injection de tamoxifène à partir de P12, c'est à dire à la sortie du caisson en hyperoxie. Ces expériences permettront de conclure sur le rôle spécifique de Fzd7 sur la néovascularisation pathologique.

De plus, une analyse plus fine des «tufts», qui se forment au cours de cette phase 2, devra être menée dans les rétines de souris mutantes et contrôles. Il serait notamment intéressant de déterminer si la délétion de *fzd7* entraîne une altération de la morphologie et/ou induit une diminution de la prolifération des «tufts» qui pourrait expliquer la diminution de la néovascularisation pathologique.

De façon intéressante, nos analyses préliminaires suggèrent une altération de la voie β -caténine et de la voie Notch dans les mutants à P14 et P17. Même si ces résultats doivent être confirmés, ils sont cohérents avec nos données montrant que Fzd7 contrôle le développement vasculaire de la rétine *via* la voie Wnt canonique et une interaction avec la voie Notch. Dans la littérature, il a été démontré que la voie Wnt canonique est activée au cours de la néovascularisation pathologique (Park et al 2011) et que l'OIR induit une augmentation de l'expression de plusieurs ligands Wnt (Wnt3a, Wnt7a, Wnt10a), de Fzd4 et de Lrp5 (Chen et al 2011). D'autre part, Chen et al. ont démontré par l'utilisation de souris transgéniques exprimant la β -galactosidase sous contrôle du promoteur TOP (site de fixation de la β -caténine), que les CE qui forment les «tufts» sont β -gal positives, montrant ainsi que la voie Wnt canonique est active au cours de la néovascularisation pathologique (Chen et al 2011).

D'autre part, la délétion génétique de partenaires de cette voie canonique, mutants *Lrp5*^{-/-} et *DVL2*^{-/-}, entraîne une diminution de la néovascularisation pathologique (Chen et al 2011). Le blocage de la voie dépendante de la β -caténine diminue l'expression de la claudine5 ce qui explique partiellement la déstabilisation de l'endothélium en conditions pathologiques. De manière intéressante, l'expression ectopique ou un traitement exogène de la Norrin permet de restaurer le développement vasculaire tout en inhibant la néovascularisation pathologique (Ohlmann et al 2010, Tokunaga et al 2013). Enfin, dans un modèle de rétinopathie diabétique chez le rat, l'expression de la β -caténine est augmentée et il a été mis en évidence que l'inhibition de Lrp6 par l'utilisation d'un anticorps bloquant permet d'inhiber la voie Wnt canonique et l'hyperperméabilité dans la rétine (Chen et al 2009, Lee et al 2012). L'ensemble de ces données montre le rôle important de la voie canonique dans l'angiogenèse pathologique et nous permet d'émettre l'hypothèse que Fzd7 pourrait réguler la phase de néovascularisation, *via* l'activation de la voie Wnt canonique.

La voie Notch, largement impliquée dans l'angiogenèse physiologique, semble aussi jouer un rôle prépondérant dans les rétinopathies ischémiques (Phng et al 2009). L'injection intravitréenne d'une protéine de fusion Dll4 qui diminue la signalisation Dll4/Notch stimule, d'une part, l'extension de nouveaux bourgeonnements vasculaires dans la rétine et limite, d'autre part la, croissance ectopique des «tufts» dans le vitré (Lobov et al 2007). Plus récemment, Lovob et al. ont montré que l'inhibition génétique de la voie Dll4/Notch diminue l'occlusion vasculaire oculaire et permet de maintenir un flux sanguin adéquat, rendant ainsi les vaisseaux sanguins de la rétine moins sensibles à l'hyperoxie et entraînant une diminution de la vaso-oblitération dans un modèle OIR. A l'inverse, l'activation de la voie Notch par l'utilisation de mutants *Nrarp*^{-/-} entraîne un phénotype vasculaire opposé au cours de l'OIR (Lobov et al 2011). Cet effet sur la vaso-oblitération semble être dû à une

modification de l'expression de vasodilatateurs, comme l'adrénomédulline, et de vasoconstricteurs tels que l'angiotensinogène.

Afin de définir si Fzd7 pourrait orchestrer les deux phases de l'OIR *via* l'activation de la voie Wnt canonique et s'il existe un lien moléculaire avec la voie Notch, des expériences de «rescue» pharmacologique de la voie Wnt et/ou de Notch, avant la première et/ou la deuxième phase de la pathologie, seront réalisées.

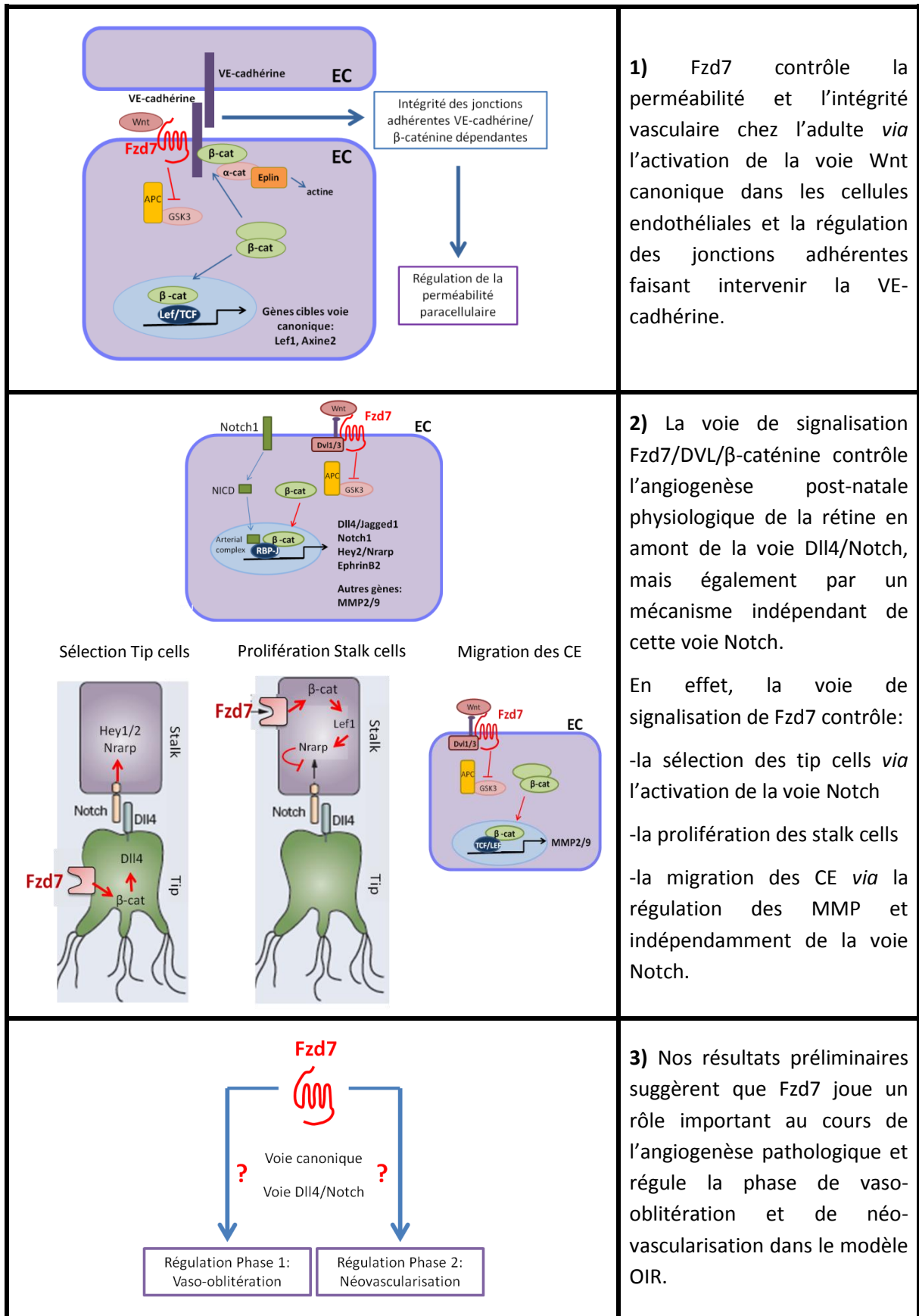
La finalité de ce projet sera de cibler cette nouvelle voie Wnt/Fzd7 avec des stratégies thérapeutiques visant à diminuer spécifiquement l'angiogenèse pathologique dans les rétinopathies. Au vue de nos premières données, Fzd7 participe aux 2 phases de l'OIR. Si la diminution de l'angiogenèse pathologique est bénéfique, l'augmentation de la vaso-oblitération pourrait être un effet délétère, suggérant que la signalisation de Fzd7 devrait être ciblée au cours de la 2^{ème} phase du modèle OIR pour une efficacité maximale. D'autre part, nous avons démontré que Fzd7 régule *in vitro* et *in vivo* la perméabilité des CE *via* l'activation de la voie canonique et la régulation des jonctions cellulaires dépendante de la VE-cadhérine participant ainsi à l'intégrité vasculaire (Ferreira Tojais et al 2014). Ainsi, il sera nécessaire d'évaluer l'impact de la délétion de *fzd7* sur la perméabilité des vaisseaux sanguins dans ce modèle d'angiogenèse pathologique et ce par l'analyse de la diffusion dans le réseau vasculaire rétinien du FITC-dextran injecté en intra-cardiaque chez les animaux mutants et contrôles. En effet, l'augmentation de la perméabilité vasculaire peut entraîner la formation d'un œdème qui peut être très délétère au niveau oculaire, notamment dans la rétinopathie diabétique.

Cette étude a permis de confirmer que Fzd7 est essentiel à la formation d'un réseau vasculaire. Elle participe aussi à une meilleure connaissance de la voie Wnt/Fzd en biologie vasculaire et conforte l'hypothèse que cette voie de signalisation peut être ciblée, afin de moduler l'activité angiogénique dans des situations pathologiques.

Conclusion générale et perspectives

Conclusion générale

En conclusion, ces travaux contribuent à une meilleure compréhension de l'implication du système Wnt/Fzd en biologie vasculaire. Cette étude a permis de mettre en évidence que le récepteur Fzd7, exprimé par les cellules endothéliales, contrôle différentes fonctions du système vasculaire. Ce récepteur, *via* l'activation de plusieurs voies de signalisation, est impliqué dans le maintien de l'intégrité vasculaire chez l'adulte. D'autre part, Fzd7 orchestre différents processus cellulaires et moléculaires nécessaires à la mise en place du système vasculaire au cours de l'angiogenèse physiologique, mais aussi pathologique. En effet, nous avons démontré que la voie de signalisation Fzd7/DVL/ β -caténine contrôle l'angiogenèse post-natale physiologique de la rétine en amont de la voie Dll4/Notch, mais également par un mécanisme faisant intervenir les MMP et indépendant de cette voie Notch. D'autre part, nos données préliminaires indiquent que Fzd7 participe à des processus angiogéniques pathologiques. Fzd7 semble réguler la phase de vaso-oblitération et de néovascularisation dans un modèle de rétinopathie induite par l'oxygène potentiellement *via* l'activation des voies Wnt canonique et Notch. Les expériences en cours permettront de définir si Fzd7 peut être une nouvelle cible thérapeutique potentielle dans le traitement des rétinopathies et à quelle phase de la pathologie Fzd7 doit être ciblé pour une efficacité maximale.



Perspectives

L'angiogenèse physiologique est un processus clé du développement embryonnaire, mais joue également un rôle fondamental chez l'adulte. Une anomalie de la formation des vaisseaux sanguins est à l'origine de nombreuses pathologies. Ainsi, un excès d'angiogenèse peut être observé dans les maladies inflammatoires, les cancers ou les pathologies oculaires (rétinopathies, DMLA), tandis qu'un défaut d'angiogenèse peut induire l'apparition d'une ischémie tissulaire et être responsable d'une réparation tissulaire insuffisante. Actuellement, le traitement des rétinopathies repose essentiellement sur la chirurgie oculaire faisant intervenir la photocoagulation laser et sur des injections intra-vitréennes d'inhibiteurs du VEGF. Cependant, un certain nombre d'études ont apporté des arguments en défaveur de l'utilisation de ces thérapies anti-VEGF (Cheung et al 2014, Schlingemann & Witmer 2009).

Au cours de ces dernières années, les voies de signalisation Wnt/Fzd sont apparues comme jouant un rôle fondamental dans le développement des vaisseaux sanguins en contrôlant la prolifération, la polarité, l'apoptose, la migration des CE, le «sprouting», le branchement ou encore le remodelage vasculaire (Dejana 2010, Franco et al 2009). L'ensemble des données de la littérature a permis de démontrer le rôle de ces différents partenaires dans l'angiogenèse physiologique et pathologique de la rétine et supporte l'hypothèse que les voies Wnt/Fzd pourraient être des candidats de choix pour de nouvelles stratégies thérapeutiques visant à diminuer ou augmenter la formation des vaisseaux sanguins. Dans ce contexte, bien que les mécanismes moléculaires ne soient pas encore totalement élucidés, le fait que Fzd7 contrôle l'angiogenèse physiologique et pathologique ouvre de nouvelles perspectives en termes de définition de nouvelles cibles anti- ou pro-angiogéniques pour le traitement de pathologie présentant un excès d'angiogenèse ou au contraire un défaut d'angiogenèse.

Afin d'apporter la preuve que Fzd7 pourrait être une cible efficace pour inhiber la phase 1 de vaso-oblitération et/ou la phase 2 de néovascularisation dans un modèle OIR chez la souris, deux stratégies de blocage de la voie de signalisation induite par le récepteur Fzd7 sont en cours de développement (Figure 63):

- La première stratégie a pour objectif de bloquer le récepteur Fzd7 en utilisant un anticorps monoclonal fait chez la souris et qui reconnaît le domaine extracellulaire CRD du récepteur. Cet anticorps anti-Fzd7 (MabFzd7) est actuellement en cours de production (Biotem) et différents clones sont en cours d'évaluation au laboratoire.

- La deuxième stratégie consiste à bloquer la signalisation induite par Fzd7 en utilisant un récepteur soluble Fzd7 (domaine CRD) qui joue le rôle de leurre pour les protéines Wnt. Les clones stables (CHO) surexprimant la protéine recombinante Fzd7-CRD ont été générés au laboratoire. Actuellement, les conditions de production de la protéine Fzd7-CRD sont en cours d'optimisation et d'évaluation.

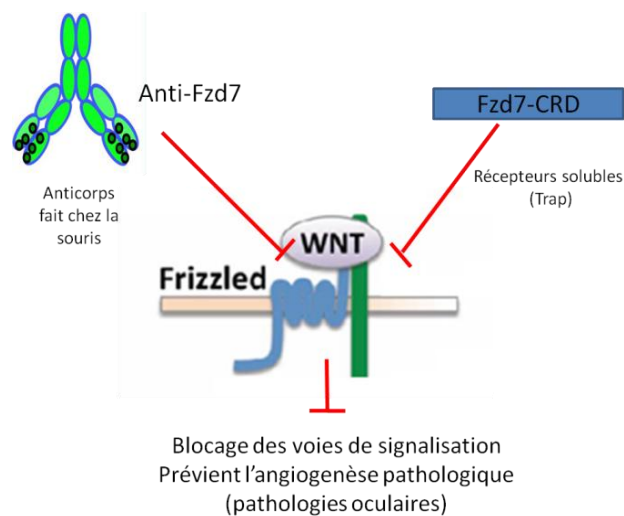


Figure 63: Stratégies d'inhibition de la voie de signalisation induite par Fzd7 pour prévenir l'angiogenèse pathologique.

En pratique, l'anticorps MabFzd7, les immunoglobulines contrôles ou la protéine Fzd7-CRD seront injectés en intravitréen chez des souris contrôles C57BL6/J avant les phases 1 et/ou 2 du modèle OIR. L'analyse du phénotype vasculaire au cours des deux phases permettra de déterminer si l'inhibition de la voie de signalisation de Fzd7 permet de diminuer de manière efficace la néovascularisation pathologique observée dans ce modèle.

Enfin, un criblage et une évaluation de petites molécules pouvant inhiber la signalisation de Fzd7 sera réalisée en collaboration avec l'Université de Bordeaux. Une librairie de petites molécules (Prestwick Chemical Library) contenant 1200 composés chimiques dont la structure est similaire à des molécules approuvées par la FDA (Food and Drug Administration) sera utilisée. Ces petites molécules de la librairie, seront criblées à l'aide d'un test de gène rapporteur de l'activité

dépendante de la β -caténine, dans des cellules endothéliales (HUVEC). Cette étape permettra d'identifier les molécules capables d'inhiber l'activité de transactivation de la β -caténine, après activation avec le ligand Wnt3a, *via* l'utilisation du système rapporteur Super 8X TOP/Flash (Laboratoire Randal T. Moon). Après l'identification des «hits» et la caractérisation de leurs modes d'action, ces molécules seront testées *in vivo*.

Annexes

gène	<i>Mus Musculus</i> : phénotype chez les mutants	<i>Homo Sapiens</i> : phénotype associé
Wnt1	<ul style="list-style-type: none"> -défaut développement du mésencéphale et cervelet -défaut de formation de la crête neurale, diminution des précurseurs neuronaux dorso-latéraux dans le tube neural dans les doubles mutants délétés aussi pour Wnt-3A -diminution du nombre de thymocytes avec la délétion de Wnt-4 	-Ostéogenèse imparfaite
Wnt2	<ul style="list-style-type: none"> -défauts de placentation -défaut de développement des poumons avec la délétion de Wnt2b 	
Wnt2b/13	<ul style="list-style-type: none"> -surexpression inhibe la différenciation des cellules de la rétine -défaut de développement des poumons avec la délétion de Wnt2 	
Wnt3	<ul style="list-style-type: none"> -défaut précoce de la gastrulation; formation de l'axe -défaut de croissance des poils -défaut de formation des membres -topographie retinotectale médio-latérale -régule neurogenèse hippocampique 	-Tetra-Amelia
Wnt3a	<ul style="list-style-type: none"> -somitogenèse et bourgeon caudal perturbés -défaut de formation de la crête neurale, diminution des précurseurs neuronaux dorso-latéraux dans le tube neural dans les doubles mutants délétés aussi pour Wnt-1 -défaut de développement de l'hippocampe -asymétrie droite-gauche -défaut d'auto-renouvellement des cellules souches hématopoïétiques 	
Wnt4	<ul style="list-style-type: none"> -défauts de formation des reins et l'induction de la vésicule rénale -détermination du sexe: défaut de développement du tractus reproducteur femelle, absence des canaux de Müller, testostérone ectopique synthétisée chez la femelle -défaut de ramification dans les glandes mammaires -diminue le nombre de thymocytes avec la délétion de Wnt-1 -répression migration des précurseurs stéroïdogènes des surrénales dans les gonades 	<ul style="list-style-type: none"> -virilisation et régression des canaux de Müller -syndrome de SERKAL

	-anomalie de guidance axonale	
Wnt5a	<ul style="list-style-type: none"> -défaut de croissance des membres (tronqués), axis antéro-postérieur tronqué, diminution de la prolifération des cellules -défaut de morphogenèse distale des poumons -différentiation des chondrocytes, croissance longitudinale du squelette -inhibe la prolifération des cellules B, suppresseur de tumeurs -défaut formation tractus reproducteur femelle -cochlée raccourcie et élargie (polarité planaire) -développement des glandes mammaires -développement de la prostate -élongation de l'intestin -endothelial differentiation of ES cells 	
Wnt5b		-associé à des susceptibilités au diabète de type2
Wnt6	-prolifération des cellules stromales chez l'embryon	
Wnt7a	<ul style="list-style-type: none"> -défaut de polarité du membre -infertilité chez la femelle; défaut de régression des canaux de Müller -défauts formation du tractus reproducteur femelle -défaut maturation des synapses dans le cervelet -favorise la différenciation neuronale -vascularisation système nerveux central avec Wnt7b 	-syndrome de Fuhrmann
Wnt7b	<ul style="list-style-type: none"> -défauts développement placentaire -problèmes respiratoires, défaut de prolifération précoce du mésenchyme, hypoplasie pulmonaire -mort cellulaire programmée induite par macrophage (aussi dans les mutants LRP5 et LEF1) -développement du poumon -vascularisation système nerveux central avec Wnt7a -axe cortico-médullaire du rein 	
Wnt8a		

Wnt8b	-mutant perte de fonction: pas d'effet sur le développement neuronal mais changements d'expression génique	
Wnt9a	-mutant perte de fonction: intégrité des articulations	
Wnt9b	-régulation transition mésenchymale/épithéliale -induction vésicule rénale -polarité cellulaire planaire de l'épithélium rénale	
Wnt10a		-Dysplasie odonto-onycho-cutanée
Wnt10b	-mutant perte de fonction: diminution os trabéculaire, diminution masse osseuse -développement papilles gustatives -mutant perte de fonction: co-expression des programmes myogénique et adipogénique -mutant surexpression: inhibe adipogénèse	-Mutations chez patients obèses -Malformation, dédoublement main/pied
Wnt11	-défaut branchement uretères rénaux -cardiogenèse	
Wnt16	-phénotype touchant la densité osseuse	-Densité osseuse

Tableau 3 : Nomenclature des gènes Wnt chez la souris et chez l'homme et phénotypes associés.
Pour l'humain (Homo sapiens), le phénotype associé correspond à des mutations des gènes Wnt observées chez certains patients. Pour la souris (Mus musculus), le phénotype associé correspond à l'invalidation du gène ou à sa surexpression ectopique.

D'après: <http://web.stanford.edu/group/nusselab/cgi-bin/wnt/mouse> et <http://web.stanford.edu/group/nusselab/cgi-bin/wnt/human>

gène	<i>Mus Musculus</i>: phénotype chez les mutants	<i>Homo Sapiens</i>: phénotype associé
Fzd1		
Fzd2	-défauts de convergence-extension avec mutant Fzd7	
Fzd3	-anomalies des fibres du système nerveux central -guidance antéro-postérieur des axones commissurales -défaut de morphogenèse du cerveau moyen avec mutant Fz6	
Fzd4	-défauts dans l'œsophage, l'audition et le cervelet -empêche la formation du corps lutéal -anomalies de la croissance vasculaire et de l'endothélium - phénotype touchant le rein avec mutant Fzd8	-angiogenèse de la rétine: vitéo-rétinopathie exsudative familiale
Fzd5	-anomalies de l'angiogenèse placentaire et du sac vitellin -phénotype des cellules de Paneth -survie neuronale dans le noyau parafasciculaire -développement des glandes mammaires	
Fzd6	-anomalies polarité tissulaire et système pileux -défaut morphogenèse cerveau moyen avec mutant Fzd3	
Fzd7	-queue tronquée et déformée -défauts de convergence-extension avec mutant Fzd2	-auto-renouvellement des cellules souches hématopoïétiques
Fzd8	-phénotype touchant le rein avec mutant Fz4	
Fzd9	-développement des cellules B -défauts de l'hippocampe et de l'apprentissage visuel et spatial	
Fzd10		

Tableau 4: Nomenclature des gènes Fzd chez la souris et chez l'homme et phénotypes associés. Pour l'humain (*Homo sapiens*), le phénotype associé correspond à des mutations des gènes *Wnt* observées chez certains patients. Pour la souris (*Mus musculus*), le phénotype associé correspond à l'inactivation du gène ou à sa surexpression ectopique.

D'après: http://web.stanford.edu/group/nusselab/cgi-bin/wnt/Frizzled_verttebrate

gène	<i>Mus Musculus</i> : phénotype chez les mutants	<i>Homo Sapiens</i>
Dvl1	-défauts comportementaux et moteurs -ouverture du tube neural avec le double KO Dvl2 -défaut d'extension convergence	
Dvl2	-anomalies cardiaques -ouverture du tube neural avec le double KO Dvl1 -défaut d'extension convergence	
Dvl3	-anomalies cardiaques	

Tableau 5 : Nomenclature des gènes Dvl pour la souris (*Mus musculus*) et phénotypes associés.

Le phénotype associé correspond à l'invalidation du gène.

D'après: <http://web.stanford.edu/group/nusselab/cgi-bin/wnt/dishevelled>

Références bibliographiques

- Abe K, Takeichi M. 2008. EPLIN mediates linkage of the cadherin catenin complex to F-actin and stabilizes the circumferential actin belt. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105: 13-9
- Abhary S, Hewitt AW, Burdon KP, Craig JE. 2009. A systematic meta-analysis of genetic association studies for diabetic retinopathy. *Diabetes* 58: 2137-47
- Abu-Elmagd M, Garcia-Morales C, Wheeler GN. 2006. Frizzled7 mediates canonical Wnt signaling in neural crest induction. *Developmental biology* 298: 285-98
- Adams RH, Alitalo K. 2007. Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nature reviews. Molecular cell biology* 8: 464-78
- Adams RH, Wilkinson GA, Weiss C, Diella F, Gale NW, et al. 1999. Roles of ephrinB ligands and EphB receptors in cardiovascular development: demarcation of arterial/venous domains, vascular morphogenesis, and sprouting angiogenesis. *Genes & development* 13:295–306
- Aicher A, Kollet O, Heeschen C, Liebner S, Urbich C, et al. 2008. The Wnt antagonist Dickkopf-1 mobilizes vasculogenic progenitor cells via activation of the bone marrow endosteal stem cell niche. *Circulation research* 103: 796-803
- Almagro S, Durmort C, Chervin-Petinot A, Heyraud S, Dubois M, et al. 2010. The motor protein myosin-X transports VE-cadherin along filopodia to allow the formation of early endothelial cell-cell contacts. *Molecular and cellular biology* 30: 1703-17
- Andriopoulou P, Navarro P, Zanetti A, Lampugnani MG, Dejana E. 1999. Histamine Induces Tyrosine Phosphorylation of Endothelial Cell-to-Cell Adherens Junctions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 19:2286-2297
- Angelini DJ, Hyun SW, Grigoryev DN, Garg P, Gong P, et al. 2006. TNF-alpha increases tyrosine phosphorylation of vascular endothelial cadherin and opens the paracellular pathway through fyn activation in human lung endothelia. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 291: L1232-45
- Angers S, Moon RT. 2009. Proximal events in Wnt signal transduction. *Nature reviews. Molecular cell biology* 10: 468-77
- Angst BD, and CM, Magee AI. 2001. The cadherin superfamily: diversity in form and function. *Journal of cell science* 114, 629-641
- Anna CH, Iida MI, Sills RC, Devereux TR. 2003. Expression of potential beta-catenin targets, cyclin D1, c-Jun, c-Myc, E-cadherin, and EGFR in chemically induced hepatocellular neoplasms from B6C3F1 mice. *Toxicology and Applied Pharmacology* 190: 135–145
- Aoki M, Mieda M, Ikeda T, Hamada Y, Nakamura H, Okamoto H. 2007. R-spondin3 is required for mouse placental development. *Developmental biology* 301: 218-26
- Armulik A, Genove G, Mae M, Nisancioglu MH, Wallgard E, et al. 2010. Pericytes regulate the blood-brain barrier. *Nature* 468: 557-61
- Bader BL, Rayburn H, Crowley D, O. Hynes RO. 1998. Extensive Vasculogenesis, Angiogenesis and Organogenesis Precede Lethality in Mice Lacking All α Integrins. *Cell* 95: 507-19
- Bakre MM, Hoi A, Mong JC, Koh YY, Wong KY, Stanton LW. 2007. Generation of multipotential mesendodermal progenitors from mouse embryonic stem cells via sustained Wnt pathway activation. *The Journal of biological chemistry* 282: 31703-12

- Balaraman Y, Limaye AR, Levey AI, Srinivasan S. 2006. Glycogen synthase kinase 3beta and Alzheimer's disease: pathophysiological and therapeutic significance. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 63: 1226-35
- Barandon L, Dufourcq P, Costet P, Moreau C, Allieres C, et al. 2005. Involvement of FrzA/sFRP-1 and the Wnt/frizzled pathway in ischemic preconditioning. *Circulation research* 96: 1299-306
- Barber AJ, Gardner TW, Abcouwer SF. 2011. The significance of vascular and neural apoptosis to the pathology of diabetic retinopathy. *Investigative ophthalmology & visual science* 52: 1156-63
- Batlle E, Henderson JT, Beghtel H, van den Born MMW, Sancho E, et al. 2002. Beta-Catenin and TCF Mediate Cell Positioning in the Intestinal Epithelium by Controlling the Expression of EphB/EphrinB. *Cell, Vol.* 111, 251–263
- Baumeister U, Funke R, Ebnet K, Vorschmitt H, Koch S, Vestweber D. 2005. Association of Csk to VE-cadherin and inhibition of cell proliferation. *The EMBO Journal* 24, 1686–1695
- Bayless KJ, Salazar R, Davis GE. 2000. RGD-Dependent Vacuolation and Lumen Formation Observed during Endothelial Cell Morphogenesis in Three-Dimensional Fibrin Matrices Involves the α v β 3 and α 5 β 1 Integrins. *American Journal of Pathology* 156 (5)
- Belperio JA, Keane MP, Ehlert JE, Arenberg DA, Addison CL, et al. 2000. CXC chemokines in angiogenesis. *Journal of Leukocyte Biology* 68
- Benedito R, Roca C, Sorensen I, Adams S, Gossler A, et al. 2009. The notch ligands Dll4 and Jagged1 have opposing effects on angiogenesis. *Cell* 137: 1124-35
- Benedito R, Trindade A, Hirashima M, Henrique D, da Costa LL, et al. 2008. Loss of Notch signalling induced by Dll4 causes arterial calibre reduction by increasing endothelial cell response to angiogenic stimuli. *BMC developmental biology* 8: 117
- Bengochea A, de Souza MM, Lefrancois L, Le Roux E, Galy O, et al. 2008. Common dysregulation of Wnt/Frizzled receptor elements in human hepatocellular carcinoma. *British journal of cancer* 99: 143-50
- Benjamin LE, Hemo I, Keshet E. 1998. A plasticity window for blood vessel remodelling is defined by pericyte coverage of the preformed endothelial network and is regulated by PDGF-B and VEGF. *Development* 125: 1591-98
- Betsholtz C LP, Gerhardt H. 2005. Role of pericytes in vascular morphogenesis. *Experientia Supplementum* (94):115-25
- Blankestijn W, Essers-Janssen Y, Verluyten M, Daemen M, JF. S. 1997. A homologue of Drosophila tissue polarity gene frizzled is expressed in migrating myofibroblasts in the infarcted rat heart. *Nat Med.* 3(5):541-4
- Boland GM, Perkins G, Hall DJ, Tuan RS. 2004. Wnt 3a promotes proliferation and suppresses osteogenic differentiation of adult human mesenchymal stem cells. *Journal of cellular biochemistry* 93: 1210-30
- Borello B, Buffa V, Sonnino C, Mechlionna R, Vivarelli E, Cossu G. 1999. Differential expression of the Wnt putative receptor Frizzled during mouse somatogenesis. *Mechanisms of Development* 89:173-177
- Bovolenta P, Esteve P, Ruiz JM, Cisneros E, Lopez-Rios J. 2008. Beyond Wnt inhibition: new functions of secreted Frizzled-related proteins in development and disease. *Journal of cell science* 121: 737-46
- Boyden LM, Mao J, Belsky J, Mitzner L, Farhi A, et al. 2002. High Bone Density due to a Mutation in LDL-Receptor-Related Protein 5. *The New England journal of medicine* 346, 20

- Brabletz T, Jung A, Dag S, Hlubek F, Kirchner T. 1999. Beta-Catenin Regulates the Expression of the Matrix Metalloproteinase-7 in Human Colorectal Cancer. *American Journal of Pathology* 155,4
- Bravi L, Dejana E, Lampugnani MG. 2014. VE-cadherin at a glance. *Cell and tissue research* 355: 515-22
- Breviario F, Caveda L, Corada M, Martin-Padura I, Navarro P, et al. 1995. Functional properties of human vascular endothelial cadherin (7B4/cadherin-5), an endothelium-specific cadherin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 15(8):1229-39
- Cadigan KM, Nusse R. 1997. Wnt signaling: a common theme in animal development. *Genes & development* 11: 3286-305
- Canalis E, Giustina A, Bilezikian JP. 2007. Mechanisms of Anabolic Therapies for Osteoporosis. *The New England journal of medicine* 357:905-16
- Carlson TR, Yan Y, Wu X, Lam MT, Tang GL, et al. 2005. Endothelial expression of constitutively active Notch4 elicits reversible arteriovenous malformations in adult mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102: 9884-9
- Carmeliet P. 2000. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nature Medecine* 06: 689-95
- Carmeliet P, De Smet F, Loges S, Mazzone M. 2009. Branching morphogenesis and antiangiogenesis candidates: tip cells lead the way. *Nature reviews. Clinical oncology* 6: 315-26
- Carmeliet P, Lampugnani MG, Moons L, Breviario F, Compernelle V, et al. 1999. Targeted Deficiency or Cytosolic Truncation of the VE-cadherin Gene in Mice Impairs VEGF-Mediated Endothelial Survival and Angiogenesis. *Cell* 98, 147–157
- Carmeliet P, Tessier-Lavigne M. 2005. Common mechanisms of nerve and blood vessel wiring. *Nature* 436: 193-200
- Carron C, Pascal A, Djiane A, Boucaut JC, Shi DL, Umbhauer M. 2003. Frizzled receptor dimerization is sufficient to activate the Wnt/ β -catenin pathway. *Journal of cell science* 116:2541-2550
- Cattelino A, Liebner S, Gallini R, Zanetti A, Balconi G, et al. 2003. The conditional inactivation of the beta-catenin gene in endothelial cells causes a defective vascular pattern and increased vascular fragility. *The Journal of cell biology* 162: 1111-22
- Chan-Ling T, McLeod DS, Hughes S, Baxter L, Chu Y, et al. 2004. Astrocyte–Endothelial Cell Relationships during Human Retinal Vascular Development. *Investigative ophthalmology & visual science* 45 (06): 2020-31
- Chang B, Smith RS, Peters M, Savinova OV, Hawes NL, et al. 2001. Haploinsufficient Bmp4 ocular phenotypes include anterior segment dysgenesis with elevated intraocular pressure. *BMC Genetics* 2:18
- Checchin D, Sennlaub F, Levavasseur E, Leduc M, Chemtob S. 2006. Potential role of microglia in retinal blood vessel formation. *Investigative ophthalmology & visual science* 47: 3595-602
- Chen C, Strapps W, A. T, G. S. 2004. Evidence that the cysteine-rich domain of Drosophila Frizzled family receptors is dispensable for transducing Wingless. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 15961-6
- Chen J, Somanath PR, Razorenova O, Chen WS, Hay N, et al. 2005. Akt1 regulates pathological angiogenesis, vascular maturation and permeability in vivo. *Nat Med* 11(11): 1188–96
- Chen J, Stahl A, Krah NM, Seaward MR, Dennison RJ, et al. 2011. Wnt signaling mediates pathological vascular growth in proliferative retinopathy. *Circulation* 124: 1871-81

- Chen J, Stahl A, Krah NM, Seaward MR, Joyal JS, et al. 2012. Retinal Expression of Wnt-Pathway Mediated Genes in Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 5 (Lrp5) Knockout Mice. *PLoS ONE* 7(1): e30203
- Chen Y, Hu Y, Lu K, Flannery JG, Ma JX. 2007. Very low density lipoprotein receptor, a negative regulator of the wnt signaling pathway and choroidal neovascularization. *The Journal of biological chemistry* 282: 34420-8
- Chen Y, Hu Y, Zhou T, Zhou KK, Mott R, et al. 2009. Activation of the Wnt pathway plays a pathogenic role in diabetic retinopathy in humans and animal models. *The American journal of pathology* 175: 2676-85
- Cheng CW, Yeh JC, Fan TP, Smith SK, Charnock-Jones DS. 2008. Wnt5a-mediated non-canonical Wnt signalling regulates human endothelial cell proliferation and migration. *Biochem Biophys Res Commun* 365: 285-90
- Chervin-Petinot A, Courcon M, Almagro S, Nicolas A, Grichine A, et al. 2012. Epithelial protein lost in neoplasm (EPLIN) interacts with alpha-catenin and actin filaments in endothelial cells and stabilizes vascular capillary network in vitro. *The Journal of biological chemistry* 287: 7556-72
- Cheung N, Mitchell P, Wong TY. 2010. Diabetic retinopathy. *Lancet* 376: 124–36
- Cheung N, Wong IY, Wong TY. 2014. Ocular anti-VEGF therapy for diabetic retinopathy: overview of clinical efficacy and evolving applications. *Diabetes care* 37: 900-5
- Claxton S, Fruttiger M. 2004. Periodic Delta-like 4 expression in developing retinal arteries. *Gene expression patterns : GEP* 5: 123-7
- Claxton S, Kostourou V, Jadeja E, Chambon P, Hodivala-Dilke K, Fruttiger M. 2008. Efficient, inducible Cre-recombinase activation in vascular endothelium. *Genesis*. 46(2):74-80
- Clevers H, Nusse R. 2012. Wnt/beta-catenin signaling and disease. *Cell* 149: 1192-205
- Cliffe A, Hamada F, Bienz M. 2003. A Role of Dishevelled in Relocating Axin to the Plasma Membrane during Wingless Signaling. *Current Biology* 13, 960–966
- Colaiani G, Brunetti G, Faienza MF, Colucci S, Grano M. 2014. Osteoporosis and obesity: Role of Wnt pathway in human and murine models. *World journal of orthopedics* 5: 242-6
- Cong F, Schweizer L, Varmus H. 2004. Wnt signals across the plasma membrane to activate the beta-catenin pathway by forming oligomers containing its receptors, Frizzled and LRP. *Development* 131: 5103-15
- Connor KM, Krah NM, Dennison RJ, Aderman CM, Chen J, et al. 2009. Quantification of oxygen-induced retinopathy in the mouse: a model of vessel loss, vessel regrowth and pathological angiogenesis. *Nature protocols* 4: 1565-73
- Corada M, Mariotti M, Thurston G, Smith K, Kunkel R, et al. 1999. Vascular endothelial–cadherin is an important determinant of microvascular integrity in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 9815–9820
- Corada M, Nyqvist D, Orsenigo F, Caprini A, Giampietro C, et al. 2010. The Wnt/beta-catenin pathway modulates vascular remodeling and specification by upregulating Dll4/Notch signaling. *Developmental cell* 18: 938-49
- Corada M, Orsenigo F, Morini MF, Pitulescu ME, Bhat G, et al. 2013. Sox17 is indispensable for acquisition and maintenance of arterial identity. *Nature communications* 4: 2609
- Corada M, Zanetta L, Orsenigo F, Breviario F, Lampugnani MG, et al. 2002. A monoclonal antibody to vascular endothelial–cadherin inhibits tumor angiogenesis without side effects on endothelial permeability. *Blood* 100: 905-911

- Cougnard-Gregoire A, Delyfer MN, Korobelnik JF, Rougier MB, Malet F, et al. 2013. Long-term blood pressure and age-related macular degeneration: the ALIENOR study. *Investigative ophthalmology & visual science* 54: 1905-12
- Cross JC, Nakano H, Natale DR, Simmons DG, Watson ED. 2006. Branching morphogenesis during development of placental villi. *Differentiation; research in biological diversity* 74: 393-401
- Curtis TM, Gardiner TA, Stitt AW. 2009. Microvascular lesions of diabetic retinopathy: clues towards understanding pathogenesis? *Eye* 23: 1496-508
- Dahmen RP, Koch A, Denkhaus D, Tonn JC, Sørensen N, et al. 2001. Deletions of AXIN1, a Component of the WNT/wingless Pathway, in Sporadic Medulloblastomas. *Cancer research* 61:7039-7043
- Daneman R, Agalliu D, Zhou L, Kuhnert F, Kuoc CJ, Barres BA. 2009. Wnt/ beta-catenin signaling is required for CNS, but not non-CNS, angiogenesis. *PNAS* 106 (2):641–643
- Dann CE, Hsieh JC, Rattner A, Sharma D, Nathans J, Leahy DJ. 2001. Insights into Wnt binding and signalling from the structures of two Frizzled cysteine-rich domains *Nature* 412
- Davis GE, Bayless KJ, Mavila A. 2002. Molecular basis of endothelial cell morphogenesis in three-dimensional extracellular matrices. *The Anatomical record* 268: 252-75
- De Calisto J, Araya C, Marchant L, Riaz CF, Mayor R. 2005. Essential role of non-canonical Wnt signalling in neural crest migration. *Development* 132: 2587-97
- De Smet F, Segura I, De Bock K, Hohensinner PJ, Carmeliet P. 2009. Mechanisms of vessel branching: filopodia on endothelial tip cells lead the way. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 29: 639-49
- Dejana E. 2010. The role of wnt signaling in physiological and pathological angiogenesis. *Circulation research* 107: 943-52
- Dejana E, Giampietro C. 2012. Vascular endothelial-cadherin and vascular stability. *Current opinion in hematology* 19: 218-23
- Dejana E, Orsenigo F, Lampugnani MG. 2008. The role of adherens junctions and VE-cadherin in the control of vascular permeability. *Journal of cell science* 121: 2115-22
- Dejana E, Tournier-Lasserre E, Weinstein BM. 2009. The control of vascular integrity by endothelial cell junctions: molecular basis and pathological implications. *Developmental cell* 16: 209-21
- Descamps B, Sewduth R, Ferreira Tojais N, Jaspard B, Reynaud A, et al. 2012. Frizzled 4 regulates arterial network organization through noncanonical Wnt/planar cell polarity signaling. *Circulation research* 110: 47-58
- Diez-Roux G, Lang RA. 1997. Macrophages induce apoptosis in normal cells in vivo. *Development* 124: 3633-38
- Dissanayake SK, Wade M, Johnson CE, O'Connell MP, Leotlela PD, et al. 2007. The Wnt5A/protein kinase C pathway mediates motility in melanoma cells via the inhibition of metastasis suppressors and initiation of an epithelial to mesenchymal transition. *The Journal of biological chemistry* 282: 17259-71
- Djiane A, Riou JF, Umbhauer M, Boucaut JC, Shi DL. 2000. Role of *frizzled7* in the regulation of convergent extension movements during gastrulation in *Xenopus laevis*. *Development* 127: 3091-100
- Du SJ, Purcell SM, Christian JL, McGrew LL, Moon RT. 1995. Identification of distinct classes and functional domains of Wnts through expression of wild-type and chimeric proteins in *Xenopus* embryos. *Mol. Cell. Biol.* 15(5):2625

- Dufourcq P, Couffinhal T, Ezan J, Barandon L, Moreau C, et al. 2002. FrzA, a Secreted Frizzled Related Protein, Induced Angiogenic Response. *Circulation* 106: 3097-103
- Dufourcq P, Descamps B, Tojais NF, Leroux L, Oses P, et al. 2008a. Secreted frizzled-related protein-1 enhances mesenchymal stem cell function in angiogenesis and contributes to neovessel maturation. *Stem cells* 26: 2991-3001
- Dufourcq P, Leroux L, Ezan J, Descamps B, Lamaziere JM, et al. 2008b. Regulation of endothelial cell cytoskeletal reorganization by a secreted frizzled-related protein-1 and frizzled 4- and frizzled 7-dependent pathway: role in neovessel formation. *The American journal of pathology* 172: 37-49
- Edwards AO, Ritter R, 3rd, Abel KJ, Manning A, Panhuysen C, Farrer LA. 2005. Complement factor H polymorphism and age-related macular degeneration. *Science* 308: 421-4
- Eichmann A, Makinen T, Alitalo K. 2005. Neural guidance molecules regulate vascular remodeling and vessel navigation. *Genes & development* 19: 1013-21
- Eisenberg LM, Eisenberg CA. 2006. Wnt signal transduction and the formation of the myocardium. *Developmental biology* 293: 305-15
- El-Messaoudi S, Renucci A. 2001. Expression pattern of the frizzled 7 gene during zebrafish embryonic development. *Mechanisms of development* 102: 231-34
- Eliceiri BP, Cheresh DA. 1999. The role of alphav integrins during angiogenesis: insights into potential mechanisms of action and clinical development. *The Journal of clinical investigation* 103: 1227-30
- Eliceiri BP, Paul R, Schwartzberg PL, Hood JD, Leng J, Cheresh DA. 1999. Selective Requirement for Src Kinases during VEGF-Induced Angiogenesis and Vascular Permeability. *Molecular Cell* 4: 915-24
- Erskine L, Williams SE, Brose K, Kidd T, Rachel RA, et al. 2000. Retinal Ganglion Cell Axon Guidance in the Mouse Optic Chiasm: Expression and Function of Robos and Slits. *The Journal of Neuroscience* 20(13):4975-4982
- Esser S, Lampugnani MG, Corada M, Dejana E, Risau W. 1998. Vascular endothelial growth factor induces VE-cadherin tyrosine phosphorylation in endothelial cells. *Journal of cell science* 111, 1853-1865
- Ezan J, Leroux L, Barandon L, Dufourcq P, Jaspard B, et al. 2004. FrzA/sFRP-1, a secreted antagonist of the Wnt-Frizzled pathway, controls vascular cell proliferation in vitro and in vivo. *Cardiovascular research* 63: 731-8
- Fantin A, Vieira JM, Gestri G, Denti L, Schwarz Q, et al. 2010. Tissue macrophages act as cellular chaperones for vascular anastomosis downstream of VEGF-mediated endothelial tip cell induction. *Blood* 116: 829-40
- Fanto M, McNeill H. 2004. Planar polarity from flies to vertebrates. *Journal of cell science* 117, 527-533
- Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. 2003. The biology of VEGF and its receptors. *Nature Medicine* 06: 669-76
- Ferreira Tojais N, Peghaire C, Franzl N, Larrieu-Lahargue F, Jaspard B, et al. 2014. Frizzled7 controls vascular permeability through the Wnt-canonical pathway and cross-talk with endothelial cell junction complexes. *Cardiovascular research*
- Filali M, Cheng N, Abbott D, Leontiev V, Engelhardt JF. 2002. Wnt-3A/beta-catenin signaling induces transcription from the LEF-1 promoter. *The Journal of biological chemistry* 277: 33398-410

- Florian MC, Nattamai KJ, Dorr K, Marka G, Uberle B, et al. 2013. A canonical to non-canonical Wnt signalling switch in haematopoietic stem-cell ageing. *Nature* 503: 392-6
- Flower RW, McLeod DS, Luty GA, Goldberg B, S.D. W. 1985. Postnatal Retinal Vascular Development of the Puppy. *Investigate Ophthalmology & Visual Science* 26: 957-68
- Franco CA, Liebner S, Gerhardt H. 2009. Vascular morphogenesis: a Wnt for every vessel? *Current opinion in genetics & development* 19: 476-83
- Fredriksson R, Lagerström MC, Lundin LG, Schiöth HB. 2003. The G-Protein-Coupled Receptors in the Human Genome Form Five Main Families. Phylogenetic Analysis, Paralogon Groups, and Fingerprints. *Mol Pharmacol* 63:1256–1272
- Fruttiger M. 2002. Development of the Mouse Retinal Vasculature: Angiogenesis Versus Vasculogenesis. *Development* 43: 522-27
- Fruttiger M. 2007. Development of the retinal vasculature. *Angiogenesis* 10: 77-88
- Fujii N, You L, Xu Z, Uematsu K, Shan J, et al. 2007. An antagonist of dishevelled protein-protein interaction suppresses beta-catenin-dependent tumor cell growth. *Cancer research* 67: 573-9
- Galceran J, Fariñas I, Depew MJ, Clevers H, Grosschedl R. 1999. Wnt3a-/- -like phenotype and limb deficiency in Lef1-/-Tcf1-/- mice. *Genes Dev.* 13: 709-717
- Gale NW, Yancopoulos GD. 1999. Growth factors acting via endothelial cell-specific receptor tyrosine kinases: VEGFs, Angiopoietins, and ephrins in vascular development. *Genes & development* 13: 1055-66
- Gamble JR, Drew J, Trezise L, Underwood A, Parsons M, et al. 2000. Angiopoietin-1 Is an Antipermeability and Anti-Inflammatory Agent In Vitro and Targets Cell Junctions. *Circulation research* 87: 603-07
- Gao C, Chen YG. 2010. Dishevelled: The hub of Wnt signaling. *Cell Signal* 22: 717-27
- Gavard J, Gutkind JS. 2006. VEGF controls endothelial-cell permeability by promoting the beta-arrestin-dependent endocytosis of VE-cadherin. *Nature cell biology* 8: 1223-34
- Gendron RL, Adams LC, Paradis H. 2000. Tubedown-1, A Novel Acetyltransferase Associated With Blood Vessel Development. *Developmental Dynamics* 218: 300–15
- Gerhardt H, Golding M, Fruttiger M, Ruhrberg C, Lundkvist A, et al. 2003. VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *The Journal of cell biology* 161: 1163-77
- Gessert S, Kuhl M. 2010. The multiple phases and faces of wnt signaling during cardiac differentiation and development. *Circulation research* 107: 186-99
- Geudens I, Gerhardt H. 2011. Coordinating cell behaviour during blood vessel formation. *Development* 138: 4569-83
- Giannotta M, Trani M, Dejana E. 2013. VE-cadherin and endothelial adherens junctions: active guardians of vascular integrity. *Developmental cell* 26: 441-54
- Good WV, Gendron RL. 2005. Retinopathy of prematurity: gone today, here tomorrow? *Clinical and Experimental Ophthalmology* 33: 339–340
- Goodwin AM, Sullivan KM, D'Amore PA. 2006. Cultured endothelial cells display endogenous activation of the canonical Wnt signaling pathway and express multiple ligands, receptors, and secreted modulators of Wnt signaling. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 235: 3110-20
- Gory-Fauré S, Prandini MH, Pointu H, Roullot V, Pignot-Paintrand I, et al. 1999. Role of vascular endothelial-cadherin in vascular morphogenesis. *Development* 126, 2093-2102

- Grandy D, Shan J, Zhang X, Rao S, Akunuru S, et al. 2009. Discovery and characterization of a small molecule inhibitor of the PDZ domain of dishevelled. *The Journal of biological chemistry* 284: 16256-63
- Gregorieff A, Pinto D, Beghtel H, Destrée O, Kielman M, Clevers H. 2005. Expression Pattern of Wnt Signaling Components in the Adult Intestine. *Gastroenterology* 129:626–638
- Gulino D, Delachanal E, Concord E, Genoux Y, Morand B, et al. 1998. Cell biology and metabolism: Alteration of Endothelial Cell Monolayer Integrity Triggers Resynthesis of Vascular Endothelium Cadherin. *J. Biol. Chem.* 273:29786-29793
- Gumbiner BM. 2005. Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis. *Nature reviews. Molecular cell biology* 6: 622-34
- Guo DQ, Wu LW, Dunbar JD, Nidai Ozes O, Mayo LD, et al. 2000. Mechanisms of Signal Transduction:Tumor Necrosis Factor Employs a Protein-tyrosine Phosphatase to Inhibit Activation of KDR and Vascular Endothelial Cell Growth Factor-induced Endothelial Cell Proliferation. *J. Biol. Chem* 275: 11216-21
- Guo N, Hawkins C, Nathans J. 2004. Frizzled6 controls hair patterning in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 9277-81
- Habas R, Dawid IB, He X. 2003. Coactivation of Rac and Rho by Wnt/Frizzled signaling is required for vertebrate gastrulation. *Genes & development* 17: 295-309
- Habas R, Kato Y, He X. 2001. Wnt/Frizzled Activation of Rho Regulates Vertebrate Gastrulation and Requires a Novel Formin Homology Protein Daam1. *Cell* 107, 843–854
- Hackett SF, Ozaki H, Strauss RW, Wahlin K, Suri S, et al. 2000. Angiopoietin 2 Expression in the Retina: Upregulation During Physiologic and Pathologic Neovascularization. *Journal of cellular physiology* 184:275–284
- Hackett SF, Wiegand S, Yancopoulos G, Campochiaro PA. 2002. Angiopoietin-2 plays an important role in retinal angiogenesis. *Journal of cellular physiology* 192: 182-7
- Hartnett ME, Penn JS. 2012. Mechanisms and management of retinopathy of prematurity. *The New England journal of medicine* 367: 2515-26
- Hauspurg AK, Allred EN, Vanderveen DK, Chen M, Bednarek FJ, et al. 2011. Blood gases and retinopathy of prematurity: the ELGAN Study. *Neonatology* 99: 104-11
- Hayward P, Kalmar T, Arias AM. 2008. Wnt/Notch signalling and information processing during development. *Development* 135: 411-24
- He TC, Sparks AB, Rago C, Hermeking H, Zawel L, et al. 1998. Identification of c-MYC as a Target of the APC Pathway. *Science* 281, 1509
- He XC, Zhang J, Tong WG, Tawfik O, Ross J, et al. 2004. BMP signaling inhibits intestinal stem cell self-renewal through suppression of Wnt-beta-catenin signaling. *Nature genetics* 36: 1117-21
- Hellström M, Kalén M, Lindahl P, Abramsson A, Betsholtz C. 1999. Role of PDGF-B and PDGFR- β in recruitment of vascular smooth muscle cells and pericytes during embryonic blood vessel formation in the mouse. *Development* 126: 3047-55
- Hellstrom M, Phng LK, Hofmann JJ, Wallgard E, Coultas L, et al. 2007. Dll4 signalling through Notch1 regulates formation of tip cells during angiogenesis. *Nature* 445: 776-80
- Henry Ho HY, Susman MW, Bikoff JB, Ryu YK, Jonas AM, et al. 2012. Wnt5a–Ror–Dishevelled signaling constitutes a core developmental pathway that controls tissue morphogenesis. *PNAS* 109 (11)

- Herz J, Bock HH. 2002. Lipoprotein receptors in the nervous system. *Annual review of biochemistry* 71: 405-34
- Heuberger J, Birchmeier W. 2010. Interplay of cadherin-mediated cell adhesion and canonical Wnt signaling. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2: a002915
- Hinoi T, Yamamoto H, Kishida M, Takada S, Kishida S, Kikuchi A. 2000. Complex formation of adenomatous polyposis coli gene product and axin facilitates glycogen synthase kinase-3 beta-dependent phosphorylation of beta-catenin and down-regulates beta-catenin. *The Journal of biological chemistry* 275: 34399-406
- Hirschi KK, Rohovsky SA, Beck LH, Smith SR, D'Amore PA. 1999. Endothelial Cells Modulate the Proliferation of Mural Cell Precursors via Platelet-Derived Growth Factor-BB and Heterotypic Cell Contact. *Circulation research* 84: 298-305
- Hoch RV, Soriano P. 2003. Roles of PDGF in animal development. *Development* 130: 4769-84
- Holz FG, Schmitz-Valckenberg S, Fleckenstein M. 2014. Recent developments in the treatment of age-related macular degeneration. *The Journal of clinical investigation* 124: 1430-8
- Hsieh JC. 2004. Specificity of WNT-receptor interactions. *Front Biosci.* 1;9:1333-8
- Htun van der Horst E, Frank BT, Chinn L, Coxon A, Li S, et al. 2008. The Growth Factor Midkine Antagonizes VEGF Signaling In Vitro and In Vivo. *Neoplasia* 10 (04): 340-46
- Hu J, Blair MP, Shapiro MJ, Lichtenstein SJ, Galasso JM, Kapur R. 2012. Reactivation of retinopathy of prematurity after bevacizumab injection. *Archives of ophthalmology* 130: 1000-6
- Hu J, Dong A, Fernandez-Ruiz V, Shan J, Kawa M, et al. 2009. Blockade of Wnt signaling inhibits angiogenesis and tumor growth in hepatocellular carcinoma. *Cancer research* 69: 6951-9
- Hu Y, Chen Y, Lin M, Lee K, Mott RA, Ma JX. 2013. Pathogenic role of the Wnt signaling pathway activation in laser-induced choroidal neovascularization. *Investigative ophthalmology & visual science* 54: 141-54
- Huelsken J, Birchmeier W. 2001. New aspects of Wnt signaling pathways in higher vertebrates. *Current opinion in genetics & development* 11:547-553
- Hughes S, Yang H, Chan-Ling T. 2000. Vascularization of the Human Fetal Retina: Roles of Vasculogenesis and Angiogenesis. *Investigative ophthalmology & visual science* 41 (5): 1217-28
- Ikeya M, Lee SMK, Johnson JE, McMahon AP, Takada S. 1997. Wnt signalling required for expansion of neural crest and CNS progenitors. *Nature* 389
- Ilan N, Mahooti S, Rimm DL, Madri JA. 1999. PECAM-1 (CD31) functions as a reservoir for and a modulator of tyrosine-phosphorylated β -catenin. *Journal of cell science* 112: 3005_14
- Ishida S, Yamashiro K, Usui T, Kaji Y, Ogura Y, et al. 2003. Leukocytes mediate retinal vascular remodeling during development and vaso-obliteration in disease. *Nature Medicine* 09 (6): 781-88
- Ishikawa TO, Tamai Y, Zorn AM, Yoshida H, Seldin MF, et al. 2001. Mouse Wnt receptor gene angiogenesis is essential for yolk sac and placental. *Development* 128, 25-33
- Ittiara S, Blair MP, Shapiro MJ, Lichtenstein SJ. 2013. Exudative retinopathy and detachment: a late reactivation of retinopathy of prematurity after intravitreal bevacizumab. *Journal of AAPOS : the official publication of the American Association for Pediatric Ophthalmology and Strabismus / American Association for Pediatric Ophthalmology and Strabismus* 17: 323-5
- Jakobsson L, Bentley K, Gerhardt H. 2009. VEGFRs and Notch: a dynamic collaboration in vascular patterning. *Biochemical Society transactions* 37: 1233-6

- Jakobsson L, Domogatskaya A, Tryggvason K, Edgar D, Claesson-Welsh L. 2008. Laminin deposition is dispensable for vasculogenesis but regulates blood vessel diameter independent of flow. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 22: 1530-9
- Jakobsson L, Franco CA, Bentley K, Collins RT, Ponsioen B, et al. 2010. Endothelial cells dynamically compete for the tip cell position during angiogenic sprouting. *Nature cell biology* 12: 943-53
- James AC, Szot JO, Iyer K, Major JA, Pursglove SE, et al. 2014. Notch4 reveals a novel mechanism regulating Notch signal transduction. *Biochimica et biophysica acta* 1843: 1272-84
- Jho EH, Zhang T, Domon C, Joo CK, Freund JN, Costantin F. 2002. Wnt/ β -Catenin/Tcf Signaling Induces the Transcription of Axin2, a Negative Regulator of the Signaling Pathway. *Mol. Cell. Biol.* 22(4):1172
- Jiang M, Ku WY, Fu J, Offermanns S, Hsu W, Que J. 2013. Gpr177 regulates pulmonary vasculature development. *Development* 140, 4117
- Jin SW, Patterson C. 2009. The opening act: vasculogenesis and the origins of circulation. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 29: 623-9
- Jordan BK, Mohammed M, Ching ST, Delot E, Chen XN, et al. 2001. Up-regulation of WNT-4 signaling and dosage-sensitive sex reversal in humans. *American journal of human genetics* 68: 1102-9
- Ju R, Cirone P, Lin S, Griesbach H, Slusarski DC, Crews CM. 2010. Activation of the planar cell polarity formin DAAM1 leads to inhibition of endothelial cell proliferation, migration, and angiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107: 6906-11
- Junge HJ, Yang S, Burton JB, Paes K, Shu X, et al. 2009. TSPAN12 regulates retinal vascular development by promoting Norrin- but not Wnt-induced FZD4/ β -catenin signaling. *Cell* 139: 299-311
- Kahn M. 2014. Can we safely target the WNT pathway? *Nature reviews. Drug discovery* 13: 513-32
- Kam Y, Quaranta V. 2009. Cadherin-Bound β -Catenin Feeds into the Wnt Pathway upon Adherens Junctions Dissociation: Evidence for an Intersection between β -Catenin Pools. *PLoS ONE* 4(2): e4580
- Kato M, Patel MS, Levasseur R, Lobov I, Chang BH, et al. 2002. Cbfa1-independent decrease in osteoblast proliferation, osteopenia, and persistent embryonic eye vascularization in mice deficient in Lrp5, a Wnt coreceptor. *The Journal of cell biology* 157: 303-14
- Katoh M, Katoh M. 2007a. Comparative integromics on FZD7 orthologs: conserved binding sites for PU.1, SP1, CCAAT-box and TCF/LEF/SOX transcription factors within 5'-promoter region of mammalian FZD7 orthologs. *Int J Mol Med.* 19(3):529-33
- Katoh M, Katoh M. 2007b. WNT signaling pathway and stem cell signaling network. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 13: 4042-5
- Kazanskaya O, Glinka A, del Barco Barrantes I, Stannek P, Niehrs C, Wu W. 2004. R-Spondin2 is a secreted activator of Wnt/ β -catenin signaling and is required for *Xenopus* myogenesis. *Developmental cell* 7: 525-34
- Kelly OG, Pinson KI, Skarnes WC. 2004. The Wnt co-receptors Lrp5 and Lrp6 are essential for gastrulation in mice. *Development* 131: 2803-15
- Kemp CR, Willems E, Wawrzak D, Hendrickx M, Agbor Agbor T, Leyns L. 2007. Expression of Frizzled5, Frizzled7, and Frizzled10 during early mouse development and interactions with canonical

- Wnt signaling. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 236: 2011-9
- Kertesz N, Krasnoperov V, Reddy R, Leshanski L, Kumar SR, et al. 2006. The soluble extracellular domain of EphB4 (sEphB4) antagonizes EphB4-EphrinB2 interaction, modulates angiogenesis, and inhibits tumor growth. *Blood*. 107(6): 2330–2338
- Khan ZA, Chakrabarti S. 2007. Cellular signaling and potential new treatment targets in diabetic retinopathy. *Experimental diabetes research* 2007: 31867
- Kikuchi A, Kishida S, Yamamoto H. 2006. Regulation of Wnt signaling by protein-protein interaction and post-translational modifications. *Experimental and Molecular Medicine* 38 (1), 1-10
- Kikuchi A, Yamamoto H, Kishida S. 2007. Multiplicity of the interactions of Wnt proteins and their receptors. *Cell Signal* 19: 659-71
- Kim GH, Her JH, Han JK. 2008a. Ryk cooperates with Frizzled 7 to promote Wnt11-mediated endocytosis and is essential for *Xenopus laevis* convergent extension movements. *The Journal of cell biology* 182: 1073-82
- Kim M, Lee HC, Tsedensodnom O, Hartley R, Lim YS, et al. 2008b. Functional interaction between Wnt3 and Frizzled-7 leads to activation of the Wnt/beta-catenin signaling pathway in hepatocellular carcinoma cells. *Journal of hepatology* 48: 780-91
- Kim YH, Hu H, Guevara-Gallardo S, Lam MT, Fong SY, Wang RA. 2008c. Artery and vein size is balanced by Notch and ephrin B2/EphB4 during angiogenesis. *Development* 135: 3755-64
- Kimelman D, Xu W. 2006. beta-catenin destruction complex: insights and questions from a structural perspective. *Oncogene* 25: 7482-91
- King TD, Zhang W, Suto MJ, Li Y. 2012. Frizzled7 as an emerging target for cancer therapy. *Cell Signal* 24: 846-51
- Kirikoshi H, Sekihara H, Katoh M. 2001. Up-regulation of Frizzled-7 (FZD7) in human gastric cancer. *Int J Oncol*. 19(1):111-5
- Kisanuki YYH, R. E. Miyazaki, J. Williams, S. C. Richardson, J. A. Yanagisawa, M. 2001. Tie2-Cre transgenic mice: a new model for endothelial cell-lineage analysis in vivo. *Developmental biology* 230: 230-42
- Kittler R, Pelletier L, Heninger AK, Slabicki M, Theis M, et al. 2007. Genome-scale RNAi profiling of cell division in human tissue culture cells. *Nature cell biology* 9: 1401-12
- Klagsbrun M, Eichmann A. 2005. A role for axon guidance receptors and ligands in blood vessel development and tumor angiogenesis. *Cytokine & growth factor reviews* 16: 535-48
- Knowlton MN, Kelly GM. 2004. Zebrafish Mir antagonizes Frizzled 7-induced gastrulation defects. *Zebrafish*. 1(2):133-44
- Koh W, Mahan RD, Davis GE. 2008. Cdc42- and Rac1-mediated endothelial lumen formation requires Pak2, Pak4 and Par3, and PKC-dependent signaling. *Journal of cell science* 121: 989-1001
- Korn C, Scholz B, Hu J, Srivastava K, Wojtarowicz J, et al. 2014. Endothelial cell-derived non-canonical Wnt ligands control vascular pruning in angiogenesis. *Development* 141: 1757-66
- Kosinski C, Li VS, Chan AS, Zhang J, Ho C, et al. 2007. Gene expression patterns of human colon tops and basal crypts and BMP antagonists as intestinal stem cell niche factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104: 15418-23
- Kouklis P, Konstantoulaki M, Malik AB. 2003. VE-cadherin-induced Cdc42 signaling regulates formation of membrane protrusions in endothelial cells. *The Journal of biological chemistry* 278: 16230-6

- Kraft B, Berger CD, Wallkamm V, Steinbeisser H, Wedlich D. 2012. Wnt-11 and Fz7 reduce cell adhesion in convergent extension by sequestration of PAPC and C-cadherin. *The Journal of cell biology* 198: 695-709
- Krah K, Mironov V, Risau W, Flamme I. 1994. Induction of Vasculogenesis in Quail Blastodisc-Derived Embryoid Bodies. *Developmental biology* 164: 123-32
- Krebs LT, Deftos ML, Bevan MJ, Gridley T. 2001. The Nrarp gene encodes an ankyrin-repeat protein that is transcriptionally regulated by the notch signaling pathway. *Developmental biology* 238: 110-9
- Kroll J, Waltenberger J. 1998. VEGF-A Induces Expression of eNOS and iNOS in Endothelial Cells via VEGF Receptor-2 (KDR). *Biochemical and Biophysical Research Communications* 252: 743-46
- Kühl M, Sheldahl LC, Park M, Miller JR, Moon RT. 2000. The Wnt/Ca²⁺ pathway a new vertebrate Wnt signaling pathway takes shape. *TIG* 16 (07)
- Lad EM, Hernandez-Boussard T, Morton JM, Moshfeghi DM. 2009. Incidence of retinopathy of prematurity in the United States: 1997 through 2005. *American journal of ophthalmology* 148: 451-8
- Lambeng N, Wallez Y, Rampon C, Cand F, Christe G, et al. 2005. Vascular endothelial-cadherin tyrosine phosphorylation in angiogenic and quiescent adult tissues. *Circulation research* 96: 384-91
- Lampugnani MG, Corada M, Andriopoulou P, Esser S, Risau W, Dejana E. 1997. Cell confluence regulates tyrosine phosphorylation of adherens junction components in endothelial cells. *Journal of cell science* 110, 2065-2077
- Lampugnani MG, Corada M, Caveda L, Breviario F, Ayalon O, et al. 1995. The Molecular Organization of Endothelial Cell to Cell Junctions: Differential Association of Plakoglobin, β -catenin, and α -catenin with Vascular Endothelial Cadherin (VE-cadherin). *The Journal of cell biology* 129 (01): 203-217
- Lampugnani MG, Zanetti A, Corada M, Takahashi T, Balconi G, et al. 2003. Contact inhibition of VEGF-induced proliferation requires vascular endothelial cadherin, beta-catenin, and the phosphatase DEP-1/CD148. *The Journal of cell biology* 161: 793-804
- Larrivee B, Freitas C, Trombe M, Lv X, Delafarge B, et al. 2007. Activation of the UNC5B receptor by Netrin-1 inhibits sprouting angiogenesis. *Genes & development* 21: 2433-47
- Larrivee B, Prahst C, Gordon E, del Toro R, Mathivet T, et al. 2012. ALK1 signaling inhibits angiogenesis by cooperating with the Notch pathway. *Developmental cell* 22: 489-500
- Lazic R, Gabric N. 2007. Intravitreally administered bevacizumab (Avastin) in minimally classic and occult choroidal neovascularization secondary to age-related macular degeneration. *Graefes's archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie* 245: 68-73
- Leckband D, Sivasankar S. 2000. Mechanism of homophilic cadherin adhesion. *Current opinion in cell biology* 12:587-592
- Lee AY, Raya AK, Kymes SM, Shiels A, Brantley MA, Jr. 2009. Pharmacogenetics of complement factor H (Y402H) and treatment of exudative age-related macular degeneration with ranibizumab. *The British journal of ophthalmology* 93: 610-3
- Lee K, Hu Y, Ding L, Chen Y, Takahashi Y, et al. 2012. Therapeutic Potential of a Monoclonal Antibody Blocking the Wnt Pathway in Diabetic Retinopathy. *Diabetes* 61:2948-2957

- Leroux L, Descamps B, Tojais NF, Seguy B, Oses P, et al. 2010. Hypoxia preconditioned mesenchymal stem cells improve vascular and skeletal muscle fiber regeneration after ischemia through a Wnt4-dependent pathway. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 18: 1545-52
- Leslie JD, Ariza-McNaughton L, Bermange AL, McAdow R, Johnson SL, Lewis J. 2007. Endothelial signalling by the Notch ligand Delta-like 4 restricts angiogenesis. *Development* 134: 839-44
- Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N. 1989. Vascular Endothelial Growth Factor Is a secreted Angiogenic Mitogen. *Science* 246: 1306-09
- Lewis JL, Bonner J, Modrell M, Ragland JW, Moon RT, et al. 2004. Reiterated Wnt signaling during zebrafish neural crest development. *Development* 131: 1299-308
- Li L, Yuan H, Xie W, Mao J, Caruso AM, et al. 1999. Cell Biology and Metabolism: Dishevelled Proteins Lead to Two Signaling Pathways: Regulation of LEF-1 and c-Jun N-Terminal Kinase in Mammalian Cells. *J. Biol. Chem.* 274:129-134
- Liao L, Doody JF, Overholser J, Finnerty B, Bassi R, et al. 2002. Vascular Endothelial-cadherin Antibody Inhibits Tumor Growth Selective Targeting of Angiogenic Tumor Vasculature by without Affecting Vascular Permeability. *Cancer research* 62:2567-2575
- Liebner S, Cattelino A, Gallini R, Rudini N, Iurlaro M, et al. 2004. Beta-catenin is required for endothelial-mesenchymal transformation during heart cushion development in the mouse. *The Journal of cell biology* 166: 359-67
- Liebner S, Corada M, Bangsow T, Babbage J, Taddei A, et al. 2008. Wnt/beta-catenin signaling controls development of the blood-brain barrier. *The Journal of cell biology* 183: 409-17
- Liew G, Shankar A, Wang JJ, Klein R, Bray MS, et al. 2006. Apolipoprotein E gene polymorphisms are not associated with diabetic retinopathy: the atherosclerosis risk in communities study. *American journal of ophthalmology* 142: 105-11
- Lijam N, Paylor R, McDonald MP, Deng CX, Stevens KE, et al. 1997. Social Interaction and Sensorimotor Gating Abnormalities in Mice Lacking Dvl1. *Cell* 90, 895–905
- Lilien J, Balsamo J. 2005. The regulation of cadherin-mediated adhesion by tyrosine phosphorylation/dephosphorylation of beta-catenin. *Current opinion in cell biology* 17: 459-65
- Limbourg A, Ploom M, Elligsen D, Sorensen I, Ziegelhoeffer T, et al. 2007. Notch ligand Delta-like 1 is essential for postnatal arteriogenesis. *Circulation research* 100: 363-71
- Lin S, Baye LM, Westfall TA, Slusarski DC. 2010. Wnt5b-Ryk pathway provides directional signals to regulate gastrulation movement. *The Journal of cell biology* 190: 263-78
- Lindahl P HM, Kalén M, Betsholtz C. 1998. Endothelial-perivascular cell signaling in vascular development: lessons from knockout mice. *Curr Opin Lipidol.* 9(5):407-11
- Linker C, Lesbros C, Gros J, Burrus LW, Rawls A, Marcelle C. 2005. beta-Catenin-dependent Wnt signalling controls the epithelial organisation of somites through the activation of paraxis. *Development* 132: 3895-905
- Liou GI. 2010. Diabetic retinopathy: Role of inflammation and potential therapies for anti-inflammation. *World journal of diabetes* 1: 12-8
- Liu C, Nathans J. 2008. An essential role for frizzled 5 in mammalian ocular development. *Development* 135: 3567-76
- Liu G, Bafico A, Harris VK, Aaronson SA. 2003. A Novel Mechanism for Wnt Activation of Canonical Signaling through the LRP6 Receptor. *Mol. Cell. Biol.* 23(16):5825

- Liu P, Wakamiya M, Shea MJ, Albrecht U, Behringer RR, Bradley A. 1999. Requirement for Wnt3 in vertebrate axis formation. *Nature genetics* 22
- Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T} Method. *Methods* 25: 402-8
- Lobov IB, Cheung E, Wudali R, Cao J, Halasz G, et al. 2011. The Dll4/Notch pathway controls postangiogenic blood vessel remodeling and regression by modulating vasoconstriction and blood flow. *Blood* 117: 6728-37
- Lobov IB, Rao S, Carroll TJ, Vallance JE, Ito M, et al. 2005. WNT7b mediates macrophage-induced programmed cell death in patterning of the vasculature. *Nature* 437: 417-21
- Lobov IB, Renard RA, Papadopoulos N, Gale NW, Thurston G, et al. 2007. Delta-like ligand 4 (Dll4) is induced by VEGF as a negative regulator of angiogenic sprouting. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104: 3219-24
- Logan CY, Nusse R. 2004. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annual review of cell and developmental biology* 20: 781-810
- Luhmann UF, Lin J, Acar N, Lammel S, Feil S, et al. 2005. Role of the Norrie disease pseudoglioma gene in sprouting angiogenesis during development of the retinal vasculature. *Investigative ophthalmology & visual science* 46: 3372-82
- MacDonald BT, Tamai K, He X. 2009. Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Developmental cell* 17: 9-26
- Maher MT, Flozak AS, Stocker AM, Chenn A, Gottardi CJ. 2009. Activity of the beta-catenin phosphodestruction complex at cell-cell contacts is enhanced by cadherin-based adhesion. *The Journal of cell biology* 186: 219-28
- Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, Bartunkova S, Wiegand SJ, et al. 1997. Angiopoietin-2, a Natural Antagonist for Tie2 That Disrupts in vivo Angiogenesis. *Science* 277 (55): 55-60
- Mann B, Gelos M, Siedow A, Hanski ML, Gratchev A, et al. 1999. Target genes of beta-catenin-T cell-factor/lymphoid-enhancer-factor signaling in human colorectal carcinomas. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96, pp. 1603–1608
- Mao C, Tahlil-Ben Malek O, Pueyo ME, Steg P, Soubrier F. 2000. Differential Expression of Rat Frizzled-Related frzb-1 and Frizzled Receptor fz1 and fz2 Genes in the Rat Aorta After Balloon Injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 20:43-51
- Mao J, Wang J, Liu B, Pan W, Farr GH, et al. 2001. Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein-5 Binds to Axin and Regulates the Canonical Wnt Signaling Pathway. *Molecular Cell* 7, 801–809
- Marcelo KL, Goldie LC, Hirschi KK. 2013. Regulation of endothelial cell differentiation and specification. *Circulation research* 112: 1272-87
- Masckauchan TN, Shawber CJ, Funahashi Y, Li CM, Kitajewski J. 2005. Wnt/beta-catenin signaling induces proliferation, survival and interleukin-8 in human endothelial cells. *Angiogenesis* 8: 43-51
- Matsuura K, Jigami T, Taniue K, Morishita Y, Adachi S, et al. 2011. Identification of a link between Wnt/beta-catenin signalling and the cell fusion pathway. *Nature communications* 2: 548
- May C, Doody JF, Abdullah R, Balderes P, Xu X, et al. 2005. Identification of a transiently exposed VE-cadherin epitope that allows for specific targeting of an antibody to the tumor neovasculature. *Blood* 105:4337-4344

- McColm JR, Fleck BW. 2001. Retinopathy of prematurity: causation. *Seminars in neonatology* : SN 6: 453-60
- McLeod DS, Hasegawa T, Prow T, Merges C, Luttly G. 2006. The initial fetal human retinal vasculature develops by vasculogenesis. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 235: 3336-47
- Medina A, Reintsch W, Steinbeisser H. 2000. *Xenopus frizzled 7* can act in canonical and non-canonical Wnt signaling pathways: implications on early patterning and morphogenesis. *Mechanisms of development*: 227-32
- Medina A, Steinbeisser H. 2000. Interaction of Frizzled 7 and Dishevelled in *Xenopus*. *Developmental Dynamics* 218: 671-80
- Medina A, Swain RK, Kuerner KM, Steinbeisser H. 2004. *Xenopus* paraxial protocadherin has signaling functions and is involved in tissue separation. *The EMBO Journal* 23: 3249-52
- Mei H, Nakatsu MN, Baclagon ER, Deng SX. 2014. Frizzled 7 maintains the undifferentiated state of human limbal stem/progenitor cells. *Stem cells* 32: 938-45
- Melchior K, Weiss J, Zaehres H, Kim YM, Lutzko C, et al. 2008. The WNT receptor FZD7 contributes to self-renewal signaling of human embryonic stem cells. *Biological chemistry* 389: 897-903
- Merle P, de la Monte S, Kim M, Herrmann M, Tanaka S, et al. 2004. Functional consequences of frizzled-7 receptor overexpression in human hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 127: 1110-22
- Merle P, Kim M, Herrmann M, Gupte A, Lefrancois L, et al. 2005. Oncogenic role of the frizzled-7/beta-catenin pathway in hepatocellular carcinoma. *Journal of hepatology* 43: 854-62
- Mikels AJ, Nusse R. 2006. Wnts as ligands: processing, secretion and reception. *Oncogene* 25: 7461-8
- Min JK, Park H, Choi HJ, Kim Y, Pyun BJ, et al. 2011. The WNT antagonist Dickkopf2 promotes angiogenesis in rodent and human endothelial cells. *The Journal of clinical investigation* 121: 1882-93
- Mintz-Hittner HA, Kennedy KA, Chuang AZ. 2001. Efficacy of Intravitreal Bevacizumab for Stage 3+ Retinopathy of Prematurity. *The New England journal of medicine* 364:603-15.
- Mitchell C, Risau W, Drexler H. 1998. Regression of vessels in the tunica vasculosa lentis is initiated by coordinated endothelial apoptosis: a role for vascular endothelial growth factor as a survival factor for endothelium. *Dev Dyn.* 213(3):322-33
- Mohamed Q, Gillies MC, Wong TY. 2007. Management of Diabetic Retinopathy: A Systematic Review. *JAMA* 298(8):902-916
- Monkley SJ, Delaney SJ, Pennisi DJ, Christiansen JH, Wainwright BJ. 1996. Targeted disruption of the Wnt2 gene results in placentation defects. *Development* 122, 3343-3353
- Montcouquiol M, Rachel RA, Lanford PJ, Copeland NG, Jenkins NA, Kelley MW. 2003. Identification of Vangl2 and Scrb1 as planar polarity genes in mammals. *Nature* 423
- Montero-Balaguer M, Swirsding K, Orsenigo F, Cotelli F, Mione M, Dejana E. 2009. Stable vascular connections and remodeling require full expression of VE-cadherin in zebrafish embryos. *PLoS One* 4: e5772
- Moradi A, Sepah YJ, Sadiq MA, Nasir H, Kherani S, et al. 2013. Vascular endothelial growth factor trap-eye (Aflibercept) for the management of diabetic macular edema. *World journal of diabetes* 4: 303-9
- Morin PJ, Sparks AB, Korinek V, Barker N, Clevers H, et al. 1997. Activation of β -Catenin-Tcf Signaling in Colon Cancer by Mutations in β -Catenin or APC. *Science* 275, 1787

- Morini MF, Dejana E. 2014. Transcriptional regulation of arterial differentiation via Wnt, Sox and Notch. *Current opinion in hematology* 21: 229-34
- Mudhar HS, Pollock RA, Wang C, Stiles CD, Richardson WD. 1993. PDGF and its receptors in the developing rodent retina and optic nerve. *Development* 118: 539-52
- Munemitsu S, Albert I, Souza B, Rubinfeld B, Polakis P. 1995. Regulation of intracellular β -catenin levels by the adenomatous polyposis coli (APC) tumor-suppressor protein. *PNAS* 92, pp. 3046-3050
- Muñoz B, Klein R, Rodriguez J, Snyder R, West SK. 2005. Prevalence of Age-Related Macular Degeneration in a Population-Based Sample of Hispanic People in Arizona: Proyecto VER. *Arch Ophthalmol.* 123:1575-1580
- Myers DC, Sepich DS, Solnica-Krezel L. 2002. Convergence and extension in vertebrate gastrulae: cell movements according to or in search of identity? *Trends in Genetics* 18, 09
- Naito AT, Shiojima I, Akazawa H, Hidaka K, Morisaki T, et al. 2006. Developmental stage-specific biphasic roles of Wnt/beta-catenin signaling in cardiomyogenesis and hematopoiesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 19812-7
- Nambotin SB, Lefrancois L, Sainsily X, Berthillon P, Kim M, et al. 2011. Pharmacological inhibition of Frizzled-7 displays anti-tumor properties in hepatocellular carcinoma. *Journal of hepatology* 54: 288-99
- Napp LC, Augustynik M, Paesler F, Krishnasamy K, Woiterski J, et al. 2012. Extrinsic Notch ligand Delta-like 1 regulates tip cell selection and vascular branching morphogenesis. *Circulation research* 110: 530-5
- Navarro P, Caveda L, Breviario F, Mândoteanu I, Lampugnani MG, Dejana E. 1995. Cell Biology and Metabolism: Catenin-dependent and -independent Functions of Vascular Endothelial Cadherin. *J. Biol. Chem.* 270:30965-30972
- Nelson AR, Fingleton B, Rothenberg ML, Matrisian LM. 2000. Matrix Metalloproteinases: Biologic Activity and Clinical Implications. *Journal of Clinical Oncology* 18 (5): 1135-49
- Nelson WJ, Nusse R. 2004. Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways. *Science* 303: 1483-7
- Network DRCR, Elman MJ, Qin H, Aiello LP, Beck RW, et al. 2012. Intravitreal ranibizumab for diabetic macular edema with prompt versus deferred laser treatment: three-year randomized trial results. *Ophthalmology* 119: 2312-8
- Niehrs C. 2006. Function and biological roles of the Dickkopf family of Wnt modulators. *Oncogene* 25: 7469-81
- Niemann S, Zhao C, Pascu F, Stahl U, Aulepp U, et al. 2004. Homozygous WNT3 mutation causes tetra-amelia in a large consanguineous family. *American journal of human genetics* 74: 558-63
- Nieset JE, Redfield AR, Jin F, Knudsen KA, Johnson KR, Wheelock MJ. 1997. Characterization of the interactions of α -catenin with α -actinin and β -catenin/plakoglobin. *Journal of cell science* 110, 1013-1022
- Nikopoulos K, Venselaar H, Collin RW, Riveiro-Alvarez R, Boonstra FN, et al. 2010. Overview of the mutation spectrum in familial exudative vitreoretinopathy and Norrie disease with identification of 21 novel variants in FZD4, LRP5, and NDP. *Human mutation* 31: 656-66

- Nishishita T, Lin PC. 2004. Angiopoietin 1, PDGF-B, and TGF-beta gene regulation in endothelial cell and smooth muscle cell interaction. *Journal of cellular biochemistry* 91: 584-93
- Noguera-Troise I, Daly C, Papadopoulos N, Coetsee S, Boland P, et al. 2007. Blockade of DLL4 inhibits tumour growth by promoting non-productive angiogenesis. *Novartis Found Symp.* 283:106-20
- Nollet F, Kools P, van Roy F. 2000. Phylogenetic Analysis of the Cadherin Superfamily allows identification of six Major Subfamilies beside several Solitary Members *J. Mol. Biol* 299:551-572
- O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, Fukai N, Vasios G, et al. 1997. Endostatin: An Endogenous Inhibitor of Angiogenesis and Tumor Growth. *Cell* 88: 277-85
- O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y, Chen C, Rosenthal RA, et al. 1994. Angiostatin: A Novel Angiogenesis Inhibitor That Mediates the Suppression of Metastases by a Lewis Lung Carcinoma. *Cell, Vol. 79*, 315-328
- Ohlmann A, Seitz R, Braunger B, Seitz D, Bosl MR, Tamm ER. 2010. Norrin promotes vascular regrowth after oxygen-induced retinal vessel loss and suppresses retinopathy in mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30: 183-93
- Orsenigo F, Giampietro C, Ferrari A, Corada M, Galaup A, et al. 2012. Phosphorylation of VE-cadherin is modulated by haemodynamic forces and contributes to the regulation of vascular permeability in vivo. *Nature communications* 3: 1208
- Outz HH, Tattersall IW, Kofler NM, Steinbach N, Kitajewski J. 2011. Notch1 controls macrophage recruitment and Notch signaling is activated at sites of endothelial cell anastomosis during retinal angiogenesis in mice. *Blood* 118: 3436-9
- Palpant NJ, Yasuda S, MacDougald O, Metzger JM. 2007. Non-canonical Wnt signaling enhances differentiation of Sca1+/c-kit+ adipose-derived murine stromal vascular cells into spontaneously beating cardiac myocytes. *Journal of molecular and cellular cardiology* 43: 362-70
- Pandur P, Maurus D, Kuhl M. 2002. Increasingly complex: new players enter the Wnt signaling network. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 24: 881-4
- Paolinelli R, Corada M, Ferrarini L, Devraj K, Artus C, et al. 2013. Wnt activation of immortalized brain endothelial cells as a tool for generating a standardized model of the blood brain barrier in vitro. *PLoS One* 8: e70233
- Park K, Lee K, Zhang B, Zhou T, He X, et al. 2011. Identification of a novel inhibitor of the canonical Wnt pathway. *Molecular and cellular biology* 31: 3038-51
- Parr BA, Cornish VA, Cybulsky MI, McMahon AP. 2001. Wnt7b regulates placental development in mice. *Developmental biology* 237: 324-32
- Patapoutian A, Reichardt LF. 2000. Roles of Wnt proteins in neural development and maintenance. *Current Opinion in Neurobiology* 10:392-399
- Paysse EA. 2009. Retinopathy of prematurity. <http://www.uptodate.com/home/index.html>.
- Peifer M, Polakis P. 2000. Wnt Signaling in Oncogenesis and Embryogenesis--a Look Outside the Nucleus. *Science* 287, 1606
- Penton A, Wodarz A, Nusse R. 2002. A Mutational Analysis of dishevelled in Drosophila Defines Novel Domains in the Dishevelled Protein as Well as Novel Suppressing Alleles of axin. *Genetics* 161: 747-762

- Penzo-Mendèz A, Umbhauer M, Djiane A, Boucaut JC, Riou JF. 2003. Activation of G β y signaling downstream of Wnt-11/Xfz7 regulates Cdc42 activity during *Xenopus* gastrulation. *Developmental biology* 257: 302-14
- Pepper MS. 1997. Transforming Growth Factor-beta: Vasculogenesis, Angiogenesis and Vessel Wall Integrity. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 8 (1): 21-43
- Phng LK, Potente M, Leslie JD, Babbage J, Nyqvist D, et al. 2009. Nrarp coordinates endothelial Notch and Wnt signaling to control vessel density in angiogenesis. *Developmental cell* 16: 70-82
- Pinson KI, Brennan J, Monkley S, Avery BJ, Skarnes WC. 2000. An LDL-receptor- related protein mediates Wnt signalling in mice. *Nature* 407
- Pongracz JE, Stockley RA. 2006. Wnt signalling in lung development and diseases. *Respiratory research* 7: 15
- Potter MD, Barbero S, Cheresch DA. 2005. Tyrosine phosphorylation of VE-cadherin prevents binding of p120- and beta-catenin and maintains the cellular mesenchymal state. *The Journal of biological chemistry* 280: 31906-12
- Poulter JA, Ali M, Gilmour DF, Rice A, Kondo H, et al. 2010. Mutations in TSPAN12 cause autosomal-dominant familial exudative vitreoretinopathy. *American journal of human genetics* 86: 248-53
- Povelones M, Nusse R. 2005. The role of the cysteine-rich domain of Frizzled in Wingless-Armadillo signaling. *The EMBO Journal* 24, 3493–3503
- Pukrop T, Klemm F, Hagemann T, Gradl D, Schulz M, et al. 2006. Wnt 5a signaling is critical for macrophage-induced invasion of breast cancer cell lines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 5454-9
- Rechtman E, Harris A, Kumar R, Cantor LB, Ventrapragada S, et al. 2003. An update on retinal circulation assessment technologies. *Current Eye Research* 27 (6): 329–43
- Rehm HL, Zhang DS, Brown MC, Burgess B, Halpin C, et al. 2002. Vascular Defects and Sensorineural Deafness in a Mouse Model of Norrie Disease. *The Journal of Neuroscience* 22(11):4286–4292
- Reis M, Liebner S. 2013. Wnt signaling in the vasculature. *Experimental cell research* 319: 1317-23
- Reya T, Clevers H. 2005. Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature* 434
- Reya T, Duncan AW, Ailles L, Domen J, Scherer DC, et al. 2003. A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature* 423
- Rhodes JM, Simons M. 2007. The extracellular matrix and blood vessel formation: not just a scaffold. *Journal of cellular and molecular medicine* 11: 176-205
- Ricard N, Ciais D, Levet S, Subileau M, Mallet C, et al. 2012. BMP9 and BMP10 are critical for postnatal retinal vascular remodeling. *Blood* 119: 6162-71
- Richter M, Gottanka J, May CA, Welge-Liifien U, Berger W, Lutjen-Drecoll E. 1998. Retinal Vasculature Changes in Norrie Disease Mice. *Investigative ophthalmology & visual science* 39 (12): 2450-57
- Rios JA, Cisternas P, Arrese M, Barja S, Inestrosa NC. 2014. Is Alzheimer's disease related to metabolic syndrome? A Wnt signaling conundrum. *Progress in neurobiology* 121C: 125-46
- Risau W. 1997. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 385: 671-75
- Robert N, Frank MD. 2004. Diabetic Retinopathy. *The New England journal of medicine* 350:48-58

- Robinson R, Barathi VA, Chaurasia SS, Wong TY, Kern TS. 2012. Update on animal models of diabetic retinopathy: from molecular approaches to mice and higher mammals. *Disease models & mechanisms* 5: 444-56
- Roca C, Adams RH. 2007. Regulation of vascular morphogenesis by Notch signaling. *Genes & development* 21: 2511-24
- Rodova M, Islam MR, Maser RL, Calvet JP. 2002. The polycystic kidney disease-1 promoter is a target of the beta-catenin/T-cell factor pathway. *The Journal of biological chemistry* 277: 29577-83
- Rousseau B, Larrieu-Lahargue F, Bikfalvi A, Javerzat S. 2003. Involvement of fibroblast growth factors in choroidal angiogenesis and retinal vascularization. *Experimental eye research* 77:147–156
- Ruhrberg C, Gerhardt H, Golding M, Watson R, Ioannidou S, et al. 2002. Spatially restricted patterning cues provided by heparin-binding VEGF-A control blood vessel branching morphogenesis. *Genes & development* 16: 2684-98
- Sagara N, Toda G, Hirai M, Terada M, Katoh M. 1998. Molecular Cloning, Differential Expression, and Chromosomal Localization of Human Frizzled-1, Frizzled-2, and Frizzled-7. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 252, 117–122
- Sainson RCA, Aoto J, Nakatsu MN, Holderfield M, Conn E, et al. 2005. Cell-autonomous notch signaling regulates endothelial cell branching and proliferation during vascular tubulogenesis. *The FASEB Journal* 10.1096/fj.04-3172fje
- Sato T, Wada K, Arahori H, Kuno N, Imoto K, et al. 2012. Serum concentrations of bevacizumab (avastin) and vascular endothelial growth factor in infants with retinopathy of prematurity. *American journal of ophthalmology* 153: 327-33 e1
- Sauvageot C, Kesari S, Stiles C. 2007. Molecular pathogenesis of adult brain tumors and the role of stem cells. *Neurol Clin.* 25(4):891-924
- Sawamiphak S, Seidel S, Essmann CL, Wilkinson GA, Pitulescu ME, et al. 2010. Ephrin-B2 regulates VEGFR2 function in developmental and tumour angiogenesis. *Nature* 465: 487-91
- Schlingemann RO, Witmer AN. 2009. Treatment of retinal diseases with VEGF antagonists. *Progress in Brain Research* 175
- Schnitzer J. 1987. Retinal astrocytes: their restriction to vascularized parts of the mammalian retina. *Neurosci Lett.* 78(1):29-34
- Schulte G, Bryja V. 2007. The Frizzled family of unconventional G-protein-coupled receptors. *Trends in pharmacological sciences* 28: 518-25
- Schwarz-Romond T, C. M, Mariann Bienz M. 2007. Dynamic recruitment of axin by Dishevelled protein assemblies. *Journal of cell science* 120, 2402-2412
- Scott A, Fruttiger M. 2010. Oxygen-induced retinopathy: a model for vascular pathology in the retina. *Eye* 24: 416-21
- Scott A, Powner MB, Gandhi P, Clarkin C, Gutmann DH, et al. 2010. Astrocyte-derived vascular endothelial growth factor stabilizes vessels in the developing retinal vasculature. *PLoS One* 5: e11863
- Semenov M, Tamai K, He X. 2005. SOST is a ligand for LRP5/LRP6 and a Wnt signaling inhibitor. *The Journal of biological chemistry* 280: 26770-5
- Semënov MV, Snyder M. 1997. Human Dishevelled Genes Constitute a DHR-Containing Multigene Family. *Genomics* 42, 302–310

- Semënov MV, Tamai K, Brott BK, Khül M, Sokol S, He X. 2001. Head inducer Dickkopf-1 is a ligand for Wnt coreceptor LRP6. *Current Biology* 11:951–961
- Semenza GL. 2010. Vascular responses to hypoxia and ischemia. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 30: 648-52
- Seshagiri S, Stawiski EW, Durinck S, Modrusan Z, Storm EE, et al. 2012. Recurrent R-spondin fusions in colon cancer. *Nature* 488: 660-4
- Sewduth RN, Jaspard-Vinassa B, Peghaire C, Guillabert A, Franzl N, et al. 2014. The ubiquitin ligase PDZRN3 is required for vascular morphogenesis through Wnt/planar cell polarity signalling. *Nature communications* 5: 4832
- Shalaby F, Rissant J, Yamaguchi TP, Gertsenstein M, Wu XF, et al. 1995. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Letters to Nature* 376: 62-66
- Shastry BS, Liu X, Hejtmancik JF, Plager DA, Trese MT. 1997. Evidence for Genetic Heterogeneity in X-Linked Familial Exudative Vitreoretinopathy. *Genomics* 44: 247–48
- Shutter JR, Scully S, Fan W, Richards WG, Kitajewski J, et al. 2000. Dll4, a novel Notch ligand expressed in arterial endothelium. *Genes & development* 14: 1313–18
- Sidibé A, Polena P, Pernet-Gallay K, Razanajatovo J, Mannic T, et al. 2014. VE-cadherin Y685F knock-in mouse is sensitive to vascular permeability in recurrent angiogenic organs. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 307: H455–H63
- Singh AM, Li FQ, Hamazaki T, Kasahara H, Takemaru K, Terada N. 2007. Chibby, an antagonist of the Wnt/beta-catenin pathway, facilitates cardiomyocyte differentiation of murine embryonic stem cells. *Circulation* 115: 617-26
- Smith LEH, Wesolowski E, McLellan A, Kostyk SK, D'Amato R, et al. 1994. Oxygen-Induced Retinopathy in the mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 35:101-111
- Sobrin L, Green TS, X., Jensen RA, Tai ES, Tay WT, et al. 2011. Candidate Gene Association Study for Diabetic Retinopathy in Persons with Type 2 Diabetes: The Candidate Gene Association Resource (CARE). *Investigative ophthalmology & visual science* 52 (10)
- Soncin S, Mattot V, Lionneton F, Spruyt N, Lepretre F, et al. 2003. VE-statin, an endothelial repressor of smooth muscle cell migration. *The EMBO Journal* 22: 5700-11
- Sonderegger S, Husslein H, Leisser C, Knofler M. 2007. Complex expression pattern of Wnt ligands and frizzled receptors in human placenta and its trophoblast subtypes. *Placenta* 28 Suppl A: S97-102
- Speese SD, Budnik V. 2007. Wnts: up-and-coming at the synapse. *Trends in neurosciences* 30: 268-75
- Stahl A, Connor KM, Sapienza P, Chen J, Dennison RJ, et al. 2010. The mouse retina as an angiogenesis model. *Investigative ophthalmology & visual science* 51: 2813-26
- Stalmans I, Ng YS, Rohan R, Fruttiger M, Bouché A, et al. 2002. Arteriolar and venular patterning in retinas of mice selectively expressing VEGF isoforms. *J. Clin. Invest.* 109: 327–36
- Stefansson E. 2009. Physiology of vitreous surgery. *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie* 247: 147-63
- Stefater JA, Lewkowich I, Rao S, Mariggi G, Carpenter AC, et al. 2011. Regulation of angiogenesis by a non-canonical Wnt-Flt1 pathway in myeloid cells. *Nature* 474: 511-5
- Steinle JJ, Meininger CJ, Chowdhury U, Wu G, Granger HJ. 2003. Role of ephrin B2 in human retinal endothelial cell proliferation and migration. *Cellular Signalling* 15:1011–1017

- Stenman JM, Rajagopal J, Carroll TJ, Ishibashi M, McMahon J, McMahon AP. 2008. Canonical Wnt Signaling Regulates Organ-Specific Assembly and Differentiation of CNS Vasculature. *Science* 332
- Stone J, Itin A, Alon T, Pe'er J, Gnessin H, et al. 1995. Development of Retinal Vasculature is mediated by hypoxia-induced vascular endothelial growth factor (VEGF) expression by neuroglia. *The Journal of Neuroscience* 15(7): 2438-4747
- Stringer SE. 2006. The role of heparan sulphate proteoglycans in angiogenesis. *Biochemical Society transactions* 34: 451-53
- Suchting S, Bicknell R, Eichmann A. 2006. Neuronal clues to vascular guidance. *Experimental cell research* 312: 668-75
- Sumanas S, Ekker SC. 2001. *Xenopus* frizzled-7 morphant displays defects in dorsoventral patterning and convergent extension movements during gastrulation. *Genesis* 30: 119-22
- Sumanas S, Strege P, Heasman J, Ekker SC. 2000. The putative Wnt receptor *Xenopus* frizzled-7 functions upstream of β -catenin in vertebrate dorsoventral mesoderm patterning. *Development* 127: 1981-90
- Suri S, McClain J, Thurston G, McDonald DM, Zhou H, et al. 1998. Increased Vascularization in Mice Overexpressing Angiopoietin-1. *Science* 282: 468-71
- Sussman DJ, Klingensmith J, Salinas P, Adams PS, Nusse R, Perrimon N. 1994. Isolation and characterization of a Mouse homolog of the *Drosophila* Segment Polarity gene *dishevelled*. *Developmental biology* 166: 73-86
- Taddei A, Giampietro C, Conti A, Orsenigo F, Breviario F, et al. 2008. Endothelial adherens junctions control tight junctions by VE-cadherin-mediated upregulation of claudin-5. *Nature cell biology* 10: 923-34
- Tahinci E, Thorne CA, Franklin JL, Salic A, Christian KM, et al. 2007. Lrp6 is required for convergent extension during *Xenopus* gastrulation. *Development* 134: 4095-106
- Tamai K, Zeng X, Liu C, Zhang X, Harada Y, et al. 2004. A Mechanism for Wnt Coreceptor Activation. *Molecular Cell* 13, 149–156
- Tanaka S, Akiyoshi T, Mori M, Wands JR, Sugimachi K. 1998. A novel frizzled gene identified in human esophageal carcinoma mediates APC/ β -catenin signals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 10164–69
- Tang J, Kern TS. 2011. Inflammation in diabetic retinopathy. *Progress in retinal and eye research* 30: 343-58
- Tang SJ. 2014. W(e)nt to the Brain: Wnt Signaling in Neurological Disorders. *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets* 13 (05)
- Thomas M, Augustin HG. 2009. The role of the Angiopoietins in vascular morphogenesis. *Angiogenesis* 12: 125-37
- Thurston G, Rudge JS, Croll SD, Ioffe E, Glazer N, et al. 2000. Angiopoietin-1 protects the adult vasculature against plasma leakage. *Nature Medicine* 06: 460-63
- Tissir F, Goffinet AM. 2010. Planar cell polarity signaling in neural development. *Curr Opin Neurobiol* 20: 572-7
- Tokunaga CC, Chen YH, Dailey W, Cheng M, Drenser KA. 2013. Retinal vascular rescue of oxygen-induced retinopathy in mice by norrin. *Investigative ophthalmology & visual science* 54: 222-9

- Tolwinski NS, Wehrli M, Rives A, Erdeniz N, DiNardo S, Wieschaus E. 2003. Wg/Wnt Signal Can Be Transmitted through Arrow/LRP5,6 and Axin Independently of Zw3/Gsk3beta Activity. *Developmental cell* 4, 407–418
- Toomes C, Bottomley HM, Jackson RM, Towns KV, Scott S, et al. 2004. Mutations in LRP5 or FZD4 Underlie the Common Familial Exudative Vitreoretinopathy Locus on Chromosome 11q. *Am. J. Hum. Genet.* 74: 721-30
- Uemura A, Ogawa M, Hirashima M, Fujiwara T, Koyama S, et al. 2002. Recombinant angiopoietin-1 restores higher-order architecture of growing blood vessels in mice in the absence of mural cells. *J. Clin. Invest* 110: 1619–28
- Ueno K, Hazama S, Mitomori S, Nishioka M, Suehiro Y, et al. 2009. Down-regulation of frizzled-7 expression decreases survival, invasion and metastatic capabilities of colon cancer cells. *British journal of cancer* 101: 1374-81
- Urbich C, Dimmeler S. 2004. Endothelial progenitor cells functional characterization. *Trends in cardiovascular medicine* 14: 318-22
- van de Schans VA, van den Borne SW, Strzelecka AE, Janssen BJ, van der Velden JL, et al. 2007. Interruption of Wnt signaling attenuates the onset of pressure overload-induced cardiac hypertrophy. *Hypertension* 49: 473-80
- van Es JH, Barker N, Clevers H. 2003. You Wnt some, you lose some: oncogenes in the Wnt signaling pathway *Current Opinion in Genetics and Development* 13:28-33
- van Gijn M, Blankesteyn W, Smits J, Hierck B, Gittenberger-de Groot A. 2001. Frizzled 2 is transiently expressed in neural crest-containing areas during development of the heart and great arteries in the mouse. *Anat Embryol* 203(3):185-92
- Veeman MT, Axelrod JD, Moon RT. 2003. A Second Canon: Functions and Mechanisms of beta-Catenin-Independent Wnt Signaling. *Developmental cell* 5, 367–377
- Vijayaragavan K, Szabo E, Bosse M, Ramos-Mejia V, Moon RT, Bhatia M. 2009. Noncanonical Wnt signaling orchestrates early developmental events toward hematopoietic cell fate from human embryonic stem cells. *Cell stem cell* 4: 248-62
- Villarroel M, Ciudin A, Hernandez C, Simo R. 2010. Neurodegeneration: An early event of diabetic retinopathy. *World journal of diabetes* 1: 57-64
- Vincan E, Darcy P, Farrelly C, Faux M, Brabletz T, Ramsay R. 2007a. Frizzled-7 dictates three-dimensional organization of colorectal cancer cell carcinoids. *Oncogene* 26, 2340–2352
- Vincan E, Swain RK, Brabletz T, Steinbeisser H. 2007b. Frizzled7 dictates embryonic morphogenesis: implications for colorectal cancer progression. *Frontiers in Bioscience* 12: 4558-67
- Vincent PA, Xiao K, Buckley KM, Kowalczyk AP. 2004. VE-cadherin: adhesion at arm's length. *Am J Physiol Cell Physiol* 286: C987–C997
- Vlad A, Rohrs S, Klein-Hitpass L, Muller O. 2008. The first five years of the Wnt targetome. *Cell Signal* 20: 795-802
- Wallez Y, Cand F, Cruzalegui F, Wernstedt C, Souchelnytskyi S, et al. 2007. Src kinase phosphorylates vascular endothelial-cadherin in response to vascular endothelial growth factor: identification of tyrosine 685 as the unique target site. *Oncogene* 26: 1067-77
- Wallez Y, Huber P. 2008. Endothelial adherens and tight junctions in vascular homeostasis, inflammation and angiogenesis. *Biochimica et biophysica acta* 1778: 794-809
- Wallingford JB, Fraser SE, M. Harland RM. 2002. Convergent Extension: The Molecular Control of Polarized Cell Movement during Embryonic Development. *Developmental cell* 2, 695–706

- Wallingford JB, Rowning BA, Vogeli KM, Rothbacher U, Fraser SE, Harland RM. 2000. Dishevelled controls cell polarity during *Xenopus* gastrulation. *Nature* 405
- Wang HY, Liu T, Malbon CC. 2006. Structure-function analysis of Frizzleds. *Cell Signal* 18: 934-41
- Wang Y. 2009. Wnt/Planar cell polarity signaling: a new paradigm for cancer therapy. *Molecular cancer therapeutics* 8: 2103-9
- Wang Y, Macke JP, Abella BS, Andreasson K, Worley P, et al. 1996. Polarity Gene frizzled: A Large Family of Putative the Product of Transmembrane Receptors Homologous to the *Drosophila* Tissue Protein Chemistry and Structure:. *J. Biol. Chem.* 271:4468-4476
- Wang Y, Nathans J. 2007. Tissue/planar cell polarity in vertebrates: new insights and new questions. *Development* 134: 647-58
- Wang Y, Rattner A, Zhou Y, Williams J, Smallwood PM, Nathans J. 2012. Norrin/Frizzled4 signaling in retinal vascular development and blood brain barrier plasticity. *Cell* 151: 1332-44
- Wei W, Chua MS, Grepper S, So SK. 2011. Soluble Frizzled-7 receptor inhibits Wnt signaling and sensitizes hepatocellular carcinoma cells towards doxorubicin. *Molecular cancer* 10: 16
- Weis SM. 2008. Vascular permeability in cardiovascular disease and cancer. *Current opinion in hematology* 15:243–249
- Weiss E, Kroemker M, Rüdiger A, Jockusch B, Rüdiger M. 1998. Vinculin is part of the cadherin-catenin junctional complex: complex formation between alpha-catenin and vinculin. *J Cell Biol.* 4;141(3):755-64
- West H, Richardson WD, Fruttiger M. 2005. Stabilization of the retinal vascular network by reciprocal feedback between blood vessels and astrocytes. *Development* 132: 1855-62
- Wheelock MJ, Johnsony KR. 2003. Cadherin-mediated cellular signaling. *Current opinion in cell biology* 15:509–514
- Wilkinson DG. 2000. Eph Receptors and Ephrins: Regulators of Guidance and Assembly *International Review of Cytology* 196: 177-244
- Willert J, Epping M, Pollack JR, O Brown P, Nusse R. 2002. A transcriptional response to Wnt protein in human embryonic carcinoma cells. *BMC developmental biology* 2:8
- Willert K, Brown JD, Danenberg E, Duncan AW, Weissman IL, et al. 2003. Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature* 423
- Winklbauer R, Medina A, Swain RK, Steinbeisser H. 2001. Frizzled-7 signalling controls tissue separation during *Xenopus* gastrulation. *Nature letters* 413: 856-60
- Wirotko B, Wong TY, Simo R. 2008. Vascular endothelial growth factor and diabetic complications. *Progress in retinal and eye research* 27: 608-21
- Witzel S, Zimyanin V, Carreira-Barbosa F, Tada M, Heisenberg CP. 2006. Wnt11 controls cell contact persistence by local accumulation of Frizzled 7 at the plasma membrane. *The Journal of cell biology* 175: 791-802
- Wodarz A. 1998. Mechanisms of Wnt signaling in development. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 14: 59-88
- Wong HC, Bourdelas A, Krauss A, Lee HJ, Shao Y, et al. 2003. Direct Binding of the PDZ Domain of Dishevelled to a Conserved Internal Sequence in the C-Terminal Region of Frizzled. *Molecular Cell* 12, 1251–1260
- Wong TY, Klein R, Islam FM, Cotch MF, Folsom AR, et al. 2006. Diabetic retinopathy in a multi-ethnic cohort in the United States. *American journal of ophthalmology* 141: 446-55

- Wright M, Aikawa M, Szeto W, Papkoff J. 1999. Identification of a Wnt-Responsive Signal Transduction Pathway in Primary Endothelial Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 263, 384-388
- Wu B, Crampton SP, Hughes CC. 2007. Wnt signaling induces matrix metalloproteinase expression and regulates T cell transmigration. *Immunity* 26: 227-39
- Xavier CP, Melikova M, Chuman Y, Uren A, Baljinnyam B, Rubin JS. 2014. Secreted Frizzled-related protein potentiation versus inhibition of Wnt3a/beta-catenin signaling. *Cell Signal* 26: 94-101
- Xi Y, Chen Y. 2014. Wnt signaling pathway: Implications for therapy in lung cancer and bone metastasis. *Cancer letters* 353: 8-16
- Xia CH, Yablonka-Reuveni Z, Gong X. 2010. LRP5 Is Required for Vascular Development in Deeper Layers of the Retina. *PLoS ONE* 5(7): e11676
- Xiao K, Garner J, Buckley KM, Vincent PA, Chiasson CM, et al. 2005. p120-Catenin regulates clathrin-dependent endocytosis of VE-cadherin. *Molecular biology of the cell* 16: 5141-51
- Xie H, Tranguch S, Jia X, Zhang H, Das SK, et al. 2008. Inactivation of nuclear Wnt-beta-catenin signaling limits blastocyst competency for implantation. *Development* 135: 717-27
- Xu HT, Wei Q, Liu Y, Yang LH, Dai SD, et al. 2007. Overexpression of axin downregulates TCF-4 and inhibits the development of lung cancer. *Annals of surgical oncology* 14: 3251-9
- Xu Q, Wang Y, Dabdoub A, Smallwood PM, Williams J, et al. 2004. Vascular Development in the Retina and Inner Ear: Control by Norrin and Frizzled-4, a High-Affinity Ligand-Receptor Pair. *Cell* 116: 883-95
- Yamamizu K, Matsunaga T, Uosaki H, Fukushima H, Katayama S, et al. 2010. Convergence of Notch and beta-catenin signaling induces arterial fate in vascular progenitors. *The Journal of cell biology* 189: 325-38
- Yang L, Wu X, Wang Y, Zhang K, Wu J, et al. 2011. FZD7 has a critical role in cell proliferation in triple negative breast cancer. *Oncogene* 30: 4437-46
- Yang Y, Lijam N, Sussman DJ, Michael Tsang M. 1996. Genomic organization of mouse Dishevelled genes. *Gene* 180: 121-23
- Yates LL, Dean CH. 2011. Planar polarity: A new player in both lung development and disease. *Organogenesis* 7: 209-16
- Ye X, Wang Y, Cahill H, Yu M, Badea TC, et al. 2009. Norrin, frizzled-4, and Lrp5 signaling in endothelial cells controls a genetic program for retinal vascularization. *Cell* 139: 285-98
- Yilmaz T, Weaver CD, Gallagher MJ, Cordero-Coma M, Cervantes-Castaneda RA, et al. 2009. Intravitreal triamcinolone acetonide injection for treatment of refractory diabetic macular edema: a systematic review. *Ophthalmology* 116: 902-11; quiz 12-3
- Yokoyama N, Yin D, Malbon CC. 2007. Abundance, complexation, and trafficking of Wnt/beta-catenin signaling elements in response to Wnt3a. *Journal of molecular signaling* 2: 11
- York JR, Landers S, Kirby RS, Arbogast PG, Penn JS. 2004. Arterial oxygen fluctuation and retinopathy of prematurity in very-low-birth-weight infants. *Journal of perinatology : official journal of the California Perinatal Association* 24: 82-7
- Yu H, Ye X, Guo N, Nathans J. 2012. Frizzled 2 and frizzled 7 function redundantly in convergent extension and closure of the ventricular septum and palate: evidence for a network of interacting genes. *Development* 139: 4383-94
- Zallen JA. 2007. Planar polarity and tissue morphogenesis. *Cell* 129: 1051-63

- Zeng G, Taylor SM, McColm JR, Kappas NC, Kearney JB, et al. 2007. Orientation of endothelial cell division is regulated by VEGF signaling during blood vessel formation. *Blood* 109 (4): 1345-52
- Zhang X, Gaspard JP, Chung DC. 2001. Regulation of Vascular Endothelial Growth Factor by the Wnt and K-ras Pathways in Colonic Neoplasia. *Cancer research* 61:6050-6054
- Zhang X, Saaddine JB, Chou Cf, Cotch MF, Cheng YJ, et al. 2010. Prevalence of Diabetic Retinopathy in the United States, 2005-2008. *JAMA* 304(6):649-656
- Zhang Z, Deb A, Zhang Z, Pachori A, He W, et al. 2009. Secreted frizzled related protein 2 protects cells from apoptosis by blocking the effect of canonical Wnt3a. *Journal of molecular and cellular cardiology* 46: 370-7
- Zhang Z, Rankin SA, Zorn AM. 2013. Different thresholds of Wnt-Frizzled 7 signaling coordinate proliferation, morphogenesis and fate of endoderm progenitor cells. *Developmental biology* 378: 1-12
- Zhou Y, Wang Y, Tischfield M, Williams J, Smallwood PM, et al. 2014. Canonical WNT signaling components in vascular development and barrier formation. *The Journal of clinical investigation* 124: 3825-46

Publications



EUROPEAN SOCIETY OF CARDIOLOGY®

Cardiovascular Research
doi:10.1093/cvr/cvu133

Frizzled7 controls vascular permeability through the Wnt-canonical pathway and cross-talk with endothelial cell junction complexes

Nancy Ferreira Tojais^{1,2,3}, Claire Peghaire^{1,2}, Nathalie Franzl^{1,2},
Frédéric Larrieu-Lahargue^{1,2}, Béatrice Jaspard^{1,2}, Annabelle Reynaud^{1,2},
Catherine Moreau^{1,2}, Thierry Couffignal^{1,2,4}, Cécile Duplâa^{1,2}, and Pascale Dufourcq^{1,2*}

¹Adaptation cardiovasculaire à l'ischémie, INSERM U1034, 125 Avenue du Haut Lévêque, 33 600 Pessac, France; ²Adaptation cardiovasculaire à l'ischémie, Bordeaux University, U1034, Pessac, France; ³Stanford University School of Medicine, Stanford, CA, USA; and ⁴Department of Cardiology, Pôle Cardiothoracique, Hôpital Haut Lévêque, Pessac, France

Received 18 October 2013; revised 2 May 2014; accepted 6 May 2014

Time for primary review: 39 days

Aims

Vascular permeability is essential for the health of normal tissues and is an important characteristic of many disease states. The role of the Wnt/frizzled pathway in vascular biology has recently been reported. The objectives of this study are to analyse the role of Frizzled7 (Fzd7) receptor in the control of vascular integrity.

Methods and results

Fzd7 is expressed in endothelial cells and accumulates at the points of cell–cell contact in association with VE-cadherin and β -catenin, two major adherens junction molecules. To selectively delete *fzd7* in the vasculature, we developed gene targeting approaches using CreLox strategy in mice. Genetic *fzd7* inhibition in the endothelium increases vascular permeability in basal and factor-induced conditions. On the cellular level, *fzd7* knockdown or depletion leads to an increase in paracellular permeability with a loss of adherens junction organization. These impairments are associated with a decrease in both VE-Cadherin and β -catenin expression, a decrease in their association and an increase of tyrosine phosphorylation of VE-cadherin/ β -catenin. Fzd7 transduces a Wnt/ β -catenin signalling cascade that is required to regulate β -catenin and canonical target gene expression. Finally, LiCl, a GSK3 inhibitor, and β -catenin overexpression rescued endothelial integrity and adherens junction organization, induced by *fzd7* deletion.

Conclusion

These findings establish that Fzd7 is a new partner of adherens junctional complex and represents a novel molecular switch for the control of vascular permeability via activation of the Wnt-canonical pathway.

Keywords

Wnt/frizzled signalling • Vascular permeability • Endothelial cell • Transgenic mice • Cadherin

1. Introduction

The function of the endothelium is to provide a network to allow delivery of oxygen and nutrients to tissues throughout the body. This network comprises adjacent endothelial cells which utilize adherens junction complexes containing vascular endothelial cadherin (VE-cadherin) link to catenin proteins (α , β , γ or p120) to maintain the appropriate level of vascular permeability.^{1,2} In a variety of pathological conditions including ischaemic disease, acute and chronic inflammation, and tumour formation, secreted mediators lead to a prolonged and chronic increase in endothelial paracellular permeability which can result in vessel wall leakiness and organ dysfunction.³

The Wnt/Fzd pathway is known to play important roles in multiple physiological and pathological processes.⁴ Recent advances in vascular biology highlight important roles for multiple components of the Wnt/Fzd signalling pathway in endothelial cell biology regulating cell differentiation, proliferation, survival, cell junctions, and polarity.^{5,6} Wnt/Fzd signalling is a complex pathway with 19 soluble Wnt proteins that can bind to 10 frizzled receptors and activate canonical, dependant to the β -catenin, and non-canonical signalling pathways, so-called planar cell polarity (PCP) or the Wnt/ Ca^{2+} pathway.⁷ Among the Fzd receptors, we and others have previously demonstrated that Frizzled7 (Fzd7) is expressed in EC and that its down-regulation enhances EC spreading and modifies actin cytoskeleton.^{8,9} Different reports have

* Corresponding author. Tel: +33 5 57891972; fax: +33 5 56368979, Email: pascale.dufourcq@u-bordeaux2.fr

Published on behalf of the European Society of Cardiology. All rights reserved. © The Author 2014. For permissions please email: journals.permissions@oup.com.

ARTICLE

Received 24 Jan 2014 | Accepted 28 Jul 2014 | Published 8 Sep 2014

DOI: 10.1038/ncomms5832

The ubiquitin ligase PDZRN3 is required for vascular morphogenesis through Wnt/planar cell polarity signalling

Raj N. Sewduth¹, Béatrice Jaspard-Vinassa^{1,2}, Claire Peghaire¹, Aude Guillabert¹, Nathalie Franzl¹, Frederic Larrieu-Lahargue¹, Catherine Moreau¹, Marcus Fruttiger³, Pascale Dufourcq^{1,2}, Thierry Couffignal^{1,2,4} & Cécile Duplaa^{1,2}

Development and stabilization of a vascular plexus requires the coordination of multiple signalling processes. Wnt planar cell polarity (PCP) signalling is critical in vertebrates for diverse morphogenesis events, which coordinate cell orientation within a tissue-specific plane. However, its functional role in vascular morphogenesis is not well understood. Here we identify PDZRN3, an ubiquitin ligase, and report that *Pdzn3* deficiency impairs embryonic angiogenic remodelling and postnatal retinal vascular patterning, with a loss of two-dimensional polarized orientation of the intermediate retinal plexus. Using *in vitro* and *ex vivo* *Pdzn3* loss-of-function and gain-of-function experiments, we demonstrate a key role of PDZRN3 in endothelial cell directional and coordinated extension. PDZRN3 ubiquitinates Dishevelled 3 (Dvl3), to promote endocytosis of the Frizzled/Dvl3 complex, for PCP signal transduction. These results highlight the role of PDZRN3 to direct Wnt PCP signalling, and broadly implicate this pathway in the planar orientation and highly branched organization of vascular plexuses.

¹INSERM, Adaptation cardiovasculaire à l'ischémie, U1034, F-33600 Pessac, France. ²Univ. Bordeaux, Adaptation cardiovasculaire à l'ischémie, U1034, F-33600 Pessac, France. ³UCL Institute of Ophthalmology, London EC1V 9EL, UK. ⁴CHU de Bordeaux, Service des Maladies Cardiaques et Vasculaires, F-33000 Bordeaux, France. Correspondence and requests for materials should be addressed to C.D. (email: cecile.duplaa@inserm.fr).

Titre : Caractérisation du rôle du récepteur Frizzled7 dans l'intégrité vasculaire et l'angiogenèse

Résumé : L'angiogenèse physiologique est un processus clé du développement embryonnaire et chez l'adulte. Une anomalie de la formation des vaisseaux sanguins est à l'origine de nombreuses pathologies. Une meilleure compréhension des mécanismes de l'angiogenèse est un pré-requis essentiel à la mise au point de nouvelles stratégies thérapeutiques ayant pour objectif d'inhiber ou stimuler cette angiogenèse pour mieux traiter l'ensemble de ces pathologies. Au cours de ces dernières années, les voies de signalisation Wnt/Fzd sont apparues comme jouant un rôle fondamental dans le développement vasculaire. Au début de cette thèse, un premier projet nous a permis de montrer le rôle important de Fzd7 dans le contrôle de la perméabilité vasculaire, *in vitro* et *in vivo*, via la voie canonique et la régulation des complexes jonctionnels dépendantes de la VE-cadhérine. La deuxième partie de ce travail s'est focalisé sur le rôle de Fzd7 dans la formation des vaisseaux. Nous avons mis en évidence que Fzd7 contrôle la vascularisation post-natale de la rétine chez la souris. La voie de signalisation Fzd7/DVL/ β -caténine régule le sprouting et la prolifération des cellules endothéliales (CE) via l'activation de la voie Notch, tandis que la voie de signalisation de Fzd7 contrôle la migration des CE via la régulation de MMP2/9 indépendamment de la voie Notch. Enfin, la troisième partie de cette thèse a eu pour objectif d'étudier l'implication de Fzd7 sur l'angiogenèse pathologique. Nos résultats préliminaires indiquent que Fzd7 participe aux phases de vaso-oblitération et de néovascularisation dans un modèle de rétinopathie induite par l'oxygène chez la souris, suggérant que Fzd7 pourrait être une nouvelle cible dans le traitement des rétinopathies.

Mots clés : Frizzled7 - voies Wnt/Frizzled – intégrité vasculaire – angiogenèse – rétinopathies

Title : Characterization of the role of Frizzled7 receptor in vascular integrity and angiogenesis

Abstract : Physiological angiogenesis is a key process in embryonic development but also in adult. Abnormal formation of blood vessels is the cause of many diseases. A better understanding of the mechanisms of angiogenesis is an essential prerequisite for the development of new therapeutic strategies aimed to inhibit or stimulate angiogenesis to better address these pathologies. In recent years, the Wnt/Fzd signaling pathways appeared to play a key role in vascular development. At the beginning of this study, a first project allowed us to show the important role of Fzd7 in controlling vascular permeability *in vitro* and *in vivo*, through the canonical pathway and the regulation of VE-cadherin junctional complexes. The second and main part of this work focused on the role of Fzd7 in the formation of blood vessels. We have demonstrated that Fzd7 controls postnatal vascularization of mice retina. The signaling pathway Fzd7/DVL/ β -catenin regulates the sprouting and proliferation of endothelial cells (EC) through activation of Notch signaling, but also controls EC migration through MMP2/9 but independently of the Notch pathway. Finally, the third part of this work aimed to study the involvement of Fzd7 on pathological angiogenesis. Our preliminary data indicate that Fzd7 regulates vaso-obliteration and neovascularization in a mice model of oxygen-induced retinopathy suggesting that Fzd7 could be a new target for the treatment of retinopathy.

Keywords : Frizzled7 – Wnt/Frizzled pathway – vascular integrity – angiogenesis – retinopathy

Unité de recherche

«Adaptation cardiovasculaire à l'ischémie», INSERM 1034, 1 Avenue de Magellan 33600 Pessac